

Aan de minister van  
Volkshuisvesting, Ruimtelijke  
Ordening en Milieubeheer  
Mevrouw dr. J.M. Cramer  
Postbus 30945  
2500 GX Den Haag

**DATUM** 29 maart 2007  
**KENMERK** CGM/070402-05  
**ONDERWERP** Advies Inschaling vaccinatie van makaken met genetisch gemodificeerde *M. bovis* BCG  
(IG 03-077-04)

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag over de vergunningaanvraag “Inschaling van vaccinatie van makaken met de genetisch gemodificeerde *Mycobacterium bovis* stam “Calmette-Guérin” van de stichting Biomedical Primate Research Centre, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met de genetisch gemodificeerde (gg-) bacterie *Mycobacterium bovis* stam Calmette-Guérin (BCG). De aanvrager dient een verzoek in voor omlaagschaling van de vaccinatiewerkzaamheden van makaken met gg-BCG.

*Mycobacterium bovis* BCG is sterk geattenuëerd en wordt als vaccin jaarlijks aan 120 miljoen mensen toegediend. Vandaag de dag zijn al meer dan 3 miljard mensen gevaccineerd. Hoewel de bacterie levend toegediend wordt, kan het BCG vaccin beschouwd worden als een van de veiligste vaccins.

De gg-BCG stammen zijn sterk geattenuëerd ten opzichte van het wildtype BCG. Het wildtype BCG kan worden overgedragen via voedsel en via wondjes op de plaats van injectie. Overdracht van het wildtype BCG via aerosolen is nog nooit waargenomen. Het BCG geassocieerde ziektebeeld manifesteert zich bovendien in het tussenliggende weefsel en niet in weefsel dat in open contact staat met de lucht. De kans op verspreiding van gg-BCG via transmissie door de lucht, wordt door de COGEM verwaarloosbaar klein geacht.

Omdat aerosole overdracht van BCG nog nooit is waargenomen en gezien de geringe pathogeniteit van de gg-BCG stammen AFR-01 en rBCG: $\Delta$ ureC::hly+, is de COGEM van mening dat de voorgenomen werkzaamheden op ML-I / DM-I niveau kunnen plaatsvinden, zonder dat de veiligheid voor mens en milieu in het geding komt.

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 large, stylized loop followed by a horizontal line and a small dash.

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

c.c. Dr. ir. B.P. Loos  
Dr. I. van der Leij

# **Inschaling van vaccinatie van makaken met de genetisch gemodificeerde *Mycobacterium bovis* stam Calmette-Guérin**

**COGEM advies CGM/070402-05**

## **Inleiding**

De COGEM is gevraagd te adviseren over handelingen met de genetisch gemodificeerde (gg-) bacterie *Mycobacterium bovis* stam Calmette-Guérin (BCG). De wildtype BCG vaccinstam tegen tuberculose (tbc) is ontwikkeld in 1920 en wordt sindsdien aan miljoenen mensen (voornamelijk kinderen) toegediend. BCG is zeer effectief tegen een aantal ernstige vormen van tbc. Het vaccin beschermt echter onvoldoende tegen *Mycobacterium tuberculosis* stammen die pulmonaire tuberculose oftewel longtuberculose veroorzaken wat voornamelijk bij volwassenen voorkomt. Daarom is de immunogeniteit van BCG verhoogd door middel van genetische modificatie. Hierdoor zijn twee recombinante BCG stammen verkregen (AFR-01 en rBCG: $\Delta$ ureC::hly<sup>+</sup>).

De aanvrager beschikt over een vergunning om rhesusapen (makaken) te vaccineren met de recombinante vaccinstammen onder inperkingsniveau DM-III. Werkzaamheden met cellen en weefsel afkomstig van deze dieren zijn vergund onder ML-III niveau. De aanvrager dient nu een aanvraag in voor omlaagschaling van de inperkingsniveaus.

## *BCG*

De bacterie BCG is in 1920 voor het eerst toegepast en wordt vanaf de jaren vijftig wereldwijd toegediend als vaccin tegen tbc (1). Tbc is een ziekte die voornamelijk veroorzaakt wordt door *M. tuberculosis* en die vooral de longen aantast. Daarnaast kunnen ook andere organen aangetast worden. Momenteel wordt het BCG vaccin jaarlijks aan 120 miljoen mensen toegediend en zijn al meer dan 3 miljard mensen gevaccineerd (5, 6). Hoewel de bacterie levend toegediend wordt, kan het *Mycobacterium bovis* BCG vaccin beschouwd worden als een van de veiligste vaccins (2).

Uit onderzoek blijkt dat het vaccin maximaal 80% bescherming tegen longtuberculose biedt (1). Ondanks vaccinatie tegen de ziekte, sterven momenteel naar schatting 2 miljoen mensen per jaar (1,2). Daarom tracht men nieuwe tuberculosevaccins te ontwikkelen die een betere bescherming bieden.

