

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 17 maart 2025
KENMERK CGM/250317-01
ONDERWERP Advies handelingen met muizen geïnfecteerd met gg-*C. sporogenes* op ML-I/D-I

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag over het dossier (IG 25-007_2.8-000) getiteld: 'Verzoek omlaagschaling bestraling en beeldvorming van dieren geïnfecteerd met gg-Clostridium', ingediend door de Universiteit Maastricht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van experimenten met muizen geïnfecteerd met een genetisch gemodificeerde (gg-)bacterie *Clostridium sporogenes*. De aanvrager bezit een vergunning om muizen op inperkingsniveau DM-II te infecteren met de gg-bacterie, maar verzoekt beeldvorming en/of bestraling te mogen uitvoeren op niveau ML-I of D-I. Dit wordt onderbouwd met gegevens over de verzwakking van de gg-*C. sporogenes*. Gevraagd wordt of de gg-*C. sporogenes* stam beschouwd kan worden als een niet-ziekteverwekkend organisme (pathogeniteitsklasse 1; PG 1), en of de COGEM kan instemmen met de voorgenomen omlaagschaling.

C. sporogenes is een bacterie die alleen kan groeien in afwezigheid van zuurstof en sporen vormt onder ongunstige milieuomstandigheden. De sporen groeien onder de juiste omstandigheden uit tot actieve bacteriën. De gg-*C. sporogenes* is verzwakt door aangebrachte mutaties. De gg-bacterie is afhankelijk van de toevoeging van uracil voor de groei, en breekt minder goed rode bloedcellen af.

De COGEM is van oordeel dat de gg-*C. sporogenes* verzwakt is ten opzichte van de ouderstam, maar beschikt over onvoldoende gegevens om de soort in PG 1 in te delen. Op basis van het verzwakte karakter, is de COGEM van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op ML-I en D-I en onder navolging van de aanvullende voorschriften van de aanvrager, de risico's 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 series of loops and a long horizontal stroke.

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

Advies Omlaagschaling voor beeldvorming en bestraling van muizen geïnfecteerd met gg-*Clostridium sporogenes*

COGEM-advies CGM/250317-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over een verzoek tot omlaagschaling van handelingen met dieren geïnfecteerd met genetisch gemodificeerde (gg-) *Clostridium sporogenes* (IG 25-007). De aanvraag is afkomstig van de Universiteit Maastricht, die reeds in het bezit is van een vergunning om (wildtype of gg-)dieren te infecteren met gg-*C. sporogenes* op DM-II. Voor het onderzoek is het echter nodig beeldvorming en/of bestraling uit te voeren op geïnfecteerde muizen, waarvan de apparatuur zich op inperkingsniveau ML-I of D-I bevindt. De aanvrager verzoekt daarom een tijdelijke omlaagschaling voor deze beeldvormings- en bestralingsexperimenten, en onderbouwt dit met gegevens over de attenuatie van de betreffende gg-*C. sporogenes* variant (*C. sporogenes*-NT/CAG). De COGEM is door Bureau GGO gevraagd of de gg-*C. sporogenes* stam ingedeeld kan worden in pathogeniteitsklasse 1, en of zij kan instemmen met de voorgenomen omlaagschaling. Daarnaast is de COGEM gevraagd of er aanvullende voorschriften noodzakelijk zijn bij de voorgenomen handelingen.

