



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

DATUM 17 maart 2009
KENMERK CGM/090317-03
ADVIES Inschaling van werkzaamheden met vaccinstam *Bacillus anthracis* Sterne

Geachte mevrouw Cramer,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende de vergunningaanvraag IG 09-009 met de titel 'Regulatie van vetzuur- en lipidebiosynthese in de vaccinstam *Bacillus anthracis* 'Sterne'' van het Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met de *Bacillus anthracis* vaccinstam Sterne. De aanvrager wil in deze stam het delta-5-desaturase gen inactiveren, dat betrokken is bij vetzuursynthese.

De sporen van de bacterie *B. anthracis* kunnen miltvuur of antrax bij dieren en de mens veroorzaken, waarbij infectie van de huid, het maag-darmkanaal en de longen mogelijk is. Respiratoire antrax kan tot de dood leiden binnen drie dagen. Antrax is niet overdraagbaar van mens op mens. Wereldwijd heeft vaccinatie tot een grote daling geleid van antrax bij mensen en dieren.

De virulentie van de bacterie wordt bepaald door de productie van toxines en het kapsel. Vaccinstam Sterne mist het plasmide waarop de kapselgenen liggen, waardoor het kapsel niet gevormd wordt. Deze stam wordt hierdoor efficiënt opgeruimd door het immuunsysteem, en kan normaliter niet tot ziekte leiden.

De COGEM is van mening dat de inactivatie van delta-5-desaturase geen invloed zal hebben op de pathogeniteit van de Sterne stam. Vanwege het verlies van het kapsel, alsmede de historie van veilig gebruik van de Sterne stam bij de productie van vaccins en de vaccinatie van vee, acht de COGEM de Sterne stam duidelijk geattenuerd. Met het hanteren van inperkingsniveau ML-II met aanvullende voorwaarden ter voorkoming van contact met en inademing van *B. anthracis* Sterne sporen, acht de COGEM de kans op risico's bij de genoemde werkzaamheden verwaarloosbaar klein.

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 loop on the left and a long horizontal stroke extending to the right.

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

c.c. Drs. H.P. de Wijs
Dr. I. van der Leij

Inschaling van werkzaamheden met vaccinstam *Bacillus anthracis* Sterne

COGEM advies CGM/090317-03

Inleiding

De COGEM is verzocht te adviseren over een vergunningaanvraag getiteld 'Regulatie van vetzuur- en lipidebiosynthese in de vaccinstam *Bacillus anthracis* 'Sterne'' van het Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR. In het kader van hun onderzoek naar vetzuur- en lipidebiosynthese wil de aanvrager de productie van onverzadigde vetzuren onderzoeken in *B. anthracis* Sterne door middel van inactivatie van een desaturase. Het inactiveren van het delta-5-desaturase gen van *B. anthracis* Sterne zal met behulp van de pMAD vector gebeuren. In Nederland is een *B. anthracis* stam nog niet eerder genetisch gemodificeerd.

Bacillus anthracis

Miltvuur, of antrax, wordt veroorzaakt door de bacterie *B. anthracis*. Het genus *Bacillus* bevat bacteriën die aeroob zijn en endosporen kunnen vormen (1). Deze sporen zijn zeer resistent tegen extreme omstandigheden en kunnen tientallen jaren in de bodem overleven. De sporen ontwikkelen zich tot de bacterie als ze in contact komen met nutriënten, water en een stressfactor zoals hitte, pH, of mechanische stress (1).

Wildtype *B. anthracis* bevat twee plasmiden die onder andere coderen voor virulentiefactoren. Het plasmide pXO1 codeert voor drie toxine-eiwitten ('protective antigen', 'edema factor', en 'lethal factor') (2). Deze drie eiwitten vormen samen twee toxinecomplexen ('lethal toxin' en 'edema toxin'), die verantwoordelijk zijn voor de symptomen van antrax (1). Het andere plasmide, pXO2, codeert voor de kapseleiwitten. Het kapsel remt opname en afbraak van de bacterie door macrofagen (1). De ziekte kan alleen ontstaan bij volledige virulentie, dus als zowel het kapsel als beide toxinecomplexen aanwezig zijn (1).

