

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Milieu
Mevrouw W. J. Mansveld
POSTBUS 30945
2500 GX Den Haag

DATUM 19 december 2012
KENMERK CGM/121219-02
ONDERWERP Advies classificatie *Clostridium sporogenes* ATCC 3584

Geachte mevrouw Mansveld,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende een wijziging van vergunning IG 10-012 met de titel 'Hypoxia and Notch signaling pathways in cancer' van het Academisch Ziekenhuis Maastricht, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse-indeling van de bacteriestam *Clostridium sporogenes* ATCC 3584. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de eventuele plaatsing van deze stam op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) en over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde 'knock out' mutanten. Deze mutanten kunnen alleen groeien wanneer exogeen uracil in de omgeving aanwezig is en zijn in staat niet-giftige voorlopermedicijnen tegen kanker om te zetten in giftige derivaten met het uiteindelijke doel kankercellen te lyseren. De 'knock out' mutanten zullen in een proefdiermodel onderzocht worden.

Bijlage 1 bestaat uit een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant. Met de micro-organismen die in Bijlage 1 zijn opgenomen, mag onder bepaalde voorwaarden, op het laagste inperkingsniveau (zoals ML-I of DM-I) gewerkt worden.

C. sporogenes is in 2011 door de COGEM geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen en wordt internationaal gezien als een micro-organisme behorende tot risicogroep 2. De strikt anaerobe sporenvormende bacterie is alom tegenwoordig in het milieu en koloniseert het maagdarmkanaal van mens en dier. Sporadisch zijn bij gezonde mensen infecties met *C. sporogenes* beschreven. Invasieve infecties komen voor bij ernstige chirurgische complicaties of bij immuungecompromiteerden. *In vivo* studies bij mensen en knaagdiersoorten met al dan niet genetisch gemodificeerde *C. sporogenes* sporen laten geen tot milde ziekteverschijnselen zien van voorbijgaande aard. Echter, de bacterie kan bij konijnen ziekte veroorzaken en produceert een toxine dat bij hamsters en konijnen milde tot zeer ernstige ziekteverschijnselen kan geven. De COGEM is daarom van mening dat pathogeniteitsklasse 2 voor *C. sporogenes*, en daarbij ook voor de stam ATCC 3584, het meest passend is.

Gebaseerd op bovenstaande pathogeniteitsklasse-indeling, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein als de voorgenomen werkzaamheden met de *Clostridium sporogenes* ATCC 3584 mutanten plaatsvinden op ML-II en DM-II inperkingsniveau.

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

cc Drs. H.P. de Wijs, Hoofd Bureau GGO
Dr. I. van der Leij, Ministerie van IenM

Classificatie en inschaling werkzaamheden *Clostridium sporogenes* ATCC 3584

COGEM advies CGM/121219-02

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse-indeling van de bacteriestam *Clostridium sporogenes* ATCC 3584. Tevens is de COGEM gevraagd te adviseren over de eventuele plaatsing van deze stam op Bijlage 1 van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo) en over de inschaling van werkzaamheden met genetisch gemodificeerde (gg) mutanten. De adviesvraag heeft betrekking op een wijzigingsaanvraag van een al eerder afgegeven vergunning voor werkzaamheden met gg *C. sporogenes*. De wijzigingsaanvraag is ingediend door het Academisch Ziekenhuis Maastricht.