BCG is een deletiemutant van *M. bovis* en spontaan ontstaan tijdens jarenlange kweekwerkzaamheden aan het begin van de vorige eeuw (1,2). *M. bovis* heeft een breed gastheerbereik, maar is voornamelijk pathogeen voor zoogdieren. Ook mensen kunnen geïnfecteerd raken met de bacterie. Overdracht van de bacterie *M. bovis* vindt plaats via

voedsel, aerosolen of, en dit komt minder frequent voor, via contact met wondjes (9). Een infectie met *M. bovis* kan tuberculose in vee veroorzaken, terwijl andere dieren een chronische luchtweginfectie kunnen ontwikkelen. Ook de mens kan tuberculose ontwikkelen na infectie met *M. bovis*. Tuberculose is met de juiste medicijnen en behandeling volledig te genezen (12). In de geïndustrialiseerde landen blijkt 0,5-7,2% van de tuberculose gevallen door *M. bovis* veroorzaakte te worden (3). Het grootste gedeelte van de tuberculose gevallen wordt echter veroorzaakt door *M. tuberculosis*.

BCG wijkt wat pathogeniteit betreft sterk af van *M. bovis*. In tegenstelling tot het pathogene karakter van *M. bovis*, is BCG door de vele mutaties sterk verzwakt (geattenuerd) en kan daarom worden aangemerkt als laagpathogeen (1). Daarnaast is aërosol overdracht van BCG nog nooit aangetoond. De veiligheid van het BCG vaccin heeft zich bovendien bewezen na tientallen jaren van succesvol gebruik als vaccin tegen tuberculose. Kinderen worden daarom in een groot deel van de wereld al op zeer jonge leeftijd ingeënt. Sinds kort lijken er echter aanwijzingen te zijn dat kinderen met een ernstige immunodeficiëntie en kinderen geïnfecteerd met het *Human immunodeficiency virus* (HIV), een verhoogde kans hebben op een ernstige lymfeklierontsteking als gevolg van de BCG bacterie (4,5). De WHO raadt dan ook af om kinderen waarbij HIV-infectie is vastgesteld te vaccineren met BCG (6).

### **Adviesvraag**

Zoals aangegeven, biedt het huidige BCG vaccin onvoldoende bescherming tegen tuberculose. Zodoende zijn enkele gg-BCG stammen ontwikkeld die een verhoogde immuniteit teweeg brengen.

De aanvrager werkt met de gg-BCG stammen AFR-01 en gg-BCG: $\Delta$ ureC::hly<sup>+</sup>. Beide stammen zijn zogenaamde “endosomal escape” varianten die een sterkere MHC klasse I antigeen presentatie van mycobacterium antigenen hebben en daardoor een betere immunogene werking bezitten.

De genetische modificatie van BCG is reeds vergund. De aanvrager heeft daarnaast een vergunning voor het uitvoeren van kweekwerkzaamheden en in vitro assays met de vaccinstammen onder inperkingsniveau ML-II zonder aanvullende voorschriften. Verder worden makaken gevaccineerd met één van beide vaccinstammen waarna een “challenge” experiment plaatsvindt met wildtype *M. tuberculosis* om de effectiviteit van het vaccin te onderzoeken. Ook deze handelingen zijn reeds vergund en vinden plaats op DM-III niveau met aanvullende voorschriften.

De aanvrager verzoekt nu om de vaccinatie-experimenten (de challenge-experimenten, worden onder DM-III uitgevoerd) van de makaken met de gg-BCG stammen te laten plaatsvinden onder DM-I. Hij onderbouwt deze inschaling ten eerste met het besluit van

de Britse en Duitse autoriteiten omtrent gg-BCG om de werkzaamheden met de gg-BCG stammen omlaag te schalen naar respectievelijk een DM-II en DM-I klasse. Ten tweede is de aanvrager van mening dat gg-BCG minder virulent is dan het wildtype BCG.

Bureau GGO stelt voor de werkzaamheden in te schalen op DM-II niveau met inachtneming van de volgende aanvullende voorschriften:

- Het dragen van een veiligheidsbril en mond- en neuskapje is verplicht.
- Het dragen van handschoenen is verplicht.

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling en de aanvullende voorschriften van de werkzaamheden met de rBCG stammen AFR-01 en rBCG: $\Delta$ ureC::hly<sup>+</sup>.

### **Overwegingen en advies**

Hieronder gaat de COGEM in op de verschillende aspecten van de risicobeoordeling. Ten eerste wordt de pathogeniteit van het genetisch gemodificeerde organisme (ggo) behandeld. Vervolgens wordt ingegaan op de mogelijkheden en risico's van verspreiding en overdracht van het ggo.