Antrax komt voornamelijk voor bij herbivoren. Vee wordt veelal door sporen in de bodem besmet. Mensen kunnen besmet worden door direct of indirect contact met besmette dieren, kadavers of dierlijke materialen. Bij de COGEM zijn geen gegevens bekend over transmissie van de bacterie van mens op mens of besmetting van mensen in laboratoria. Dit wordt ook door de WHO aangegeven (3).

Wildtype *B. anthracis* wordt in de Regeling GGO ingeschaald in pathogeniteitsklasse 2. Het ARBO-besluit hanteert voor *B. anthracis* een klasse 3 inschaling.

De ziekte antrax

Er zijn drie vormen van antrax: cutane, gastro-intestinale en respiratoire antrax, die allen potentieel dodelijk zijn zonder behandeling (3). Meer dan 95% van de gevallen van infectie met *B. anthracis* zijn infecties van wondjes in de huid, die resulteren in cutane antrax (3, 4). Cutane antrax is meestal zelf-limiterend (3). Behandeling met antibiotica voorkomt verspreiding naar andere organen.

Ingestie van sporen kan leiden tot infectie van een beschadiging in het maag-darmkanaal, wat resulteert in gastro-intestinale antrax. Gastro-intestinale antrax komt zelden voor (4), maar is vaak dodelijk (1). Behandeling met antibiotica in de vroege stadia van gastro-intestinale antrax kan tot genezing leiden.

Respiratoire antrax wordt verkregen na inhalatie van *B. anthracis* sporen. De symptomen zijn eerst griepachtig, waarna een dramatische verslechtering plaatsvindt. Een persoon met respiratoire antrax zal doorgaans zonder behandeling binnen drie dagen na de aanvang van de eerste symptomen doodgaan (1). Behandeling van respiratoire antrax met antibiotica in de vroege stadia van de ziekte kan tot genezing leiden.

Vaccinatie van vee tegen de ziekte heeft wereldwijd tot een grote reductie in het aantal gevallen van antrax bij mens en dier geleid (3).

Overweging

Attenuering van vaccinstam Sterne

Het eerste geattenueerde levende sporenvaccin van *B. anthracis*, de Sterne stam genoemd, werd geïsoleerd in 1937 (5). Deze stam is wel toxisch maar kapselloos, omdat de stam het plasmide pXO2 mist. Het kapsel is essentieel voor de verspreiding van de bacterie vanaf de infectieplaats en voor virulentie in muizen met respiratoire antrax (6). De toxines worden nog wel geproduceerd, waardoor de stam niet compleet avirulent is. Sterne wordt echter snel opgeruimd door het immuunsysteem, waardoor de stam normaliter geen ziekte veroorzaakt.

Reversie van Sterne naar wildtype *B. anthracis* is theoretisch mogelijk door opname van pXO2 afkomstig van een wildtype bacterie of van een geattenueerde stam die nog wel een kapsel vormt. Sinds de isolatie in 1937 zijn er echter geen gevallen van reversie gerapporteerd (2).

De Sterne stam wordt sinds zijn isolatie wereldwijd gebruikt om vee te vaccineren, en is tegenwoordig de meest gebruikte stam hiervoor (2, 3). In onder andere Australië, Groot-Brittannië, Verenigde Staten, China en Nederland (3) wordt een levende sporensuspensie van Sterne geproduceerd voor onderhuidse inoculatie bij dieren. Het

vaccin blijkt nog licht virulent te zijn in bepaalde diersoorten zoals geiten (3) en lama's (3).

Indien er onverhoeds contact of inoculatie is van iemand met het vaccin tijdens vaccinatie van vee, wordt in veterinaire handleidingen aangeraden de plek uit te knippen en de wond te wassen met water en zeep (7). In het CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Verenigde Staten) wordt met Sterne gewerkt als 'category 2 organism', met aanvullende voorzorgsmaatregelen zoals het gebruik van labjassen, handschoenen en een veiligheidskabinet. Er zijn geen voorvallen gerapporteerd van antrax bij mensen veroorzaakt door de Sterne stam (2). De COGEM concludeert dat de Sterne stam een lange historie van veilig gebruik door laboranten en dierenartsen kent.

