

Aan de staatssecretaris van  
Infrastructuur en Waterstaat  
drs. V.L.W.A. Heijnen  
Postbus 20901  
2500 EX Den Haag

**DATUM** 14 maart 2022  
**KENMERK** CGM/220314-01  
**ONDERWERP** Advies pathogeniteitsclassificatie *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier getiteld 'Mycobacterium tuberculosis H37Ra' (IG 22-031\_2.13-000) van de Universiteit Leiden, deelt de COGEM u het volgende mee.

**Samenvatting:**

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. *M. tuberculosis* is de belangrijkste veroorzaker van tuberculose bij de mens.

*M. tuberculosis* H37Ra is een verzwakte laboratoriumstam en de tegenhanger van de virulente stam *M. tuberculosis* H37Rv. Beide stammen zijn afgeleid van een klinisch isolaat (H37) en worden sinds 1940 veelvuldig in laboratoria gebruikt om de virulentie van *M. tuberculosis* te bestuderen. De genomsequentie van H37Ra wijkt op meerdere posities af van de H37Rv-sequentie. Van tenminste drie van die posities is experimenteel aangetoond dat ze betrokken zijn bij de virulentie van *M. tuberculosis*. In muizen en cavia's is aangetoond dat *M. tuberculosis* H37Ra verzwakt is in vergelijking met de virulente H37Rv-stam.

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriestam *Mycobacterium tuberculosis* HR37Ra verzwakt is in vergelijking met de virulente H37Rv-stam. De COGEM adviseert om *M. tuberculosis* HR37Ra in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen op Bijlage 4 van de Regeling ggo.



De door de COGEM gehanteerde overwegingen en het hieruit voortvloeiende advies treft u hierbij aan als bijlage.

Hoogachtend,

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

# Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestam *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra

## COGEM advies CGM/220314-01

### 1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de pathogeniteitsklasse van de bacteriestam *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra en opname van deze stam op bijlage 4 van de Regeling ggo. Het verzoek is afkomstig van de Universiteit Leiden (IG 22-031). *Mycobacterium tuberculosis* staat op bijlage 4 als pathogeen micro-organisme van klasse 3 vermeld. De aanvrager geeft aan dat *M. tuberculosis* H37Ra een verzwakte stam betreft en levert ter onderbouwing literatuurgegevens aan.

### 2. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden in de Regeling ggo micro-organismen ingedeeld in vier pathogeniteitsklassen. Deze indeling start met pathogeniteitsklasse 1, die gevormd wordt door apathogene micro-organismen en loopt op tot pathogeniteitsklasse 4, de groep van hoog pathogene micro-organismen. Iedere pathogeniteitsklasse is gekoppeld aan een inperkingsniveau voor werkzaamheden met ggo's van die klasse.

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 micro-organismen weinig literatuur over apathogeniteit voorhanden.

Apathogene micro-organismen worden ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1. Dergelijke micro-organismen dienen minimaal aan één van de volgende criteria te voldoen:

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

Opportunistische pathogenen, die uitsluitend ziekte kunnen veroorzaken bij individuen met een verzwakt immuunsysteem of een onderliggend ziektebeeld, worden in de regel als niet-pathogeen beschouwd en kunnen, als aan één van de bovengenoemde voorwaarden van pathogeniteitsklasse 1 is voldaan, op Bijlage 2, lijst A1 van de Regeling ggo1 geplaatst worden.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 2 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ziekte kan veroorzaken, waarvan het onwaarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is, alsmede een micro-organisme dat bij planten een ziekte kan veroorzaken.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 3 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er een effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

Een indeling in pathogeniteitsklasse 4 is van toepassing op een micro-organisme dat bij mensen of dieren een zeer ernstige ziekte kan veroorzaken, waarvan het waarschijnlijk is dat het zich onder de populatie verspreidt, terwijl er geen effectieve profylaxe, behandeling of bestrijding toepasbaar is.

### **3. De soort *Mycobacterium tuberculosis***

De ziekte tuberculose wordt veroorzaakt door bacteriesoorten behorende tot het *Mycobacterium tuberculosis* soortencomplex. *M. tuberculosis* zelf is de belangrijkste oorzaak van tuberculose bij de mens. Tuberculose is een veel voorkomende ziekte, waaraan wereldwijd jaarlijks 1,5 miljoen mensen sterven.<sup>1</sup> Besmetting vindt aerogeen plaats<sup>2</sup>, waarna de infectie met de bacterie doorgaans asymptomatisch verloopt. Bij 5 tot 10% van de geïnfecteerde mensen ontwikkelt zich gedurende hun leven de ziekte tuberculose.<sup>1</sup> Klassieke symptomen zijn een aanhoudende hoest, nachtzweeten, gewichtsverlies, koorts en vermoeidheid. De bacterie kan na infectie latent aanwezig blijven. Tuberculose is moeilijk te behandelen en vereist het gebruik van een combinatie van verschillende antibiotica. De behandeling duurt meestal zes maanden. Wereldwijd wordt een geattenueerde stam van *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* 'Bacille de Calmette et Guérin' (BCG) gebruikt als vaccin tegen tuberculose.<sup>3</sup>

