

Aan de staatssecretaris van
Infrastructuur en Waterstaat
Mr. drs. A.W.H. Bertram
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 03 maart 2026
KENMERK CGM/260303-01
ONDERWERP Advies Werkzaamheden met vier *Mycobacterium tuberculosis* stammen op ML-II

Geachte mevrouw Bertram,

Naar aanleiding van een adviesvraag betreffende het dossier IG 20-163_003 getiteld 'Omlaagschaling auxotrofe *Mycobacterium tuberculosis* stammen', ingediend door de Stichting Radboud Universiteit, deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is verzocht te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met vier verzwakte *Mycobacterium tuberculosis* stammen. *M. tuberculosis* is een bacterie die bij mensen tuberculose kan veroorzaken. De aanvrager is voornemens in de verzwakte stammen een eiwit verhoogd tot expressie te laten komen dat betrokken is bij het uit de cel pompen van antibiotica. Dit kan mogelijk leiden tot een verhoogde resistentie tegen antibiotica. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden op ML-II uit te mogen voeren met aanvullende voorschriften voor micro-organismen die via de lucht verspreiden.

De vier verzwakte *M. tuberculosis* stammen zijn voor hun groei afhankelijk van toegevoegd vitamine B5 (pantothenaat). In één van de stammen ontbreekt daarnaast een bepaald systeem voor eiwittransport, en de drie overige stammen zijn voor de groei ook afhankelijk van andere toegevoegde voedingsstoffen (leucine en methionine of arginine).

De COGEM sluit niet uit dat de genetische modificatie tot een verhoogde resistentie voor bepaalde antibiotica zal leiden. Echter ook met een mogelijk verhoogde antibioticum-resistentie blijven de stammen verzwakt. Alles in overweging nemende, is de COGEM van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden met de vier *M. tuberculosis* stammen op inperkingsniveau ML-II onder navolging van de aanvullende voorschriften tegen verspreiding door de lucht, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn. De COGEM adviseert om uit Arbo-overwegingen de gemodificeerde stammen te testen op gevoeligheid voor eerstelijns anti-tuberculosemiddelen (antibiotica).

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

Met het oog op eventuele belangenverstrengeling is het COGEM-lid prof.dr.ir. R.P. van Rij niet betrokken geweest bij de totstandkoming en besluitvorming over dit advies.

Advies Inschaling werkzaamheden met vier *Mycobacterium tuberculosis* deletiemutanten op ML-II

COGEM-advies CGM/260303-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met vier geattenueerde *Mycobacterium tuberculosis* stammen: *M. tuberculosis* H37Rv mc² 6230 (Δ panCD, Δ RD1), *M. tuberculosis* H37Rv mc² 6206 (Δ panCD, Δ leuCD), *M. tuberculosis* H37Rv mc² 7901 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ metA), en *M. tuberculosis* H37Rv mc² 7902 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ argB). De aanvraag is afkomstig van de Stichting Radboud Universiteit (IG 20-163_003).

De aanvrager beschikt reeds over een vergunning voor werkzaamheden met deze deletiemutanten op ML-II met inachtneming van aanvullende voorschriften voor aerogeen verspreidende genetisch gemodificeerde micro-organismen (ggo's), zoals opgenomen in Bijlage 9 van de 'Regeling genetisch gemodificeerde organismen'.¹ De huidige aanvraag betreft een aanvulling op deze vergunning voor genetische modificatie van de vier stammen om het gen *rv0194*, coderend voor een effluxpomp, tot overexpressie te brengen. Bureau ggo (BGGO) geeft aan dat de betreffende genetische modificatie vragen oproept over de effectiviteit van de bestaande behandelmethode voor deze bacterie. De COGEM is daarom gevraagd of zij op basis van de door de aanvrager aangeleverde onderbouwing kan instemmen met de voorgelegde inschaling van de genetisch gemodificeerde (gg-) *M. tuberculosis* stammen op ML-II in combinatie met aanvullende voorschriften voor aerogeen verspreidende ggo's.