2. Achtergrondinformatie over het genus *Clostridium*

Het genus *Clostridium* (familie *Clostridiaceae*) omvat anaerobe, meestal grampositieve, staafvormige bacteriën.^{1,2,3} *Clostridium*-soorten zijn aangetroffen in grond, oppervlaktewater en het maagdarmlkanaal van dieren en de mens.^{1,2,4,5} Bacteriën uit dit genus zijn in staat onder ongunstige omstandigheden te overleven door sporen te vormen, bijvoorbeeld wanneer er in de omgeving een tekort aan voedingsstoffen ontstaat.⁶ De sporen worden gevormd doordat de bacterie zich door middel van een polair septum in twee genetisch identieke segmenten op kan delen. Het grotere segment (de moedercel) neemt vervolgens het kleinere segment (de 'forespore') in zich op, dat zich daar ontwikkelt tot een spore in ruststadium. Deze metabolisch inactieve sporen komen in het milieu terecht door lysis van de moedercel. Onder gunstige milieuomstandigheden kunnen de sporen weer metabolische activiteit gaan vertonen en groeien zij weer uit tot vegetatieve cellen.^{1,6,7} Sporen zijn zeer resistent tegen extreme temperaturen, droogte, straling en chemicaliën (zoals desinfectiemiddelen).^{6,8,9}

Binnen het genus *Clostridium* zijn meer dan 200 soorten beschreven.^{1,2,3} Verschillende soorten, waaronder *Clostridium botulinum*, *Clostridium nigrificans*, *Clostridium perfringens* en *C. sporogenes*, kunnen voedselbederf veroorzaken wanneer voedsel onder vacuüm of bij onvoldoende koeling wordt bewaard.⁹ Veel *Clostridium*-soorten zijn pathogeen voor mens en dier.^{1,2} Pathogeniteit wordt veroorzaakt door de productie van toxines en de aanwezigheid van virulentiefactoren.² Bekende ziekteverwekkende soorten zijn *C. botulinum* (veroorzaker van botulisme, een vorm van voedselvergiftiging veroorzaakt door het botulismeneurotoxine en gepaard gaande met verlamingsverschijnselen), *Clostridium difficile* (veroorzaker van pseudomembraneuze colitis, een ontsteking aan het slijmvlies van de dikke darm), *C. perfringens* (veroorzaker van gasgangreen, een

wondinfectie gepaard gaande met gasontwikkeling en weefselsterfte) en *Clostridium tetani* (veroorzaker van tetanus, een infectieziekte gepaard gaande met tonische spierkrampen).^{2,7}

Al enige tijd wordt in knaagdieren en de mens onderzocht in hoeverre (gg-)sporen van *Clostridium*-soorten (waaronder *C. sporogenes*) ingezet kunnen worden bij kankertherapie.^{10,11,12,13,14} De sporen kunnen gebruikt worden als transportmiddel van genen, coderend voor specifieke enzymen, naar de anoxische/necrotische gebieden in tumoren van proefdieren.^{15,16,17} In de necrotische delen van de tumor groeien de sporen uit tot vegetatieve cellen en brengen ze de enzymcoderende genen tot expressie. Aangezien de *Clostridium*-sporen selectief uitgroeien in anoxische weefsels, is deze aanpak tumorspecifiek.^{10,15,16,17}

2.1 De soort *Clostridium sporogenes*

C. sporogenes is een grampositieve anaerobe bacterie die oorspronkelijk geïsoleerd is uit humane feces, maar ook wordt aangetroffen in grond, of sediment van zoet of zout water.¹⁸ De soort is nauw verwant aan de proteolytische *C. botulinum* types A, B en F (*C. botulinum* groep I).^{18,19,20} In tegenstelling tot *C. botulinum*, produceren *C. sporogenes* stammen in het algemeen geen botulismetoxine,^{1,18,19,21} dat een ernstige ziektebeeld kan veroorzaken bij mensen, paarden, vee, watervogels en vissen.²⁰ Bij enkele klinische isolaten van *C. sporogenes* is echter wel productie van type B botulinetoxine waargenomen, vermoedelijk door horizontale genoverdracht van het botulinetoxine-gen van *C. botulinum*.^{22,23} Uit een vergelijkende genoom-analyse van *C. botulinum* en *C. sporogenes* is gebleken dat beide soorten in het bezit zijn van een genencluster dat lijkt op een cluster coderend voor de virulentiefactor streptolysine S (SLS) van groep A streptokokken.^{14,24} Dit genencluster codeert voor een hemolytisch toxine (clostridiolysine S) dat mogelijk een rol speelt bij weefselbeschadiging en bij kan dragen aan de virulentie van *C. botulinum* en *C. sporogenes*.²⁵

In vivo studies bij knaagdieren tonen aan dat konijnen en hamsters gevoelig zijn voor een door *C. sporogenes* geproduceerd toxine, vermoedelijk het clostridiolysine S toxine.^{26,27,28,29,30} Ziekteverschijnselen variëren van mild en voorbijgaande aard (hamsters) tot zeer ernstig (konijnen; bloedingen van het maag- en darmslijmvlies).