### **4. Bacteriestam *M. tuberculosis* H37Ra**

*M. tuberculosis* H37Ra is een avirulente laboratoriumstam en de tegenhanger van de virulente stam *M. tuberculosis* H37Rv. Beide stammen zijn afgeleid van een klinisch isolaat (H37) dat in 1905 uit een patiënt werd geïsoleerd en worden sinds 1940 veelvuldig in laboratoria gebruikt om *M. tuberculosis* te bestuderen.<sup>4</sup> De avirulente H37Ra-stam is geïsoleerd na kweek van de H37-bacillen op 'solid egg' medium waarbij geselecteerd werd op resistentie tegen lysis.<sup>5,6</sup> De morfologie van de H37Ra-kolonies is duidelijk verschillend van de virulente H37Rv stam.<sup>6,7,8</sup>

*M. tuberculosis* H37Ra is eenvoudig van virulente klinische isolaten te onderscheiden door twee cytochemische testen met 'neutral red' of 'Nile blue'.<sup>9</sup> Hitte-geïnactiveerd *M. tuberculosis* H37Ra wordt veelvuldig gebruikt als onderdeel van 'complete Freund's adjuvans', om antilichaamproductie in proefdieren te stimuleren.<sup>10</sup> Vanwege de vele bijwerkingen is gebruik van *M. tuberculosis* H37Ra als adjuvans in vaccins voor menselijk gebruik niet toegestaan, en worden in proefdieren minder schadelijke alternatieven aangeraden.<sup>10,11</sup>

## 5. Eerder COGEM-advies en inschaling door andere beoordelende instanties

De COGEM heeft *M. tuberculosis* als klasse 3 pathogeen opgenomen de lijst van pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën.<sup>12</sup> *M. tuberculosis* is als klasse 3 pathogeen opgenomen op bijlage 4 van de Regeling GGO.<sup>13</sup>

Door de Public Health Agency Canada is *M. tuberculosis* H37Rv in 'risk group' 3, en *M. tuberculosis* H37Ra in risk group 2 ingedeeld.<sup>14</sup> Zowel de Scientific Institute of Public Health in België<sup>15</sup> als de Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin in Duitsland<sup>16</sup> hebben *M. tuberculosis* H37Ra in risicogroep 2 ingedeeld. De American Type Culture Collection (ATCC) beschouwt de H37Ra-stam als BSL-2 organisme.<sup>17</sup> De inschaling door deze buitenlandse instanties geldt als referentie en achtergrondinformatie bij de risicobeoordeling die door de COGEM wordt uitgevoerd.

## 6. Overweging

*M. tuberculosis* H37Ra wordt al vele jaren in laboratoria gebruikt als tegenhanger van de virulente H37Rv-stam, onder andere bij onderzoek naar de factoren die van belang zijn voor de virulentie van *M. tuberculosis*.<sup>4,18,19,20</sup> Het genoom van beide H37R-stammen is gesequenced en met elkaar vergeleken, waarbij is aangetoond dat de sequentie van H37Ra op meerdere posities afwijkt van de H37Rv-sequentie.<sup>4,21,20</sup> Van een aantal posities is experimenteel aangetoond dat ze betrokken zijn bij de virulentie van *M. tuberculosis*.<sup>21</sup> Ook de eiwitexpressie van H37Ra wijkt af van die van de virulente tegenhanger H37Rv.<sup>20,22</sup>

De virulentie van *M. tuberculosis* H37Ra is bestudeerd in muizen<sup>23</sup> en cavia's<sup>24</sup>. Hoewel *M. tuberculosis* H37Ra in staat is beide diersoorten te infecteren en kan worden aangetoond in lymfeklieren en longweefsel, is de stam duidelijk minder pathogeen dan de H37Rv-stam. De virulentie en infectie-eigenschappen van *M. tuberculosis* H37Ra zijn in muizen vergelijkbaar met die van *M. bovis* BCG dat als vaccin tegen tuberculose wordt gebruikt.<sup>23</sup> H37Ra is in staat te persisteren in cavia's, maar de virulentie neemt na 4 weken duidelijk af ten opzichte van H37Rv.<sup>24</sup>

Cavia's worden al meer dan 100 jaar gebruikt als infectiemodel voor tuberculose.<sup>25</sup> De COGEM is van oordeel dat de resultaten van de dierproeven, in combinatie met de lange historie van veilig gebruik van *M. tuberculosis* H37Ra in het laboratorium, aantonen dat deze stam verzwakt is ten opzichte van virulente *M. tuberculosis*-stammen zoals H37Rv. Hoewel er geen gegevens zijn van infectie in mensen, zijn er aanwijzingen dat *M. tuberculosis* H37Ra ook in mensen verzwakt is.<sup>26</sup>

## 7. Advies

Alles in overweging nemende is de COGEM van oordeel dat de bacteriestam *Mycobacterium tuberculosis* HR37Ra geattenuëerd is in vergelijking met de virulente stammen. De COGEM adviseert om *M. tuberculosis* HR37Ra in te delen in pathogeniteitsklasse 2 en op te nemen op Bijlage 4 van de Regeling ggo.