1.1 *Clostridium*

Het genus *Clostridium* omvat anaerobe grampositieve staafvormige bacteriën.^{1,2} De bacteriën zijn in staat onder ongunstige omstandigheden te overleven door sporen te vormen, bijvoorbeeld wanneer in de omgeving een tekort aan voedingsstoffen ontstaat. De sporen zijn bacteriën in ruststadium en zijn zeer resistent tegen warmte, koude, droogte, straling en chemicaliën, waaronder desinfectantia.^{3,4} Onder gunstige milieu omstandigheden groeien sporen weer uit tot vegetatieve cellen.¹ De natuurlijke habitat van *Clostridium* soorten is grond, oppervlaktewater en het maagdarmkanaal van dieren en de mens.^{1,2}

Binnen het genus *Clostridium* zijn meer dan 200 soorten beschreven.^{1,2} Verschillende soorten, waaronder *C. botulinum*, *C. nigrificans*, *C. perfringens* en *C. sporogenes* kunnen voedselbederf veroorzaken wanneer dit onder vacuüm of bij onvoldoende koeling wordt bewaard.⁴ 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* (verwekker van botulisme, een vorm van voedselvergiftiging veroorzaakt door het botulismeneurotoxine en gepaard gaande met verlamningsverschijnselen), *C. difficile* (verwekker van pseudomembraneuze colitis, een ontsteking aan het slijmvlies van de dikke darm), *C. perfringens* (verwekker van gasgangreen, een wondinfectie gepaard gaande met gasontwikkeling en weefselversterf) en *C. tetani* (verwekker van tetanus, een infectieziekte gepaard gaande met tonische spierkrampen).²

Sinds de jaren negentig van de vorige eeuw wordt gericht in knaagdieren en de mens onderzocht in hoeverre (gg) *Clostridium* sporen (*C. beijerinckii*, *C. novyi-NT*, *C. sporogenes*) ingezet kunnen worden bij kankertherapie.^{5,6} De sporen worden gebruikt als transportmiddel van genen, coderend voor specifieke enzymen, naar de hypoxische/necrotische gebieden in tumoren van proefdieren.^{7,8,9} In de necrotische delen van de tumor groeien de sporen uit tot vegetatieve cellen en brengen ze de enzymcoderende genen tot expressie. Bij toediening van een niet-toxisch voorloper medicijn ('prodrug'), zullen de tot expressie gebrachte enzymen de 'prodrug' omzetten in

een toxisch derivaat waarna de tumorcellen dood gaan en de tumor lyseert. Aangezien de *Clostridium* sporen selectief uitgroeien in hypoxische weefsels, is deze aanpak tumor-specifiek.^{5,7,8,9}

1.2 *C. sporogenes*

C. sporogenes is voor het eerst in 1908 beschreven.¹⁰ De natuurlijke habitat van deze bacteriesoort is grond, oppervlaktewater en het maagdarmkanaal van dieren en de mens.^{10,11,12}

Stamboomanalyses wijzen uit dat *C. sporogenes* nauw verwant is aan de proteolytische *C. botulinum* types A, E en F.^{13,14} Samen vormen deze bacteriën *C. botulinum* groep I. Op grond van de standaard laboratoriumdiagnostiek zijn *C. sporogenes* enerzijds en *C. botulinum* types A, E en F anderzijds niet van elkaar te onderscheiden. De differentiatie vindt plaats aan de hand van de detectie van expressie van het botulismetoxine.^{1,10,13} *C. sporogenes* brengt dit toxine niet tot expressie. Het door dit toxine veroorzaakte ernstige ziektebeeld is beschreven bij de mens, paarden, vee, watervogels en vissen.¹⁴

De complete genoomsequentie van de *C. sporogenes* is nog niet bekend maar van twee stammen wordt het genoom momenteel in kaart gebracht, ATCC 15579 en ATCC PA 3679.^{15,16} Analyse van het genoom van ATCC PA 3679 laat verwantschap zien met A1 toxine-producerende proteolytische *C. botulinum* stammen, maar (fragmenten van) botulismetoxine coderende genenclusters zijn niet aanwezig.¹⁶

Een vergelijkende genoomhybridisatie-analyse van *C. botulinum* en *C. sporogenes* laat zien dat beide soorten in het bezit zijn van een genencluster dat lijkt op een cluster coderend voor de virulentiefactor streptolysine S van groep A Streptococci.¹⁷ Een functionele *in vitro* analyse toont aan dat het 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*.¹⁸

Uit een *in vivo* studie bij ratten, muizen, konijnen en cavia's bleek dat het maag-darmkanaal van konijnen gevoelig was voor de ruwe fractie van een hemorrhagisch toxine geïsoleerd uit een klinisch *C. sporogenes* isolaat van een konijn.^{19,20,21} Maag- en darmslijmvlies lieten bloedingen zien. Indien deze toxische fractie intraperitoneaal aan konijnen werd toegediend, was dit dodelijk. Mogelijk is het betreffende hemorrhagische toxine het clostridiolysine S toxine.

