

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

DATUM 06 mei 2022
KENMERK CGM/220506-01
ONDERWERP Advies Pathogeniteitsclassificatie Bacillus anthracis Sterne

Geachte mevrouw Heijnen,

Naar aanleiding van een vraag uit het werkveld waaruit gebleken is dat de bacteriestam *Bacillus anthracis* Sterne ontbreekt in de lijst met pathogeniteitsclassificaties, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

B. anthracis is een grampositieve, aerobe bacterie die in mensen en dieren miltvuur (antrax) kan veroorzaken. De bacterie bevat twee belangrijke factoren die bijdragen aan het ontwikkelen van ziekte: de productie van het antraxtoxine en het zogenaamde kapsel dat de bacteriecellen omhult. Deze omhulling remt opname en afbraak van de bacterie door het afweersysteem van de gastheer. *B. anthracis* is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.

De stam Sterne van *B. anthracis* is in 1937 geïsoleerd en mist het kapsel. Hierdoor is deze stam verzwakt en minder goed in staat ziekte te veroorzaken dan wildtype *B. anthracis*. Sinds de isolatie in 1937 wordt deze stam wereldwijd gebruikt voor het vaccineren van vee tegen antrax. Sterne is niet geschikt als vaccin voor mensen, omdat het antraxtoxine nog wel geproduceerd wordt. Sinds het gebruik van Sterne als levend vaccin bij dieren is het aantal gevallen van antrax bij mensen en dieren sterk gedaald. Er zijn geen gevallen bekend van ziekte veroorzaakt door Sterne in mensen.

Al het bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM om *B. anthracis* stam Sterne in te delen in pathogeniteitsklasse 2.



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

1 **Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestam *Bacillus anthracis* Sterne**

2 3 **COGEM advies CGM/220506-01**

4 5 **1. Inleiding**

6 De bacterie *B. anthracis* is door de COGEM, na een heroverweging in 2009, ingedeeld in
7 pathogeniteitsklasse 3 (appendix 1).¹ Deze heroverweging werd uitgevoerd naar aanleiding van een
8 discrepantie tussen de classificatie van de Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)² en de
9 Europese ARBO wetgeving, en op grond van de ernst van de ziekte die de bacterie veroorzaakt en de
10 mogelijkheid tot overdracht via de lucht. In datzelfde jaar zijn werkzaamheden met genetisch
11 gemodificeerde (gg-) *B. anthracis* stam Sterne, vanwege het geattenueerde karakter van deze stam,
12 ingedeeld op inperkingsniveau ML-II.³ Deze stam is echter destijds niet ingedeeld in een
13 pathogeniteitsklasse of opgenomen in bijlage 4 van de Regeling ggo.

14 15 **2. De bacteriesoort *Bacillus anthracis* veroorzaakt antrax (miltvuur)**

16 *Bacillus anthracis* is een grampositieve, aerobe bacterie die endosporen kan vormen.^{4,5} Deze sporen zijn
17 resistent tegen verschillende extreme omstandigheden en kunnen tientallen jaren in de bodem
18 overleven.⁶ Wanneer de omstandigheden, zoals de aanwezigheid van nutriënten en de zuurgraad,
19 gunstiger worden, kunnen de sporen uitgroeien tot vegetatieve cellen.⁷

20 Herbivoren zijn de natuurlijke gastheer van *B. anthracis*, maar mensen en andere zoogdieren kunnen
21 ook geïnfecteerd worden.⁸ Vee wordt veelal tijdens grazen door sporen in de bodem besmet. Mensen
22 kunnen besmet raken door direct of indirect contact met dieren, kadavers of dierlijke materialen die
23 sporen bevatten.⁶ Transmissie van de bacterie van mens op mens is bijzonder zeldzaam.^{5,9} Indien de
24 sporen in het lichaam terechtkomen en uitgroeien tot vegetatieve bacteriën, zijn deze in staat zich te
25 vermenigvuldigen en het ziektebeeld antrax (miltvuur) te veroorzaken.^{4,6,7}