## Referenties

1. World Health Organisation. Tuberculosis. [Tuberculosis \(who.int\)](https://www.who.int). Bezocht 1 maart 2022
2. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tuberculosis. [How TB Spreads | Basic TB Facts | TB | CDC](#). Bezocht 8 maart 2022
3. Fatima S *et al.* (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. *Life Sci.* 252: 117594
4. Zheng H *et al.* (2008). Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One.* 3: e2375
5. Ioerger TR *et al.* (2010). Variation among genome sequences of H37Rv strains of *Mycobacterium tuberculosis* from multiple laboratories. *J. Bacteriol.* 192: 3645-3653
6. Steenken W Jr. & Gardner LU (1946). History of H37 strain of tubercle bacillus. *Am. Rev. Tuberc.* 54: 62-66
7. Middlebrook G *et al.* (1947). Virulence and morphological characteristics of mammalian tubercle bacilli. *J. Exp. Med.* 86: 175-184
8. Mackaness GB *et al.* (1954). The growth of intracellular tubercle bacilli in relation to their virulence. *Am. Rev. Tuberc.* 69: 479-s
9. Soto CY *et al.* (2002). Simple and rapid differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra from *M. tuberculosis* clinical isolates through two cytochemical tests using neutral red and Nile blue stains. *J Clin Microbiol.* 40: 3021-3024
10. Stills HF Jr. (2005). Adjuvants and antibody production: dispelling the myths associated with Freund's complete and other adjuvants. *ILAR J.* 46: 280-293.
11. Leenaars PPAM (1997). Adjuvants in Laboratory Animals: evaluation of immunostimulating properties and side effects of Freund's complete adjuvant and alternative adjuvants in immunization procedures. Erasmus University Rotterdam.
12. COGEM (2021). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificaties van apathogene en pathogene bacteriën (2021). COGEM advies CGM/211025-01
13. Regeling ggo milieubeheer 2013. [wetten.nl - Regeling - Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - BWBR0035072 \(overheid.nl\)](https://www.wetten.nl). Bezocht 1 maart 2022
14. Public Health Agency of Canada. [ePATHogen - Risk Group Database \(canada.ca\)](https://www.canada.ca). Bezocht 1 maart 2022
15. Scientific Institute of Public Health. Division of Biosafety and Biotechnology. [Biosafety recommendations for the contained use of \*Mycobacterium tuberculosis\* complex isolates in industrialised countries](#). Bezocht 1 maart 2022
16. Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin. [Beschluss des ABAS zur Einstufung von \*Mycobacterium tuberculosis\* Stamm H37Ra in Risikogruppe 2 \(baua.de\)](https://www.baua.de). Bezocht 8 maart 2022
17. American Type Culture Collection (ATCC). [Mycobacterium tuberculosis \(Zopf\) Lehmann and Neumann | ATCC](https://www.atcc.org) Bezocht 1 maart 2022
18. Pascopella L *et al.* (1994). Use of in vivo complementation in *Mycobacterium tuberculosis* to identify a genomic fragment associated with virulence. *Infect. Immun.* 62: 1313-1319
19. Ryndak M *et al.* (2008). PhoP, a key player in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Trends Microbiol.* 16: 528-534
20. Pinto SM *et al.* (2018). Integrated Multi-Omic Analysis of *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra redefines virulence attributes. *Front. Microbiol.* 9: 1314

21. Elghraoui A *et al.* (2017). SMRT genome assembly corrects reference errors, resolving the genetic basis of virulence in *Mycobacterium tuberculosis*. *BMC Genomics* 18: 302
22. Jhingan GD *et al.* (2016). Comparative proteomic analyses of avirulent, virulent, and clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* identify strain-specific patterns. *J. Biol. Chem.* 291: 14257-14273
23. Larson CL & Wicht WC (1964). Infection of mice with *Mycobacterium tuberculosis*, strain H37Ra. *Am Rev Respir Dis.*90: 742-748
24. Alsaadi AI & Smith DW (1973). The fate of virulent and attenuated *Mycobacteria* in guinea pigs infected by the respiratory route. *Am Rev Respir Dis.* 107: 1041-1046
25. Clark S *et al.* (2014). Animal models of tuberculosis: Guinea pigs. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 5: a018572. doi: 10.1101/cshperspect.a018572
26. Silver RF *et al.* (2009). Human alveolar macrophage gene responses to *Mycobacterium tuberculosis* strains H37Ra and H37Rv. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 40: 491-504