

# **Inschaling van *in vitro* werkzaamheden met een *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant**

## **COGEM advies CGM/090212-01**

### **Inleiding**

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van *in vitro* werkzaamheden met een *Mycobacterium tuberculosis phoP* mutant. De aanvrager, het VU medisch Centrum, verzoekt deze werkzaamheden toe te voegen aan de bestaande vergunning IG 01-170 met de titel “Virulentie factoren van *Mycobacterium marinum*”.

De *M. tuberculosis phoP* mutant is afgeleid van wild type *M. tuberculosis* (MT103) en is vervaardigd door de introductie van een kanamycine resistentiegen in de coderende sequentie van *phoP*. Deze insertie resulteert in een zogenaamde ‘knock-out’ van het *phoP* gen, waardoor de mutant geen PhoP eiwit meer aan kan maken. Het PhoP is vermoedelijk betrokken bij de transcriptieregulatie van belangrijke virulentie genen. De aanvrager wil de interactie van de *M. tuberculosis phoP* mutant met onder andere dendritische cellen *in vitro* bestuderen.

### ***Mycobacterium tuberculosis***

De infectieuze ziekte tuberculose wordt veroorzaakt door bacteriën die behoren tot het zogenaamde ‘*Mycobacterium tuberculosis complex*’ (MTBC). Het complex bevat onder andere de drie nauw verwante mycobacteriën: *M. tuberculosis*, *M. bovis* en *M. africanum* (1). Deze mycobacteriën worden allen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.

*M. tuberculosis* is de belangrijkste oorzaak van tuberculose bij de mens. Tuberculose is een veel voorkomende ziekte, waaraan jaarlijks 1.7 miljoen mensen sterven (2). Besmetting vindt aërogeen plaats, waarna de infectie met de bacterie doorgaans symptomeloos verloopt. Slechts bij 10% van de geïnfecteerde mensen ontstaat gedurende hun leven de ziekte. Klassieke symptomen zijn een aanhoudende hoest, nachtzweeten, gewichtsverlies, koorts en moeheid. De bacterie kan na infectie latent aanwezig blijven in de mens.

Tuberculose is moeilijk te behandelen en vereist het gebruik van verschillende antibiotica. Een behandeling tegen tuberculose met antibiotica duurt meestal zes maanden (3). Wereldwijd wordt een geattenueerde stam van *M. bovis*, *M. bovis* ‘Bacille de Calmette et Guérin’ (BCG) gebruikt als redelijk effectief vaccin tegen tuberculose.

### **Eerder COGEM advies**

In 2007 heeft de COGEM advies uitgebracht over de inschaling van werkzaamheden met twee genetisch gemodificeerde *Mycobacterium bovis* BCG bacteriestammen (4). Ten opzichte

van het wildtype BCG zijn deze gg-BCG stammen sterk geattenuëerd en laten een geringe pathogeniteit zien. Aangezien de overdracht van BCG via aerosolen nog nooit is waargenomen, achtte de COGEM de kans dat de gg-BCG stammen via transmissie door de lucht verspreiden verwaarloosbaar klein. Derhalve adviseerde zij de werkzaamheden met de gg-BCG stammen op ML-I en DM-I uit te voeren.

## **Overweging**

### *Pathogeniteit van M. tuberculosis phoP mutant*

Door inactivatie van het *phoP* gen is de groei van de *M. tuberculosis phoP* mutant *in vitro* in muizenmacrofagen gereduceerd (5). Bovendien laat de mutant in immuno-gecompromitteerde SCID muizen een duidelijk gereduceerde virulentie zien ten opzichte van *wildtype M. tuberculosis* en de vaccinstam *M. bovis* BCG (6). Zowel na inhalatie als na intraveneuze toediening was de mutant niet lethaal voor de SCID muizen. Vergelijkbare doses van het *wildtype M. tuberculosis* (via aerosolen) of de vaccinstam *M. bovis* BCG (via intraveneuze toediening) resulteerde wel in sterfte van de SCID muizen. Op basis van deze gegevens is de COGEM van mening dat de *M. tuberculosis phoP* mutant een lagere pathogeniteit heeft dan *wildtype M. tuberculosis*. Zij merkt hierbij echter op dat de studie in de SCID muizen zich beperkt tot 245 dagen. Het blijft hierdoor onduidelijk of morbiditeit en mortaliteit als gevolg van een infectie met de *M. tuberculosis phoP* mutant ook na deze termijn afwezig blijft.

Kanamycine wordt gebruikt als een tweedelijns antituberculosemiddel (7). Door de aanwezigheid van de kanamycine resistentie vervalt deze behandelmogelijkheid bij een mogelijke infectie met de *M. tuberculosis phoP* mutant. Gezien de attenuatie van de betreffende mutant, de beschikbaarheid van eerstelijns antituberculosemiddelen als isoniazide en rifampicine en andere typen tweedelijns antituberculosemiddelen zoals capreomycine, moxifloxacin of ethionamide (7), is de COGEM van mening dat een mogelijke infectie met de *M. tuberculosis phoP* mutant goed te behandelen is. Zij wijst daarbij echter op het belang van het waarborgen van de toepasbaarheid van deze andere antituberculosemiddelen.