Incidenteel zijn *C. sporogenes* stammen beschreven die *in vitro* lage hoeveelheden toxine produceren met cytotoxiciteit voor verschillende soorten animale cellijnen.^{22,23} Indien deze stammen in de blinde darm van hamsters geïnjecteerd werden, vertoonden deze milde ziekteverschijnselen van voorbijgaande aard.²² Cavia's die intramusculair met *C. sporogenes* cultures waren geïnjecteerd vertoonden geen ziekteverschijnselen.²³

In de literatuur zijn bij de mens sporadisch casussen beschreven die door *C. sporogenes* worden veroorzaakt.¹⁰ Indien deze bacterie infecties veroorzaakt, betreft het in de meeste gevallen patiënten met een verzwakt immuunsysteem en wordt deze voornamelijk aangetroffen bij buikcomplicaties, al dan niet als menginfectie van aerobe en anaerobe flora.²⁴ Vergeleken met andere *Clostridia* soorten veroorzaakt *C. sporogenes* in dit soort ziektegevallen de minste

complicaties die niettemin gerichte antimicrobiële therapie noodzakelijk maakt. *C. sporogenes* infecties zijn goed met antibiotica te behandelen.¹⁰

In vivo kankertherapiestudies bij mensen en knaagdieren met intraveneus toegediende *C. sporogenes* sporen (ATCC 13732) hebben bij de mens milde ziekteverschijnselen (lichte koorts) van voorbijgaande aard laten zien.⁵

Wegens zijn niet-toxigene karakter wordt *C. sporogenes* in de voedselindustrie als modelorganisme voor het testen van conserveringsmethoden gebruikt, bijvoorbeeld om te controleren of een bepaalde procedure in staat is alle aanwezige sporen af te doden.^{25,26} Tevens wordt *C. sporogenes* toegepast om te testen of chemische desinfectantia voldoende sporendodende activiteit hebben.³

1.3 *C. sporogenes* ATCC 3584

C. sporogenes ATCC 3584 is geïsoleerd uit grond en heeft een optimum groeitemperatuur bij 37°C.²⁷ De 'Juridical Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology' heeft de stam benoemd als de 'type-strain' voor de niet-toxigene tegenhangers van de *C. botulinum* groep I stammen.^{28,29} Een PCR specifiek voor botulismetoxine types A, B, E en F was negatief voor *C. sporogenes* ATCC 3584.³⁰ Een PCR specifiek voor *C. perfringens* toxine gaf eveneens een negatieve reactie met *C. sporogenes* ATCC 3584.³¹

Tijdens experimenteel onderzoek voor toepassing bij kankertherapie zijn muizen intraveneus geïnjecteerd met *C. sporogenes* ATCC 3584 sporen.⁸ De muizen vertoonden geen ziekteverschijnselen, wel een tijdelijk gewichtsverlies van voorbijgaande aard.

2. Pathogeniteitsclassificatie onder de Regeling ggo

In de Regeling ggo worden micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen.³² Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door niet pathogene (apathogene) micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen.