In de literatuur zijn bij de mens sporadisch casussen beschreven die door *C. sporogenes* worden veroorzaakt.^{31,32,33,34,35} Invasieve infecties komen voor bij ernstige chirurgische complicaties of bij immuungecompromitteerden en zijn door middel van antimicrobiële therapie goed te behandelen.

2.2 *C. sporogenes* stam ATCC 3584 (=DSM 795, = NCIMB 10696)

De *C. sporogenes* stam ATCC 3584 is geïsoleerd uit grond en heeft een optimale groeitemperatuur bij 37 °C.³⁶ Het genoom van deze stam (naast ATCC 3584 ook bekend als DSM 795 of NCIMB 10696) is in 2015 in kaart gebracht.^{18,21} De stam wordt ook wel beschouwd als niet-toxische tegenhanger van de *C. botulinum* groep I stammen.^{18,37,38} Uit genoomanalyses is gebleken dat het gencluster voor het botuline neurotoxine afwezig is in *C. sporogenes* ATCC 3584 (=DSM 795 = NCIMB 10696).^{18,21,39} Ook zijn geen aanwijzingen voor aanwezigheid van *C. perfringens* toxine genen gevonden in *C. sporogenes* ATCC 3584.⁴⁰ Wel zijn er aanwijzingen dat ATCC 3584 het hemolytische clostridiolysine S tot expressie brengt, dat

gepaard gaat met β -hemolyse van rode bloedcellen van schapen en mensen.¹⁸ Deletie van dit aan SLS-
verwante operon in stam ATCC 3584 zorgt voor een significante vermindering van hemolyse van
paardenbloed.¹⁴ Gg-varianten van stam ATCC 3584 zijn toegepast in preklinische studies in muizen
waarin tumoren zijn geïntroduceerd, waarbij sporen intraveneus werden toegediend.^{13,14,16} De muizen
vertoonden in enkele gevallen een tijdelijk gewichtsverlies van voorbijgaande aard, maar geen
ziekteverschijnselen die gerelateerd zijn aan mogelijke toxiciteit.^{13,16}

3. Eerder COGEM advies

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van een groot aantal bacteriën. Hierbij zijn
verschillende *Clostridium*-soorten geïnclassificeerd als klasse 2 pathogenen, waaronder *C. sporogenes*.⁴¹ De
COGEM heeft in 2012 de pathogeniteitsklasse van *C. sporogenes* opnieuw tegen het licht gehouden en
daarnaast ook specifiek geadviseerd over de pathogeniteitsklasse van de *C. sporogenes* stam ATCC 3584.
De pathogeniteitsklasse van *C. sporogenes* bleef ongewijzigd, en ook stam ATCC 3584 is in
pathogeniteitsklasse 2 ingedeeld, omdat de COGEM niet over voldoende gegevens beschikte om vast
te kunnen stellen dat *C. sporogenes* ATCC 3584 niet pathogeen is.⁴²

In 2012 heeft de COGEM eveneens geadviseerd over de inschaling van werkzaamheden met een
gg-*C. sporogenes*, afgeleid van de stam ATCC 3584. Deze gg-*C. sporogenes* ATCC 3584 betrof een *pyrE*
knockout (KO-)mutant die niet in staat is uracil te synthetiseren en afhankelijk is van exogeen uracil
voor de groei. Daarnaast werd ook onderzoek gedaan met *pyrE* KO-mutanten die tevens
nitroreductase (NTR) afkomstig van andere prokaryoten tot expressie brengen. De COGEM was
destijds van mening dat de aangebrachte mutaties niet van invloed waren op het pathogene karakter
van de bacterie. Het was onduidelijk in welke mate de uitschakeling van het *pyrE*-gen het
verspreidingspotentieel van de bacteriestam beperkt. De COGEM heeft daarom geadviseerd de
werkzaamheden met gg-*C. sporogenes* plaats te laten vinden op ML-II en DM-II.

4. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager wil gebruikmaken van de genetisch gemodificeerde *C. sporogenes*-NT, ook wel CAG
genoemd, die gebaseerd is op *C. sporogenes* stam ATCC 3584, maar enkele deleties bevat. De aanvrager
beschikt reeds over een vergunning om sporen van de gg-*C. sporogenes*-NT te injecteren in wildtype of
gg-muizen die eerder geïnjecteerd zijn met tumorcellen, getransfecteerde cellen of lentiviraal
getransduceerde cellen. Voor vervolgonderzoek is het noodzakelijk om beeldvorming of bestraling
toe te passen, dat enkel plaats kan vinden op inperkingsniveau ML-I en/of D-I. De aanvrager verzoekt
derhalve, met inachtneming van enkele voorschriften, een omlaagschaling van de werkzaamheden.

4.1 Het ggo: *C. sporogenes*-NT

De aanvrager zal gebruikmaken van de *C. sporogenes* stam ATCC 3584 waarin het *pyrE*-gen is
uitgeschakeld, en een deletie is aangebracht in het aan streptolysin S (SLS)-homologe operon. Het
pyrE-gen is vereist voor de biosynthese van uracil. *pyrE* KO-mutanten kunnen alleen groeien in
aanwezigheid van exogeen uracil. De *pyrE*-KO en haemolysine-operon-gedeleteerde gg-*C. sporogenes*
wordt *C. sporogenes*-NT (non-toxisch, ook wel *Clostridium* CAG) genoemd. In deze *C. sporogenes*-NT
zullen als donorsequenties genen betrokken bij het immuunsysteem (mIL2, IL15, aDR5, FOXO4, aGITR,

a-PD-L1, a-CTLA4, GM-CSF) geïnsereerd worden. De therapeutische genen zullen met behulp van CRISPR/Cas9 geïnsereerd worden, waardoor er geen plasmiden met antibioticaresistentiecassettes gebruikt hoeven te worden, en de gg-*C. sporogenes* gevoelig blijft voor meerdere types antibiotica.

4.2 Handelingen en aanvullende maatregelen

Wildtype of gg-muizen zullen op inperkingsniveau DM-II geïnfecteerd worden met gg-*C. sporogenes*-NT sporen. De aanvrager kan niet geheel uitsluiten dat er na toediening van een sporensuspensie via de staartvene, gg-sporen kunnen worden uitgescheiden via de ontlasting of urine. Om de met gg-*C. sporogenes*-NT geïnfecteerde dieren te vervoeren van de DM-II faciliteit naar de D-I/ML-I faciliteit waar de beeldvormings- en bestralingsapparatuur zich bevindt, worden de dieren op DM-II in een schone filtertopkooi geplaatst. De ML-I/D-I ruimten waar de beeldvorming of bestraling zal plaatsvinden, liggen niet in de nabijheid van de DM-II ruimte waar de geïnfecteerde muizen gehuisvest worden. Vanwege de te overbruggen afstand en om de blootstelling van de dieren aan anesthesie tot een minimum te beperken, en tevens minder zware anesthesie te hoeven gebruiken, zullen de dieren pas in de ML-I/D-I ruimte onder narcose worden gebracht. In de D-I/ML-I ruimte worden de dieren eerst overgezet in een inductiekooi die naast de filtertopkooi wordt geplaatst, waarna de dieren met behulp van isofluraan onder gasnarcose gebracht worden. De deur van de D-I/ML-I ruimte wordt gesloten wanneer de dieren naar de inductiekooi overgebracht worden, en is dusdanig afgewerkt dat eventuele ontsnapping van muizen niet mogelijk is. Tijdens de bestraling of beeldvorming worden de dieren op een papieren onderlegger of plastic 'stage' gelegd. De muizen blijven tijdens de gehele procedure onder anesthesie. Na afloop van de procedure worden de muizen teruggeplaatst in de filtertopkooi om bij te komen van de anesthesie. De tafel waarop de dieren liggen, de plastic stage, de inductiekooi en alle andere horizontale vlakken worden schoongemaakt met een geschikt desinfectiemiddel. De papieren onderleggers worden als ML-II afval afgevoerd. De dieren worden na beeldvorming/bestraling teruggebracht naar de DM-II faciliteit, waar ze gehuisvest worden.