26 27 **3. Er bestaan drie verschillende vormen van antrax**

28 Er zijn drie vormen van antrax: cutane, gastro-intestinale en respiratoire antrax, die zonder behandeling
29 allen potentieel dodelijk zijn in mensen en dieren.¹⁰ In meer dan 95% van de gevallen treedt infectie met
30 *B. anthracis* op via wondjes in de huid, die resulteren in cutane antrax.^{10,11} Cutane antrax kan zich verder
31 verspreiden waarbij behandeling noodzakelijk is, maar is meestal zelflimiterend.¹⁰ Behandeling met
32 antibiotica voorkomt verspreiding naar andere organen en kan voor volledig herstel zorgen. Gastro-
33 intestinale antrax kan ontstaan, wanneer sporen ingeslikt worden en door een beschadiging in het
34 spijsverteringsstelsel een infectie veroorzaakt wordt. Deze vorm komt zelden voor, maar is vaak
35 dodelijk.^{5,6} Respiratoire antrax kan zich ontwikkelen na het inademen van sporen. Een persoon met
36 respiratoire antrax zal doorgaans zonder behandeling binnen drie dagen na de aanvang van de eerste
37 symptomen overlijden.⁵ Behandeling van respiratoire antrax met antibiotica in een vroeg stadium van
38 de ziekte kan tot genezing leiden. Er zijn voor antrax humane en veterinaire vaccins beschikbaar, die op
39 zich goed beschermen, maar veel bijwerkingen geven.⁹

42 **4. *B. anthracis* stam Sterne**

43 De stam Sterne, wat als het eerste geattenueerde levende vaccin voor *B. anthracis* is gebruikt, werd
44 geïsoleerd in 1937.¹⁹ Het Sterne vaccin 34F2, dat uit levende sporen bestaat, wordt wereldwijd veel
45 gebruikt voor het vaccineren van gedomesticeerde dieren.¹²

46
47 **4.1 *Het pXO2 plasmide, dat opname en afbraak van de bacterie door macrofagen remt, is in Sterne***
48 ***verloren gegaan***

49 De belangrijkste virulentiefactoren van *B. anthracis* zijn het antraxtoxine en het antifagocytische ‘poly-
50 γ -D-glutamic acid’ (PGA) kapsel, waarvan de genen zich bevinden op twee plasmides, pXO1 en pXO2,
51 respectievelijk.⁷ Het antraxtoxine bestaat uit de 3 polypeptiden ‘lethal factor’ (LF), ‘edema factor’ (EF)
52 en ‘protective antigen’ (PA), die de twee toxinecomplexen ‘lethal toxin’ en ‘edema toxin’ vormen.⁷
53 Deze toxines verhinderen de aangeboren immuniteit waardoor proliferatie en disseminatie van de
54 bacterie kan plaatsvinden in het lichaam, en tasten uiteindelijk verscheidene weefsels en organen aan.⁷
55 Het PGA-kapsel tast tevens ook de aangeboren immuniteit aan: het kapsel beschermt *B. anthracis* tegen
56 het complementsysteem en verhindert hierdoor de opname en afbraak van de bacterie door
57 macrofagen.¹³ Daarnaast verhoogt het PGA-kapsel de cytotoxische activiteit van het ‘lethal toxin’ en is
58 het kapsel nodig voor disseminatie vanaf de infectieplaats.¹⁴

59 Hoewel de Sterne stam nog wel het pXO1 plasmide bevat, is het pXO2 plasmide verloren gegaan
60 waardoor deze stam niet langer het PGA-kapsel bevat.

61
62 **4.2 *Er zijn geen gevallen bekend van antrax veroorzaakt door Sterne in mensen***

63 Door het verlies van het pXO2 plasmide is de Sterne stam avirulent voor muizen.^{4,13} Als er tijdens
64 handelingen met het vaccin prik- of snijaccidenten optreden, of als sporen contact maken met een open
65 wond, bestaat er een kans op een cutane infectie die goed behandeld kan worden met antibiotica.¹²
66 Geschat wordt dat met de juiste (uitvoering van) laboratoriumtechnieken (‘good laboratory practise’) de
67 kans op een percutane infectie met stam Sterne kleiner is dan 3×10^{-10} .¹⁵ Er zijn geen rapportages dat *B.*
68 *anthracis* Sterne antrax heeft veroorzaakt bij mensen.¹²

69
70 **4.3 *Het vaccin gebaseerd op Sterne is effectief tegen antrax en wordt al meer dan 60 jaar gebruikt***

71 Stam Sterne wordt al meer dan 60 jaar gebruikt voor onder andere het vaccineren van dieren, met name
72 vee.^{16,17,18} Het Sterne vaccin blijkt vanwege de aanwezigheid van het antraxtoxine nog licht virulent te
73 zijn in vatbare diersoorten zoals geiten en lama’s, en kan bijwerkingen geven.^{9,18} In enkele gevallen leidt
74 dit tot de dood in gevaccineerde dieren.^{12,18} Sinds het wereldwijde gebruik van het vaccin eind jaren ’30,
75 is het aantal gevallen van antrax in mensen en dieren sterk gedaald. Reversie van Sterne naar wildtype
76 *B. anthracis* door opname van het pXO2 plasmide is sinds de isolatie van de stam in 1937¹⁹ niet
77 waargenomen.¹²