#### *Pathogeniteit ggo*

Gezien het langdurige en wereldwijd verspreide gebruik van de vaccinstam acht de COGEM de veiligheid van BCG voldoende aangetoond. Jaarlijks worden miljoenen kinderen gevaccineerd met deze verzwakte vorm van *M. bovis*. Bij de COGEM is geen literatuur bekend waarin nadelige effecten van de BCG vaccinatie bij gezonde mensen wordt gerapporteerd. Wel is bekend dat vaccinatie met het wildtype BCG kan leiden tot ziekte bij mensen (en voornamelijk kinderen) die immuungecompromiteerd zijn (5,6).

De aanvrager heeft aangegeven dat er zowel op basis van eigen ervaringen als in de literatuur over makaakmodellen, geen gevallen bekend zijn van pathogene effecten bij de apen ten gevolge van de wildtype BCG vaccinatie. Voor het onderzoek worden uitsluitend gezonde dieren gebruikt die niet HIV, i.c. *Simian immunodeficiency virus* (SIV) of *Simian-Human immunodeficiency virus* (SHIV) geïnfecteerd zijn. Het voorkomen van een genetisch defect bij de makaken waardoor een immuundeficiëntie optreedt, is echter theoretisch mogelijk.

De modificaties van de toegepaste gg-BCG stammen hebben de pathogeniteit nog sterker verlaagd. De recombinante BCG stammen zijn zogeheten “endosomal escape” varianten die een sterkere immuniserende werking hebben. De immuunrespons van beide gg-BCG varianten berust op hetzelfde werkingsmechanisme waarbij een endogeen cytolysine ervoor zorgt dat het ggo en de geproduceerde antigenen in het cytoplasma terecht komen waardoor een sterkere MHC klasse 1 antigeenpresentatie optreedt. Bovendien wordt de degradatie van de betreffende vaccinstam en de geprogrammeerde celdood van de

geïnfecteerde gastheercel (apoptose) hierdoor versterkt. In vivo studies met SCID muizen hebben aangetoond dat deze nieuwe gg-BCG stammen sterker geattenuëerd zijn dan de wildtype BCG stam (7). Doordat de gg-BCG stammen door de aangebrachte modificaties niet lang in de endosomen verkeren, maar vrij snel in het cytoplasma terechtkomen waarna celdood optreedt, hebben zij geen mogelijkheid om te persisteren.

#### *Overdraagbaarheid ggo*

In principe zijn *M. tuberculosis* en *M. bovis* stammen via aërosolen overdraagbaar. Overdracht van BCG via aërosolen is echter nog nooit waargenomen, ondanks het wijdverspreide gebruik van BCG als vaccin.

In een studie uit 1973 van Barclay *et al.* wordt een succesvolle vaccinatie van BCG bij apen door middel van aërosolen beschreven (10). In een andere studie van Chaparas *et al.* die twee jaar later is uitgevoerd, wordt dit echter bestreden (11). De eerste studie toont bovendien slechts aan dat opname van BCG door de longen eventueel mogelijk is. De BCG geassocieerde pathologie manifesteert zich doorgaans met abcesvorming, lymfeklierontsteking en disseminatie. Het gaat hier echter om kolonisatie aan de interstitiële zijde (in het tussenliggende weefsel) waarbij geen open contact met de lucht optreedt waardoor de kans op overdracht via aërosolen verwaarloosbaar klein is. De kans op het vrijkomen van de BCG bacterie uit de longen is derhalve zeer gering aangezien de makaken zelf een inperking vormen nadat zij gevaccineerd zijn.

Overdracht van het wildtype BCG vindt plaats via voedsel of, en dit komt minder frequent voor, via direct contact met wondjes op de plaats van injectie (3). Aangezien het in deze aanvraag werkzaamheden in laboratoria en dierverspreiden betreft, is voornamelijk het risico van wel of niet overdracht via aërosolen relevant.

Zowel bij BCG als bij gg-BCG is overdracht via aërosolen nog nooit waargenomen. Gezien de geschiedenis van veilig gebruik en het met BCG geassocieerde ziektebeeld acht de COGEM de kans op verspreiding van het ggo via transmissie door de lucht verwaarloosbaar klein.

#### *Inschaling van BCG in andere landen*

Overigens hebben andere landen de vaccinatiewerkzaamheden met rBCG onlangs omlaag geschaald. De ZKBS (Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit) concludeert in haar risicobeoordeling dat de vaccinstam rBCG: $\Delta$ ureC:: $hly^+$  sterker geattenuëerd is ten opzichte van de wildtype BCG stam, die al als laagpathogeen ingeschaald is. Zodoende wordt deze rBCG stam door de ZKBS ingeschaald in klasse DM-I / ML-I (9).