De D-I/ML-I ruimte zal tijdens de beeldvorming/bestraling voorzien zijn van een biohazard teken. De aanvrager geeft tevens aan dat de D-I ruimte voldoet aan de ML-I inrichtingseisen zoals gesteld in bijlage 9.1.1.1.1 van de Regeling ggo⁴³, en dat er gewerkt zal worden volgens de ML-I werkvoorschriften. Enkel geautoriseerd personeel mag de D-I/ML-I ruimte betreden.

5. Overweging

De aanvrager is voornemens om op een lager inperkingsniveau (ML-I/D-I) bestralings- en beeldvormingsexperimenten uit te voeren op (al dan niet gg-)muizen die geïnfecteerd zijn met gg-*C. Sporogenes*-NT (CAG). Infectie van de (gg-)muizen en verdere huisvesting op DM-II is reeds vergund. De aanvrager is van mening dat de gebruikte gg-*C. Sporogenes*-NT sterk verzwakt is, en dat dit tezamen met de te hanteren werkprocedure maakt dat het veilig is om de bestralings- en beeldvormingsexperimenten uit te voeren op ML-I dan wel D-I.

5.1 Attenuatie van *C. sporogenes*-NT/CAG

In de te gebruiken gg-*C. sporogenes*-NT stam is het *pyrE*-gen en het aan SLS-homologe operon gedeleteerd. Selectie van *pyrE*-mutanten vindt plaats door groeimedium te verrijken met 5-FOA ('5-

fluoro-orotic acid') waar wildtype organismen gevoelig voor zijn, maar een *pyrE*-mutant resistent voor is. De *pyrE*-KO-mutant is uracil-auxotroof, hetgeen volgens de aanvrager de mogelijkheid tot verspreiding in het milieu beperkt. Dit wordt verklaard door de minimale concentratie van uracil in het milieu, omdat dit voor veel micro-organismen een bron is voor koolstof, stikstof en fosfaat en daarom snel verbruikt zal worden door de micro-organismen in het milieu. De COGEM merkt op dat voor deze theoretische benadering geen experimentele onderbouwing wordt gegeven. Er zijn diverse bacteriesoorten in staat om uracil uit te scheiden,⁴⁴ waaronder de darmbacterie *Escherichia coli*,⁴⁵ waardoor groei van een uracil-auxotrofe stam in bepaalde milieus wellicht wel ondersteund kan worden.

De aanvrager stelt dat een eerdere PCR-analyse van sporen geïsoleerd 1 tot 3 maanden na infectie van de sporen bij tumordragende muizen, bevestigt dat de aangebrachte modificatie stabiel is. De COGEM merkt op dat niet beschreven is hoe de *pyrE* knockout heeft plaatsgevonden; of hierbij sprake is van een volledige deletie of een knockout veroorzaakt door kleine deleties/mutaties. Tevens is uit de beschrijving van de aanvrager niet duidelijk of de geïsoleerde sporen uit de tumor ontkieming en groei hebben meegemaakt. Wanneer dit niet het geval is, zal er ook geen sprake zijn van selectiedruk op reversie van de mutatie. In de wetenschappelijke literatuur is beschreven dat bij spontane *pyrE*-mutanten van het archaeon *Pyrococcus abyssi*, verkregen door kweek op medium met 5-FOA en uracil, met lage frequentie reversie op kan treden.⁴⁶ Wanneer het gen echter volledig verwijderd is, kan aangenomen worden dat een dergelijke deletie stabiel is.