78
79 **5. Overweging en advies**

80 De stam Sterne is geïsoleerd in 1937. De stam produceert nog wel het antraxtoxine, maar mist het PGA-
81 kapsel wegens de afwezigheid van het pXO2 plasmide. Dit kapsel is essentieel voor de verspreiding van
82 de bacterie vanaf de infectieplaats en voor virulentie in muizen.^{4,13,14} Sterne wordt al lange tijd gebruikt

83 in wetenschappelijk onderzoek en als levend vaccin in dieren, en geeft een goede bescherming tegen
84 antrax.¹² Reversie van Sterne naar wildtype *B. anthracis* is theoretisch mogelijk door opname van het
85 pXO2 plasmide afkomstig van een wildtype bacterie of een andere plasmide-bevattende stam, maar is
86 sinds de isolatie van de stam uit 1937 nog nooit gerapporteerd.¹²

87 Mensen kunnen hoogstwaarschijnlijk niet via de orale of respiratoire route besmet worden met de
88 Sterne stam.¹⁵ Wanneer er prik- of snijaccidenten tijdens handelingen met het *B. anthracis* Sterne
89 plaatsvinden waardoor de huidbarrière doorbroken wordt, of sporen in contact komen met een open
90 wond, kan de mogelijke percutane infectie goed behandeld worden met antibiotica.¹² De COGEM is van
91 oordeel dat de Sterne stam vanwege de afwezigheid van het PGA-kapsel verminderd virulent is.

92
93 Al het bovenstaande in overweging nemende, adviseert de COGEM om *B. anthracis* stam Sterne in te
94 delen in pathogeniteitsklasse 2.

95

96 Referenties

1. COGEM (2009). Advies herziening classificatie *Bacillus anthracis*. COGEM advies COGEM/090709-03
2. Regeling ggo milieubeheer 2013. wetten.nl - Regeling - Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - BWBR0035072 (overheid.nl) (bezoekt: 13 april 2022)
3. COGEM (2009). Inschaling van werkzaamheden met vaccinstam *Bacillus anthracis* Sterne. COGEM advies CGM/090317-03
4. Malmquist JA *et al.* (2019). *Galleria mellonella* as an infection model for *Bacillus anthracis* Sterne. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9: 360
5. Bacterial morphology and cell wall structure and synthesis/*Bacillus* (2002). In: *Medical Microbiology*. Edited by: Murray PR *et al.* 11-24/240-244
6. Rao S *et al.* (2019). Risk factors associated with the occurrence of anthrax outbreaks in livestock in the country of Georgia: a case-control investigation 2013-2015. *PLoS One.* 14: e0215228
7. Moayeri M *et al.* (2015). Anthrax pathogenesis. *Annu. Rev. Microbiol.* 69:185-208
8. Anthrax in humans animals (2008). 4th edition. Geneva: World Health Organization. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK310473/>
9. RIVM/LCI – Antrax richtlijn. <https://lci.rivm.nl/richtlijnen/antrax> (bezoekt: 19-04-22)
10. Turnbull PCB *et al.* (1998). Guidelines for the surveillance and control of anthrax in humans and animals. WHO/EMC/ZDI/98.6. World Health Organization, Geneva, Switzerland
11. Hambleton P *et al.* (1984). Anthrax: the disease in relation to vaccines. *Vaccine* 2: 125-132
12. US department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention – Anthrax Sterne strain (34F2) of *Bacillus anthracis*. <https://www.cdc.gov/anthrax/resources/anthrax-sterne-strain.html> (bezoekt: 19-04-2022)
13. Harvill ET *et al.* (2005). Complement depletion renders C57BL/6 mice sensitive to the *Bacillus anthracis* Sterne strain. *Infect. Imm.* 73: 4420-4422
14. Jang J *et al.* (2011). The poly- γ -D-glutamic acid capsule of *Bacillus anthracis* enhances lethal toxin activity. *Infect. Immun.* 79: 3846-3854

15. Turnbull P (2000). Information for risk assessments in the handling of vaccine strains of bacillus anthracis. Internal report
16. Welkos SL *et al.* (1986). Differences in susceptibility of inbred mice to *Bacillus anthracis*. *Infect. Immun.* 51: 795-800
17. Welkos SL *et al.* (1988). Pathogenesis and genetic control of resistance to the Sterne strain of *Bacillus anthracis*. *Microb. Pathog.* 4: 53-69
18. Brossier F *et al.* (1999). Antigen delivery by attenuated *Bacillus anthracis*: new prospects in veterinary vaccines. *J. Appl. Microbiol.* 87: 209-302
19. 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

Appendix 1. Pathogeniteitsclassificatie Regeling genetisch gemodificeerde organismen (ggo)

Onder de ggo-regelgeving worden bij de pathogeniteitsclassificatie van een micro-organisme de risico's voor mens en milieu in ogenschouw genomen. Daartoe worden de 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.

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.

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.