Uit een risicoanalyse van de Advisory Committee on Genetic Modification (ACGM) blijkt dat het onwaarschijnlijk is dat de modificaties in gg-BCG vaccinstam AFR-01 invloed hebben op het tropisme, het gastheerbereik of de gevoeligheid voor antibacteriële

drugs. De inserties leiden weliswaar tot een verhoogde immunogeniteit maar niet tot een verhoogde pathogeniteit ten opzichte van de wildtype BCG stam. ACGM concludeert uit haar risicobeoordeling dat AFR-01 kan worden ingeschaald als klasse 2 met een daaruitvolgende inschaling op DM-II / ML-II niveau (8).

## **Conclusie**

*Mycobacterium bovis* BCG is een verzwakte stam van de *M. bovis* stam en wordt al sinds 1920 toegepast als vaccin. Sindsdien zijn ruim 3 miljard mensen gevaccineerd met BCG en wordt het vaccin jaarlijks aan 120 miljoen mensen toegediend zonder rapportage van nadelige effecten.

De gg-BCG varianten in deze studie zijn sterker geattenuëerd ten opzichte van het wildtype BCG. Zodoende valt niet te verwachten dat er bij het werken met deze stam wel nadelige effecten zullen optreden.

BCG kan verspreid worden via voedsel of via direct contact met open wondjes op de plaats van injectie. Overdracht van BCG via aërosolen is nog nooit waargenomen en gezien het BCG geassocieerde pathologie ook niet te verwachten. Verdere verspreiding van BCG of van de onderhavige gg-BCG varianten onder de bevolking is daarmee uitgesloten.

De COGEM merkt op dat *M. bovis* weliswaar geclassificeerd is in pathogeniteitsklasse 3, maar dat BCG expliciet is vrijgesteld van deze pathogeniteitsindeling (13). Op basis van het geringe pathogene karakter van recombinante BCG en de beperkte mate van overdracht van het ggo, is de COGEM van mening dat ML-I en DM-I voldoende inperking bieden om veilig met de verzwakte vaccinstammen gg-BCG AFR-01 en rBCG: $\Delta$ ureC::hly<sup>+</sup> te werken.

De aanvrager voert vaccinatie experimenten uit met makaken, die onder meer het herpesvirus B bij zich kunnen dragen. Vanwege het risico op spatincidenten met besmette urine tijdens het uitvoeren van de experimenten, wijst de COGEM op de noodzaak van het dragen van een mond-neuskapje, evenals een veiligheidsbril en handschoenen.

## **Referenties**

- 1) Andersen, P., Doherty, M.; (2005). The success and failure of BCG-implications for a novel tuberculosis vaccine, *Nature*, vol. 3 (656-662)
- 2) Rook, G.A.W., Dheda, K., Zumla, A.; (2005). Immune responses to tuberculosis in developing countries: implications for new vaccines, *Nature*, vol. 5 (661-667)
- 3) De la Rua-Domenech, R.;(2006) Human *Mycobacterium bovis* infection in the united kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis, Elsevier, *Tuberculosis* vol. 86, 77-109.

- 4) LCI (2005); Protocol infectieziekten, HIV en AIDS / HIV infectie en AIDS bij kinderen, bijlage 1.
- 5) Hesselning, A. C., Marais, B.J., Gie, R.P. et al, (2007) The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV infected children, Elsevier, Vaccine 25 14-18.
- 6) Internet; [www.who.int](http://www.who.int); Safety of BCG vaccine in HIV infected children.
- 7) Grode, L. Seiler, P. Baumann, S.; (2005) Increased vaccine efficacy against tuberculosis of recombinant Mycobacterium bovis bacilli Calmette-Guérin mutants that secrete listeriolysin, Journal of clinical investigation, vol, 115, no. 9 september.
- 8) C. Entwisle, ACGM Risk assessment, 27/02/06; Preparation of investigational BCG vaccines from a recombinant Mycobacterium bovis (BCG) strain AFR-01
- 9) C. Dohmen, ZKBS, mei 2005; Stellungnahme der ZKBS zur risikoberwertung von Mycobacterium bovis BCG mit dem listeriolysin-gen aus Listeria monocytogenes.
- 10) Barclay WR, Busey WM, Dalgard DW, et al. (1973) Protection of monkeys against airborne tuberculosis by aerosol vaccination with bacilli Calmette,-Guérin. Am Rev Respir Dis; 107:351-8
- 11) Chaparas SD, Good RC, Janicki BW, (1975) Tuberculin-induced lymphocyte transformation and skin reactivity in monkey's vaccinated or not vaccinated with bacilli Calmette-Guérin, then challenged with virulent Mycobacterium tuberculosis. Am Rev Respir Dis; 112:43-7.
- 12) Internet; KNCV tuberculosefonds [www.tuberculose.nl](http://www.tuberculose.nl)
- 13) Europese richtlijn 93/88/EEG Directive on the protection of workers from risks related to exposure to biological agents at work.