Met behulp van CRISPR/Cas9 is een deletie aangebracht in het aan SLS-homologe operon in gg-*C. sporogenes*-NT, dat bevestigd is met Sanger-sequencing. Het effect op het hemolytisch vermogen van de bacterie is onderzocht met een bloed-assay, waarbij gebruikt gemaakt is van bloed afkomstig van paarden en schapen.¹⁴ Schapenbloed bleek minder gevoelig te zijn voor hemolyse door zowel wildtype *C. sporogenes* stam als gg-*C. sporogenes*-NT, en hier werd geen significant verschil waargenomen tussen het wildtype en het gg. Bij paardenbloed werd zowel na 8 als 24 uur een significant verschil waargenomen in hemolyse tussen wildtype *C. sporogenes* en gg-*C. sporogenes*-NT.

De deletie van het operon is beschreven in de wetenschappelijke literatuur, en het betreft een volledige knockout van het operon.¹⁴ Voor reversie zou complete acquisitie plaats moeten vinden vanaf een wildtype bacterie. Spontane reversie van deze deletie acht de COGEM derhalve uitgesloten.

Op basis van de experimentele gegevens concludeert de COGEM dat er een afname in hemolyse activiteit waar te nemen is. Bij paardenbloed is een significante vermindering in bloedhemolyse waargenomen ten opzichte van de wildtype stam. Of hiermee ook sprake is van een verminderde virulentie in gevoelige dieren, zoals konijnen en hamsters, kan met deze experimenten niet bevestigd worden.

De pathogeniteit van wildtype *C. sporogenes* is gering; er zijn voornamelijk ziekteverschijnselen beschreven bij konijnen en hamsters. De COGEM is van oordeel dat op basis van de aangebrachte genetische modificaties in gg-*C. sporogenes*-NT aangenomen kan worden dat deze stam geattenuëerd is ten opzichte van de wildtype *C. sporogenes* stam, maar zij acht het onvoldoende aangetoond dat deze stam ook verminderd virulent is in gevoelige dieren zoals konijnen en hamsters.

Met betrekking tot de pathogeniteit van gg-C. *sporogenes*-NT in mensen en muizen, die in het algemeen minder gevoelig zijn voor infectie, is de COGEM van oordeel dat gg-C. *sporogenes*-NT vergelijkbaar is met een micro-organisme uit pathogeniteitsklasse 1 (PG 1). Om vast te kunnen stellen of gg-C. *sporogenes*-NT ook voor andere dieren als PG 1 organisme beschouwd kan worden, zijn nadere experimenten nodig op gevoelige dieren.

5.2 Inschaling van werkzaamheden

De aanvrager geeft een uitgebreide beschrijving van de voorgenomen werkwijze om de dieren op ML-I/D-I te bestralen of beeldvormingsexperimenten uit te voeren. De aanvrager stelt dat niet uitgesloten is dat de gg-C. *sporogenes*-NT sporen door het proefdier kunnen worden uitgescheiden, voornamelijk via ontlasting maar mogelijk ook via urine, wanneer de sporen via de staartvene zijn toegediend. Het proefdier wordt daarom op inperkingsniveau DM-II in een schone filtertopkooi geplaatst en ook vindt desinfectie plaats van de inductiekooi en alle andere horizontale vlakken waarmee het dier in aanraking is geweest.

Op basis van het geattenuerde fenotype van gg-C. *sporogenes*-NT, is de COGEM van mening dat de werkwijze en de maatregelen die de aanvrager zal hanteren (zie paragraaf 4.2), voldoende inperking bieden om in te kunnen stemmen met het uitvoeren van de beschreven handelingen op inperkingsniveaus ML-I en D-I waarbij gewerkt wordt volgens de ML-I werkvoorschriften.