Volgens de Regeling ggo is een indeling in pathogeniteitsklasse 1 van toepassing als het micro-organisme minimaal aan één van de volgende criteria voldoet:

- het micro-organisme behoort niet tot een soort waarvan vertegenwoordigers bekend zijn die ziekteverwekkend zijn voor mens, dier of plant.
- het heeft een lange historie van veilig gebruik onder omstandigheden waarbij geen bijzondere inperkende maatregelen zijn getroffen.
- het behoort tot een soort die wel vertegenwoordigers bevat van klasse 2, 3 of 4, maar de stam in kwestie bevat geen genetisch materiaal dat verantwoordelijk is voor de virulentie.
- het niet-virulente karakter van het micro-organisme is door middel van adequate tests aangetoond.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat die zich onder de bevolking

verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding bestaat, alsmede een micro-organisme dat bij planten of dieren ziekte kan veroorzaken.

2.1 Bijlage 1 Regeling ggo

Bijlage 1 van de Regeling ggo is een lijst van micro-organismen die in principe niet pathogeen zijn voor mens, dier of plant (pathogeniteitsklasse 1). Deze bijlage is voor vergunningaanvragers van belang, omdat met deze micro-organismen onder bepaalde voorwaarden op het laagste inperkingsniveau, ML-I, gewerkt mag worden. Dit is toegestaan wanneer voor het vervaardigen van het ggo een veilig geachte vector gebruikt wordt en zich in deze vector geen insertie bevindt die een potentieel gevaar voor mens en milieu vormt.³² Voorbeelden van potentieel 'gevaarlijke' inserties zijn genen die coderen voor toxines, virulentie- of pathogeniteitsfactoren en virale en cellulaire oncogenen.

In de huidige inschalingspraktijk wordt een micro-organisme als pathogeen gezien als deze bij mensen met een normaal functionerend immuunsysteem ziekte kan veroorzaken. 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 een van de bovengenoemde voorwaarden is voldaan, op Bijlage 1 geplaatst worden.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De voorgenomen werkzaamheden bestaan uit het toepassen van gg *C. sporogenes* ATCC 3584 sporen. Deze sporen zullen toegediend worden aan proefdieren (rat, muis) en daarbij fungeren als transportmiddel van 'therapeutische genen' naar hypoxische/necrotische gebieden in tumoren. Na toediening van een 'prodrug' zullen de door de therapeutische genen geëxprimeerde enzymen de 'prodrug' omzetten in een toxisch derivaat. Bij de voorgenomen experimenten zijn wild type *C. sporogenes* ATCC 3584, een *pyrE* knock out mutant (*pyrE* KO), en *pyrE* KO mutanten met nitroreductase (NTR) expressie betrokken.

De mutanten zijn afkomstig van een andere onderzoeksgroep en verkregen door middel van homologe recombinatie met een plasmide met 7 verschillende NTR varianten. Het plasmide is door middel van conjugatie in *C. sporogenes* geïntroduceerd, maar niet meer in de mutanten aanwezig. De aanvrager heeft reeds een vergunning voor het uitvoeren van laboratoriumwerkzaamheden met gg *C. sporogenes* ATCC 3584 onder ML-II inperkingsniveau en het uitvoeren van werkzaamheden met proefdieren onder DM-II inperkingsniveau.

Het *pyrE* gen is vereist voor de biosynthese van uracil. *PyrE* KO mutanten kunnen alleen groeien in aanwezigheid van exogeen uracil. Daarnaast is wild type *C. sporogenes* dat *pyrE* tot expressie brengt, gevoelig voor 5-fluoro-orotaat (FOA). Aangezien de bacterie niet zal groeien in aanwezigheid van FOA, kan FOA als selectiemarker voor *pyrE* KO mutanten gebruikt worden.

De 7 NTR varianten verschillen in capaciteit om een niet-toxische 'prodrug' om te zetten en zijn van prokaryote oorsprong (*E. coli*, *H. influenza*, *N. meningitidis*, *Bacillus* spp. en *Vibrio* spp.) en

synthetisch aangepast waarbij de codons zoveel mogelijk lijken op de codons aanwezig in *C. sporogenes*.