2. Achtergrondinformatie over *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis is een bacteriesoort die behoort tot de familie *Mycobacteriaceae* en klasse van Actinomyceten.² De bacterie is een intracellulair pathogeen dat hoofdzakelijk macrofagen infecteert.³ *M. tuberculosis* is de belangrijkste oorzaak van tuberculose (tbc) bij de mens. Tuberculose is een veel voorkomende ziekte, waaraan in 2024 wereldwijd circa 1,23 miljoen mensen stierven.⁴ Besmetting vindt aerogeen plaats, wanneer met tbc-besmette mensen bijvoorbeeld hoesten of niezen.⁵ Infectie met *M. tuberculosis* verloopt doorgaans asymptomatisch, maar zo'n 5 tot 10% van de geïnfecteerde mensen ontwikkelt gedurende hun leven tbc.⁴ De bacterie kan na infectie latent aanwezig blijven. De kans om tbc te krijgen is het grootst in de eerste twee jaar na infectie met *M. tuberculosis*. Klassieke symptomen zijn een aanhoudende hoest, nachtzweeten, gewichtsverlies, koorts en vermoeidheid.

M. tuberculosis beschikt over verschillende eigenschappen die de behandeling van tuberculose moeilijk maken. Zo is de hydrofobe celwand van de bacterie dusdanig complex dat hierdoor weinig medicijnen de bacterie in kunnen komen (influx).^{6,7} Ook kan door mutaties in het genoom resistentie tegen antibiotica optreden.^{6,8,9} Daarnaast kan de bacterie door middel van effluxsystemen actief antibiotica de cel uit pompen.^{6,10}

De behandeling van tuberculose vereist het dagelijks gebruik van een combinatie van verschillende antibiotica, gedurende minstens zes maanden. In de WHO-richtlijnen voor behandeling van 'drug-susceptible' tuberculose wordt als eerstelijnsmedicatie een combinatie van rifampicine, isoniazide, pyrazinamide en ethambutol (HRZE) aanbevolen.¹¹ Voor 'drug resistant' tuberculose wordt door de WHO behandeling met bedaquiline, pretomanide, linezolid en moxifloxacin (BPaLM) aanbevolen.

Wereldwijd wordt een geattenuëerde stam van *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* 'Bacille de Calmette et Guérin' (BCG) gebruikt als vaccin tegen tuberculose.¹²

3. De te gebruiken *M. tuberculosis* deletiemutanten

De deletiemutanten waarmee de aanvrager verzoekt te werken zijn afgeleid van *M. tuberculosis* H37Rv. Dit is een virulente stam en de tegenhanger van de avirulente laboratoriumstam *M. tuberculosis* H37Ra. Zowel H37Rv als H37Ra 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.¹³ In onderstaande paragrafen worden de *M. tuberculosis* H37Rv deletiemutanten kort toegelicht.

3.1 *M. tuberculosis* H37Rv mc² 6230 (Δ panCD, Δ RD1)

In deze stam zijn de *panCD* genen verwijderd en is daarnaast de 'region of difference' (RD1) verwijderd. *PanC* en *panD* zijn essentiële genen voor de biosynthese van pantothenaat (pantotheenzuur of vitamine B5). Door deletie van deze genen is de bacterie voor zijn groei afhankelijk van reeds aanwezig of extern toegevoegd pantothenaat (auxotroof). De RD1-regio omvat de genen *rv3871-rv3877*. Het ontbreken van dit 9,5 kb grote RD1-gebied is één van de belangrijkste redenen voor de attenuatie van de vaccinstam *M. bovis* BCG.¹⁴ Beschreven is dat Δ panCD en Δ RD1-stammen niet-virulent zijn in immuuncompetente en -gecompromitteerde muizen^{15,16} en niet-humane primaten¹⁷.

3.2 *M. tuberculosis* H37Rv mc² 6206 (Δ panCD, Δ leuCD)

In deze stam zijn naast de *panCD* genen ook de *leuCD* genen verwijderd. *LeuC* en *leuD* zijn essentiële genen voor de biosynthese van leucine. Een *leuD*-deletiemutant veroorzaakte geen pathologie in immuungecompromitteerde muizen.¹⁸ De dubbele deletiemutant (Δ panCD, Δ leuCD) is dubbel auxotroof voor pantothenaat en leucine. Onderzoek met de mc² 6206 stam in immuun-gecompromitteerde muizen laat zien dat de stam niet-virulent is.¹⁹

3.3 *M. tuberculosis* H37Rv mc² 7901 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ metA)