6. Advies

Alles in overweging nemende, stemt de COGEM in met de door de aanvrager voorgestelde tijdelijke omlaagschaling voor beeldvorming en bestraling van muizen geïnfecteerd met gg-C. *sporogenes*-NT. De COGEM is van oordeel dat bij het uitvoeren van de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkingsniveau en onder navolging van de aanvullende voorschriften van de aanvrager, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Johnson EA (2009). Clostridia. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Eds Schaechter M *et al.* Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
2. Onderdonk AW & Garrett WS (2010). Gas gangrene and other *Clostridium*-associated diseases. In: Principles and practice of infectious diseases. Seventh edition. Eds Mandell *et al.* Churchill Livingstone, Elsevier, Philadelphia (USA)
3. Lawson PA & Rainey FA (2016). Proposal to restrict the genus *Clostridium* Prazmowski to *Clostridium butyricum* and related species. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 66: 1009-1016
4. Kitamura S *et al.* (1997). The role of mammalian intestinal bacteria in the reductive metabolism of zonisamide. J. Pharm. Pharmacol. 49: 253-256
5. McBain AJ & MacFarlane GT (1998). Ecological and physiological studies on large intestinal bacteria in relation to production of hydrolytic and reductive enzymes involved in formation of genotoxic metabolites. J. Med. Microbiol. 47: 407-416
6. Shen A *et al.* (2019). Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens. Microbiol. Spectr. 7: 10.1128/microbiolspec.gpp3-0017-2018
7. Shen A *et al.* (2019). Sporulation and Germination in Clostridial Pathogens. Microbiol. Spectr. 7:10.1128/microbiolspec.gpp3-0017-2018
8. Rutala WA *et al.* (1993). Sporicidal activity of chemical sterilants used in hospitals. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 14: 713-718