4. Eerdere COGEM adviezen

Eind 2011 heeft de COGEM geadviseerd over de classificatie van (a)pathogene bacteriën.^{33,34} Daarbij zijn 61 *Clostridium* soorten geclassificeerd als klasse 2 pathogeen, waaronder *C. sporogenes*.³⁴ Alleen de soorten *C. butyricum* en *C. phytofermentans* zijn geclassificeerd als een klasse 1 pathogeen.^{33,35,36}

De COGEM is van mening dat, gezien het feit dat *C. butyricum* gebruikt wordt als probioticum en er van de soort een beperkt aantal ziektegevallen is gerapporteerd die gekoppeld zijn aan een onderliggende oorzaak, de bacterie een opportunistisch pathogeen is.³⁵ Op grond van gegevens uit de wetenschappelijke literatuur, de fylogenetische stambomen en de vergelijking met indelingen in het buitenland, is de COGEM van mening dat *C. phytofermentans* eveneens beschouwd kan worden als apathogeen.³⁶

5. Risicosclassificatie van *C. sporogenes* door andere landen

Volgens de Europese ARBO regelgeving (2000/54/EG 'Bescherming van werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk') zijn alle *Clostridium* soorten geclassificeerd als een klasse 2 pathogeen.³⁷ Volgens de 'Belgian Biosafety Server' is *C. sporogenes* geclassificeerd als een klasse 2 humaan en dierpathogeen.³⁸ De 'Technische Regeln für Arbeitsstoffe' (TRBA) en de 'Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit' (ZKBS) in Duitsland hebben *C. sporogenes* geclassificeerd als een micro-organisme van risicogroep 2.^{39,40} Zwitserland en Japan hebben *C. sporogenes* eveneens geclassificeerd als een micro-organisme van risicogroep 2.⁴¹ De 'American Biological Safety Association' (ABSA) beschouwt *C. sporogenes* als een humaan pathogeen van klasse 2 en niet ziekteverwekkend voor planten en dieren.⁴¹ De 'American Type Culture Collection' (ATCC) heeft werkzaamheden met 26 *C. sporogenes* isolaten, waaronder ATCC 3584, geclassificeerd onder biosafetyniveau 1 (BSL1), het laagste risiconiveau.⁴² Werkzaamheden met één *C. sporogenes* isolaat heeft zij geclassificeerd onder BSL2 (ATCC 9690). De 'National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria' (NICMB, Schotland) classificeert haar *C. sporogenes* isolaten, waaronder ATCC 3584 (NCIMB 10596) in de laagste risicogroep.⁴³

6. Overweging en advies

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 bacteriën weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden. Een lange gedocumenteerde historie van veilig gebruik, waarbij geen nadelige effecten zijn gerapporteerd, vormt in dit opzicht een belangrijk referentiekader voor apathogeniteit. Als kanttekening moet hierbij opgemerkt worden dat effecten mogelijkerwijs moeilijk worden opgemerkt als zij niet erg uitgesproken van aard zijn en er niet gericht naar wordt

gezocht. Anderzijds zijn veruit de meeste micro-organismen apathogeen. Daarom worden micro-organismen bij afwezigheid van expliciete aanwijzingen voor pathogeniteit bij langdurig gebruik als apathogeen beschouwd.

C. sporogenes is alom tegenwoordig in het milieu. De bacterie koloniseert het maagdarmkanaal van mens en dier. Sporadisch zijn bij gezonde mensen infecties met *C. sporogenes* beschreven. Invasieve infecties komen voor bij ernstige chirurgische complicaties of bij immuungecompromitteerden en zijn door middel van antimicrobiële therapie goed te behandelen.

C. sporogenes wordt internationaal gezien als een micro-organisme behorende tot risicogroep 2. De bacterie is pathogeen voor konijnen. *In vivo* studies laten zien dat konijnen en hamsters gevoelig zijn voor een door *C. sporogenes* geproduceerd toxine. Het betreft een hemolytisch toxine dat bloedingen in de slijmvliesen van het maag/darmkanaal kan veroorzaken. Ziekteverschijnselen variëren van mild en voorbijgaande aard (hamsters) tot zeer ernstig (konijnen). Het betreffende toxine zou het door *C. sporogenes* geproduceerde toxine clostridiolysine S kunnen zijn. *In vivo* studies met *C. sporogenes* ATCC 13732 bij de mens hebben lichte ziekteverschijnselen van voorbijgaande aard laten zien.