In deze stam zijn de *panCD*- en *leuCD*-genen verwijderd, en daarnaast is ook het *metA*-gen verwijderd. *MetA* is essentieel voor de productie van methionine. Deze driedubbele deletiemutant is daardoor auxotroof voor pantothenaat, leucine en methionine. Een *M. tuberculosis* H37Rv met een deletie in *metA* veroorzaakt geen infectie in immuuncompetente en -gecompromitteerde muizen, en prolifereert en overleeft niet in humane macrofagen.²⁰ De driedubbele deletiemutant mc² 7901 veroorzaakt geen pathologie in immuungecompromitteerde muizen.²¹

3.4 *M. tuberculosis* H37Rv mc² 7902 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ argB)

In deze stam is naast de *panCD*- en *leuCD*-genen ook het *argB*-gen verwijderd. *ArgB* is essentieel voor de productie van arginine. Deze driedubbele deletiemutant is daardoor auxotroof voor pantothenaat, leucine en arginine. *M. tuberculosis* H37Rv met een deletie in *argB* veroorzaakt geen pathogeniteit in immuuncompetente en -gecompromitteerde muizen.²² De driedubbele deletiemutant mc² 7902 veroorzaakt geen pathologie in immuungecompromitteerde muizen.²¹

4. Voorgenomen werkzaamheden

In de huidige aanvraag worden de vier *M. tuberculosis* deletiemutanten getransformeerd met de vectoren pML653 (door de aanvrager 'empty vector' genoemd) en pML655 (Rv0194). De empty vector pML653 bevat het *mspA*-gen afkomstig van *Mycobacterium smegmatis*. *MspA* is een porine-eiwit dat zorgt

voor een verhoogde permeabiliteit voor hydrofiele stoffen.²³ De empty vector wordt gebruikt als negatieve controle. pML653 bevat naast het *mspA*-gen ook de 'origin for replication' (ori) van mycobacteriën, de ColE1 ori van *Escherichia coli*, en een *hyg* resistentiegen.

Het *rv0194*-gen codeert voor een multidrug effluxpomp; een eiwit waarmee de bacterie o.a. antimicrobiële stoffen (zoals antibiotica) uit de cel kan verwijderen. Rv0194 is reeds aanwezig in *M. tuberculosis* en in de vier stammen die de aanvrager voornemens is te onderzoeken, en het *rv0194*-gen dat tot overexpressie gebracht wordt, is identiek aan het gen dat endogeen tot expressie komt. Transformatie met pML655 leidt tot overexpressie van de effluxpomp Rv0194 in de *M. tuberculosis* deletiemutanten. pML655 bevat naast het *rv0194*-gen ook de ori van mycobacteriën, de ColE1 ori van *E. coli*, en een *hyg* resistentiegen.

De aanvrager zal gerichte en ongerichte metabolomics uitvoeren op levende *M. tuberculosis* cellen waarin Rv0194 tot overexpressie is gebracht in aan- en afwezigheid van antibiotica. Ook worden vergelijkbare experimenten uitgevoerd op 'membraan-vesicles' gemaakt van de cellen. Het doel van het onderzoek is om de endogene (metabolieten) en exogene (antibiotica) substraten van onder andere Rv0194 in *M. tuberculosis* te ontrafelen.

De aanvrager verzoekt deze werkzaamheden eveneens op ML-II uit te voeren met inachtneming van de aanvullende voorschriften voor ggo's die aerogeen kunnen verspreiden (art. 9.1.1.3.3.9. van de Regeling ggo):

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

5. Eerdere COGEM-adviezen

M. tuberculosis is ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.²⁴ De COGEM heeft eerder geadviseerd over werkzaamheden met *M. tuberculosis* mc² 6230 en drie andere verzwakte gg-*M. tuberculosis* stammen, waaraan verschillende donorsequenties toegevoegd werden. Er werd verzocht om omlaagschaling van ML-III naar ML-II.²⁵ Naast *M. tuberculosis* mc² 6230, werden de stammen *M. tuberculosis* mc² 6020 (Δ LysA Δ panCD), *M. tuberculosis* mc² 6030 (Δ panCD Δ RD1, genetisch identiek aan stam mc² 6230, maar bevat het hygromycine antibioticumresistentiegen) en *M. tuberculosis* H37Ra gebruikt. Voor de stammen H37Ra, mc² 6030 en mc² 6230 kon de COGEM instemmen met inschaling op ML-II met de aanvullende voorschriften voor activiteiten met ggo's die aerogeen kunnen verspreiden, en met in acht name van enkele aanvullende voorschriften. Voor stam mc² 6020 adviseerde de COGEM om werkzaamheden op ML-III te laten plaatsvinden, tenzij aangetoond werd dat de attenuatie na toevoeging van de donorsequenties gehandhaafd blijft. Uit Arbo-overwegingen adviseerde de COGEM de te gebruiken batches van de stammen die resistent zijn tegen kanamycine te testen op de gevoeligheid voor ten minste één algemeen voorgeschreven eerstelijns anti-tuberculosemiddel.