Vanwege de verminderde virulentie door verlies van het kapsel, evenals de historie van veilig gebruik door laboranten en dierenartsen, is de COGEM van mening dat het vermogen van de Sterne stam om antrax te veroorzaken sterk gereduceerd is.

Genetisch gemodificeerde B. anthracis Sterne

De aanvrager is van plan het delta-5-desaturase gen van *B. anthracis* Sterne te inactiveren. Dit gen is betrokken bij de productie van onverzadigde vetzuren. Sterne wordt hiervoor getransformeerd met de pMAD vector met daarin delen van het gen rondom een antibioticum resistentie gen tegen spectinomycine (*spc*) (8). Door middel van twee homologe-recombinatiestappen integreert het plasmide in het genoom, waarna het grootste gedeelte van de vector er weer uit recombineert. Het resulterende organisme zal een delta-5-desaturase gen met een insertie van het *spc* gen hebben, waardoor het delta-5-desaturase geïnactiveerd wordt. Spectinomycine wordt niet gebruikt bij de behandeling van antrax. Daardoor zal de aanwezigheid van *spc* geen risico's bij de behandeling van antrax opleveren, mocht er onverwachts toch een infectie van Sterne plaatsvinden.

Delta-5-desaturase is geen virulentiefactor en inactivatie van het gen zal daarom naar verwachting geen gevolgen hebben voor de virulentie van Sterne. De COGEM acht het in lijn hiermee onwaarschijnlijk dat inactivatie van delta-5-desaturase een verhoging van de virulentie tot gevolg zal hebben.

Advies

Op basis van bovenstaande overwegingen, adviseert de COGEM de beschreven werkzaamheden met *B. anthracis* Sterne in te schalen op ML-II niveau. Met het oog op de cutane en respiratoire vormen van antrax worden de volgende aanvullende voorschriften geadviseerd, om de risico's voor mens en milieu nog verder te minimaliseren:

- Het dragen van handschoenen tot over de mouw van de werkkleding is verplicht;

- Open handelingen dienen in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd te worden.

De COGEM is van mening dat met het hanteren van het inperkingsniveau ML-II en de navolging van de aanvullende voorschriften, de risico's van de werkzaamheden met vaccinstam *B. anthracis* Sterne voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Bacterial morphology and cell wall structure and synthesis / *Bacillus* (2002) In: *Medical Microbiology*. Edited by: Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS en Pfaller MA. 11-24 / 240-244
2. Internet: US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention – Anthrax Sterne strain (34F2) of *Bacillus anthracis*. http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/anthraxsterne_gi.html (13-03-2009)
3. Turnbull PCB, Boehm R, Cosivi O, Doganay M, Hugh-Jones ME, Lalitha MK en Vos V de. (1998) Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals. WHO/EMC/ZDI/98.6. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
4. Hambleton P, Carman JA en Melling J. (1984) Anthrax: the disease in relation to vaccines. *Vaccine* **2**: 125-132
5. Sterne M. (1937) The effect of different carbon dioxide concentrations on the growth of virulent anthrax strains. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* **9**: 49-67
6. Drysdale M, Heninger S, Hutt J, Chen Y, Lyons CR en Koehler TM. (2005) Capsule synthesis by *Bacillus anthracis* is required for dissemination in murine inhalation anthrax. *The EMBO Journal* **24**: 221-227
7. Internet: Office International des Epizooties, Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals - Anthrax. http://www.oie.int/fr/normes/mmanual/a_00040.htm (13-03-2009)
8. Arnaud M, Chastanet A en Débarbouillé M. (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally non-transformable, low GC-content, gram-positive bacteria. *Appl. and Environ. Microbiol.* **70**: 6887-6891