Gezien het bovenstaande, ziet de COGEM geen reden haar advies van 2011 te herzien. Zij is van mening dat pathogeniteitsklasse 2 voor *C. sporogenes* het meest passend is.

De COGEM is specifiek gevraagd of *C. sporogenes* ATCC 3584 beschouwd kan worden als een klasse 1 pathogeen. *In vivo* studies met *C. sporogenes* ATCC 3584 bij muizen hebben geen ziekteverschijnselen laten zien. De COGEM is niet bekend met humane *in vivo* studies met ATCC stam 3584. Er zijn geen aanwijzingen dat in ATCC 3584 (fragmenten van) het genencluster coderend voor het botulismetoxine of het *C. perfringens* toxine aanwezig is, maar het is de COGEM niet bekend of en in welke mate de stam andersoortige toxines zoals het clostridiolysine S tot expressie brengt. Omdat de COGEM niet over voldoende gegevens beschikt om te kunnen stellen dat *C. sporogenes* ATCC 3584 niet pathogeen is, adviseert zij de stam in te delen in pathogeniteitsklasse 2.

Bij de voorgenomen werkzaamheden zal gebruik gemaakt worden van *C. sporogenes* ATCC 3584 *pyrE* KO mutanten die niet in staat zijn uracil te synthetiseren. Zij kunnen alleen groeien in de aanwezigheid van exogeen uracil. Daarnaast zijn in de bacterie NTR genen van andere prokaryoten ingebracht. De COGEM is van mening dat beide aangebrachte mutaties niet van invloed zijn op het pathogene karakter van de bacterie. Het is haar echter niet bekend in welke mate de uitschakeling van het *pyrE* gen het verspreidingspotentieel van de bacteriestam beperkt. Voornoemde argumenten in overweging nemende, acht de COGEM de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein indien de voorgenomen werkzaamheden met gg *C. sporogenes* plaatsvinden op ML-II en DM-II inperkingsniveau.

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. Rutala WA *et al.* (1993). Sporicidal activity of chemical sterilants used in hospitals. Infection Control and Hospital Epidemiology. 14(12): 713-718
4. 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)
5. Minton NP *et al.* (1995). Chemotherapeutic tumour targeting using clostridial spores. FEMS Microbiological Reviews. 17: 357-364
6. Dang LH *et al.* (2001). Combination bacteriolytic therapy for the treatment of experimental tumors. Proc Natl Acad Sci USA 98: 15155-15160
7. Liu S-C *et al.* (2002). Anticancer efficacy of systemically delivered anaerobic bacteria as gene therapy vectors targeting tumor hypoxia/necrosis. Gene Therapy 9: 291-296
8. Theys J *et al.* (2006). Repeated cycles of *Clostridium*-directed enzyme pro-drug therapy result in sustained antitumour effects *in vivo*. British Journal of Cancer 95: 1212-1219
9. 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(19): 7995-8003
10. 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
11. Kitamura S *et al.* (1997). The role of mammalian intestinal bacteria in the reductive metabolism of zonisamide. J Pharm Pharmacol 49(3): 253-256
12. 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
13. 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
14. Collins MD & East AK (1998). Phylogeny and taxonomy of the foodborne pathogen *Clostridium botulinum* and its neurotoxins. Review. J of Applied Microbiol 84: 5-17
15. Genoom sequentie projecten *C. sporogenes* ATCC 15579 en ATCC PA 3679: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=clostridium+sporogenes>
16. Bradbury M *et al.* (2012). Draft genome sequence of *Clostridium sporogenes* PA 3679, the common nontoxigenic surrogate for proteolytic *Clostridium botulinum*. J Bacteriol 194(6): 1631-1632
17. 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