9. Fung DYC (2009). Food spoilage, preservation and quality control. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Eds Schaechter M et al. Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
10. Minton NP et al. (1995). Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. FEMS Microbiol. Rev. 17: 357-364
11. Dang LH et al. (2001). Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 15155-15160
12. Minton NP (2003). Clostridia in cancer therapy. Nat. Rev. Microbiol. 1: 237-242
13. Zhang Y-L et al. (2014). *Clostridium sporogenes* delivers interleukin-12 to hypoxic tumours, producing antitumour activity without significant toxicity. Lett. Appl. Microbiol. 59: 580-586
14. Kubiak AM et al. (2021). Efficient secretion of murine IL-2 from an attenuated strain of *Clostridium sporogenes*, a novel delivery vehicle for cancer immunotherapy. Front. Microbiol. 12: 669488
15. Liu S-C et al. (2002). Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. Gene Ther. 9: 291-296
16. Theys J et al. (2006). Repeated cycles of *Clostridium*-directed enzyme pro-drug therapy result in sustained antitumour effects *in vivo*. Br. J. Cancer 95: 1212-1219
17. Liu S-C et al. (2008). Optimized *Clostridium*-directed enzyme prodrug therapy improves the antitumour activity of the novel DNA cross-linking agent PR-104. Cancer Res. 68: 7995-8003
18. Poehlein A et al. (2015). Genome sequence of *Clostridium sporogenes* DSM 795T, an amino acid-degrading, nontoxic surrogate of neurotoxin-producing *Clostridium botulinum*. Stand. Genomic Sci. 10: 40
19. Hutson RA et al. (1993). Genetic interrelationships of proteolytic *Clostridium botulinum* types A, B, and F and other members of the *Clostridium botulinum* complex as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. Antonie van Leeuwenhoek 64: 273-283
20. Collins MD & East AK (1998). Phylogeny and taxonomy of the foodborne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. J. Appl. Microbiol. 84: 5-17
21. Kubiak AM et al. (2015). Complete genome sequence of the nonpathogenic soil-dwelling bacterium *Clostridium sporogenes* Strain NCIMB 10696. Genome announc. 3: e00942-15
22. Weigand MR et al. (2015). Implications of genome-based discrimination between *Clostridium botulinum* group I and *Clostridium sporogenes* strains for bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 81: 5420-5429
23. Brunt J et al. (2020). Diversity of the genomes and neurotoxins of strains of *Clostridium botulinum* Group I and *Clostridium sporogenes* associated with foodborne, infant and wound botulism. Toxins 12: 586
24. Sebaiha et al. (2007). Genome sequence of a proteolytic (group I) *Clostridium botulinum* strain Hall A and comparative analysis of the clostridial genomes. Genome Res. 17: 1082-1092
25. Gonzalez DJ et al. (2010). Clostridiolysin S: a post-translationally modified biotoxin from *Clostridium botulinum*. J. Biol. Chem. 285: 28220-28228
26. Hara Y et al. (1991). Isolation of enterotoxin-producing *Clostridium sporogenes* from cefmetazole-associated diarrheic rabbit. J. Vet. Med. Sci. 53: 531-532
27. Hara-Kudo Y et al. (1997). Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop. Microb. Pathog. 22: 31-38
28. Hara-Kudo Y et al. (1997). Characteristics of toxicity and haemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* in various animals and cultured cells. J. Med. Microbiol. 46: 270-275
29. Marrie TJ et al. (1978). Pseudomembranous colitis: isolation of two species of cytotoxic clostridia and successful treatment with vancomycin. Can. Med. Assoc. J. 119: 1058-1060
30. Schallehn G & Wolff MH (1988). Morphologische Veränderungen humaner embryonaler Lungenfibroblasten durch Cytotoxine verschiedener *Clostridium* Spezies. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A. 267: 367-378
31. CoboF et al. (2023). Bacteremia caused by *Clostridium sporogenes* in an oncological patient. Rev. Esp. Quimioter 36: 217-219
32. Inkster T et al. (2011). Septic arthritis following anterior cruciate ligament reconstruction secondary to *Clostridium sporogenes*; a rare clinical pathogen. J. Clin. Pathol. 64: 820-821
33. Abusnina W et al. (2019). *Clostridium sporogenes* bacteremia in an immunocompetent patient. IDCases 15: e00481
34. Brown KL (2000). Control of bacterial spores. Br. Med. Bull. 56: 158-171
35. Bodey GP et al. (1991). Clostridial bacteremia in cancer patients. A 12-year experience. Cancer 67: 1928-1942
36. American Type Culture Collection (ATCC). *Clostridium sporogenes* (Metchnikoff) Bergey et al. 3584 TM <https://www.atcc.org/products/3584> (bezocht: 4 maart 2025)

37. Olsen I *et al.* (1995). Rejection of *Clostridium putrificium* and conservation of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 414
38. Judicial Commission on the International Committee of Systematic Bacteriology (1999). Rejection of *Clostridium putrificium* and conservation of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. Opinion 69. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49: 339
39. Fach P *et al.* (1995). PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, F-, and G-producing *Clostridium* spp. and evaluation in food samples. *App. Envir. Microbiol.* 61: 389-392
40. Albini S *et al.* (2008). Real-time multiplex PCR assays for reliable detection of *Clostridium perfringens* toxin genes in animal isolates. *Vet. Mic.* 127: 179-185
41. COGEM (2011). Classificatie van pathogene bacteriën. COGEM-advies CGM/111220-03
42. COGEM (2012). Classificatie en inschaling werkzaamheden *Clostridium sporogenes* ATCC 3584. COGEM-advies CGM/121219-02
43. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 9. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2025-01-01#Bijlage9> (bezocht: 6 maart 2025)
44. Lee K-A *et al.* (2013). Bacterial-derived uracil as a modulator of mucosal immunity and gut-microbe homeostasis in *Drosophila*. *Cell* 153: 797-811
45. Ha E-M (2016). *Escherichia coli*-derived uracil increases the antibacterial activity and growth rate of *Lactobacillus plantarum*. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26: 975-987
46. Watrin L *et al.* (1999). Isolation and characterization of pyrimidine auxotrophs, and molecular cloning of the *pyrE* gene from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus abyssi*. *Mol. Gen. Genet.* 262: 378-381