In de richtlijn: "preventie van besmetting met tuberculose in ziekenhuizen" heeft de Werkgroep Infectie Preventie aanbevolen medewerkers die met *M. tuberculosis* werken jaarlijks op besmettingen te controleren (8). Met het oog op de algemene hygiëne acht de COGEM het wenselijk dat ook de medewerkers die met *M. tuberculosis phoP* werken eens per jaar worden gecontroleerd op een tuberculose besmetting.

### *Stabiliteit van de mutatie*

Door de introductie van het kanamycine resistentiegen is het *phoP* gen in de *M. tuberculosis phoP* mutant onderbroken en komt het niet meer tot expressie. Het gehele *phoP* gen is echter nog wel in het genoom van deze mutant aanwezig en zou theoretisch gezien weer hersteld kunnen worden. Dit vereist een nauwkeurige deletie van het geïntroduceerde kanamycine

resistentiegen. Door een dergelijke theoretische gebeurtenis kan de virulente wildtype *M. tuberculosis* stam weer ontstaan. Een dergelijke reversie is echter tot op heden niet gerapporteerd.

De aanvrager heeft aangegeven dat er in het DNA van de mutant geen homologe gebieden aanwezig zijn rond de ingebrachte expressiecassette voor de kanamycine resistentie. Een dergelijke homologie is noodzakelijk om een recombinatie op relatief efficiënte wijze mogelijk te maken. Door de afwezigheid van homologie acht hij de kans dat de kanamycine resistentie cassette uit het genoom van de mutant recombineert extreem laag. De COGEM onderschrijft deze argumenten en acht de kans zeer klein dat de kanamycine resistentie cassette door recombinatie uit het genoom van de mutant wordt verwijderd en dat daarbij het *phoP* gen wordt hersteld. Bovendien wordt *M. tuberculosis* beschouwd als een genetisch zeer stabiel micro-organisme (9).

Om de kans op reversie van de mutant naar het wildtype nog verder te verkleinen acht de COGEM het van belang dat de mutant wordt opgegroeid onder kanamycineselectie. Door deze selectiedruk zullen mutanten zonder kanamycine resistentie niet overleven. Hierdoor is de COGEM van mening dat de kans op reversie verwaarloosbaar klein is.

### **Advies**

De gerapporteerde lage pathogeniteit van de *M. tuberculosis phoP* mutant in de bestudeerde tijdsspanne en de beperkte ervaring met de mutant in overweging nemende, adviseert de COGEM de *in vitro* werkzaamheden in te schalen op ML-II inperkingsniveau.

Gezien het aerogeen overdraagbare karakter van *M. tuberculosis*, de kanamycine resistentie van de mutant en de mogelijke reversie van de aangebrachte modificatie, adviseert de COGEM de volgende aanvullende voorschriften toe te voegen:

- open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse II
- de *M. tuberculosis phoP* mutant dient opgegroeid te worden onder kanamycine selectiedruk
- de te gebruiken *M. tuberculosis phoP* batch dient getest te zijn op de gevoeligheid voor ten minste één algemeen voorgeschreven eerstelijns antituberculosemiddel

Op ML-II inperkingsniveau en onder navolging van bovengenoemde aanvullende voorschriften, acht de COGEM de risico's van voorgenomen werkzaamheden met de *M. tuberculosis phoP* mutant voor mens en milieu verwaarloosbaar klein.

Uit oogpunt van de algemene hygiëne acht de COGEM het tevens raadzaam medewerkers die met *M. tuberculosis phoP* werken eens per jaar te controleren op een besmetting met tuberculose.

## Referenties

1. Soolingen van D. *et al.* (2006) Virulentie en overdraagbaarheid van resistente *Mycobacterium tuberculosis* Infectieziekten bulletin **17**: 435-440
2. Internet: WHO Report (2008) Global tuberculosis control (29-01-2009) [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/en/index.html)
3. Internet: CIB - Richtlijn Tuberculose (29-01-2009) <http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/tuberculose/index.jsp>
4. COGEM advies (2007) Inschaling van vaccinatie van makaken met de genetisch gemodificeerde *M. bovis* stam BCG. (CGM/070402-05)
5. Perez E *et al.* (2001) An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol. Microbiol.* **41**: 179-187
6. Martin C *et al.* (2006) The live *Mycobacterium tuberculosis phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. *Vaccine* **24**: 3408-3419
7. Jassal M en Bishai WR. (2009) Extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet* **9**: 19-29
8. Werkgroep Infectie Preventie. Preventie van besmetting met tuberculose in ziekenhuizen. (01-02-2009) [www.wip.nl/free\\_content/richtlijnen/1111tuberculose.pdf](http://www.wip.nl/free_content/richtlijnen/1111tuberculose.pdf)
9. Kapur V, Whittam TS en Musser JM. (1994) Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 years old? *J. Infect. Dis.* **170**: 1348-1349