18. Gonzalez DJ *et al.* (2010). Clostridiolysin S: a post-translationally modified biotoxin from *Clostridium botulinum*. J Biol Chem 285(36): 28220-28228
19. Hara Y *et al.* (1991). Isolation of enterotoxin-producing *Clostridium sporogenes* from cefmetazole-associated diarrheic rabbit. J Vet Med Sci 53(3): 531-532
20. Hara-Kudo Y *et al.* (1997). Effect of hemorrhagic toxin produced by *Clostridium sporogenes* on rabbit ligated intestinal loop. Microb Pathog 22(1): 31-38
21. 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
22. Marrie TJ *et al.* (1978). Pseudomembranous colitis: isolation of two species of cytotoxic clostridia and successful treatment with vancomycin. CMA Journal 119: 1058-1060
23. Schallehn G & Wolff MH (1988). Morphologische Veränderungen humaner embryonaler Lungenfibroblasten durch Cytotoxine verschiedener *Clostridium* Spezies. Zbl Bakt Hyg A 267: 367-378
24. Bodey GP *et al.* (1991). Clostridial bacteremia in cancer patients. A 12-year experience. Cancer 67: 1928-1942
25. Wijnker JJ *et al.* (2011). Reduction of *Clostridium sporogenes* spore outgrowth in natural sausage casings using nisin. Food Microbiology 28: 974-979
26. Montville TJ *et al.* (1985). Influence of pH on organic acid production by *Clostridium sporogenes* in test tube and fermentor cultures. App Envir Microbiol 49(4): 733-736
27. <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=3584&Template=bacteria>
28. Olsen I *et al.* (1995). Rejection of *Clostridium putrificium* and conservation of *Clostridium botulinum* and *Clostridium sporogenes*. Request for an opinion. Int J of Syst Bacteriol 45(2): 414
29. 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 of Syst Bacteriol 49: 339
30. 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(1): 389-392
31. 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
32. Integrale versie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen en het Besluit genetisch gemodificeerde organismen. Mei 2004
33. COGEM (2011). Classificatie van apathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-02
34. COGEM (2011). Classificatie van pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/111220-03
35. COGEM (2007). Classificatie van enkele micro-organismen van bijlage 1 van de Regeling ggo. COGEM advies CGM/070917-02
36. COGEM (2008). Classificatie van genetisch gemodificeerde *Clostridium phytofermentans*. COGEM advies CGM/081112-01

37. Europese ARBO regelgeving. 2000/54/EG 'Bescherming van werknemers tegen de risico's van blootstelling aan biologische agentia op het werk'. Website bezoek november 2012.
<http://www.kiza.nl/node/1869>
38. Belgian biosafetyserver. Website bezoek november 2012.
<http://www.biosafety.be/RA/Class/ClassBEL.html>
39. Technische Regeln für Arbeitsstoffe. Website bezoek november 2012.
http://www.baua.de/de/Themen-von-A-Z/Biologische-Arbeitsstoffe/TRBA/pdf/TRBA-466.pdf;jsessionid=B3D20B7ACAFAEF891A824F1B4929D8C9.2_cid137?_blob=publicationFile&v=4
40. Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit. Website bezoek november 2012
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/register_datenbanken/organismenliste.pdf?__blob=publicationFile&v=4
41. American Biosafety Association. Website bezoek november 2012
<http://www.absa.org/riskgroups/bacteriasearch.php?genus=clostridium&species=sporogenes>
42. American Type Culture Collection. Website bezoek november 2012
<http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAdvancedCatalogueSearch/AllCollectionSearch/tabid/1069/Default.aspx>
43. National Collections of Industrial, Marine and Food Bacteria. Website bezoek november 2012
http://www.bvl.bund.de/SharedDocs/Downloads/06_Gentechnik/register_datenbanken/organismenliste.pdf?__blob=publicationFile&v=4