De COGEM heeft eerder ook positief geadviseerd over werkzaamheden met een *phoP* mutante *M. tuberculosis* stam (afgeleid van wildtype *M. tuberculosis* MT103 en vervaardigd door de introductie van een kanamycine resistentiegen in de coderende sequentie van *phoP*) op ML-II met aanvullende maatregelen voor ggo's die aerogeen verspreiden. Omdat *M. tuberculosis phoP* resistent is voor kanamycine, heeft de COGEM geadviseerd te testen op de gevoeligheid van ten minste één algemeen

voorgeschreven eerstelijns antituberculosemiddel (zoals isoniazide, rifampicine, pyrazinamide en ethambutol).²⁶

6. Overweging

Werkzaamheden met de geattenueerde *M. tuberculosis* stammen H37Rv mc² 6230 (Δ panCD, Δ RD1), H37Rv mc² 6206 (Δ panCD, Δ leuCD), H37Rv mc² 7901 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ metA) en H37Rv mc² 7902 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ argB) zijn door BGGO eerder vergund op ML-II met aanvullende voorschriften voor aerogeen verspreidende ggo's. De aanvrager verzoekt om nieuwe donorsequenties in de *M. tuberculosis* stammen tot expressie te brengen (Rv0194 en MspA) en deze werkzaamheden op hetzelfde inperkingsniveau uit te voeren. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met de voorgestelde inschaling op ML-II in combinatie met de aanvullende voorschriften voor activiteiten met aerogeen verspreidende ggo's, voor de toegevoegde donorsequenties in deze geattenueerde *M. tuberculosis* stammen.

6.1 Biologische inperking van de *M. tuberculosis* deletiemutanten

De te gebruiken *M. tuberculosis* stammen H37Rv mc² 6230 (Δ panCD, Δ RD1), H37Rv mc² 6206 (Δ panCD, Δ leuCD), H37Rv mc² 7901 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ metA) en H37Rv mc² 7902 (Δ panCD, Δ leuCD, Δ argB) kunnen door de aangebrachte deleties verschillende essentiële vitaminen en aminozuren niet zelf synthetiseren en zijn daardoor afhankelijk van de opname van extern toegevoegde voedingsstoffen in het groeimedium. Dierstudies tonen aan dat deze stammen geattenuerd zijn. De aanvrager stelt dat de aangebrachte deleties in de genen volledig zijn. Herstel van de (onafhankelijke) deleties kan enkel optreden door horizontale genoverdracht in aanwezigheid van wildtype stammen. Omdat deze in de experimentele opzet afwezig zijn, is de kans op spontane reversie van deze stammen verwaarloosbaar klein.

6.2 Expressie van MpsA in de *M. tuberculosis* stammen

De empty vector pML653 bevat het *mspA*-gen van *M. smegmatis* dat codeert voor een porine-eiwit. MspA is in *M. smegmatis* het meest voorkomende en functioneel dominante porine, en faciliteert passieve transmembraandiffusie van kleine hydrofiele substraten, zoals glucose. Ook bepaalde antibiotica kunnen de cel in getransporteerd worden via dit porine.^{27,28} MpsA komt niet voor in langzaam groeiende (pathogene) mycobacteriën zoals *M. tuberculosis*. Expressie van MspA zou de passieve opname van kleine hydrofiele stoffen, zoals panthotenaat, in de deletiemutanten kunnen bevorderen, maar daarvoor is externe aanwezigheid van deze stoffen in de omgeving noodzakelijk. Daarnaast bevatten de stammen nog andere deleties in essentiële biosynthese pathways (mc² 6202, mc² 7901, mc² 7902) of eiwittransportsystemen (mc² 6230) die voor attenuatie zorgen.

Beschreven is dat expressie van *M. smegmatis*-MspA in *M. tuberculosis* onder laboratoriumcondities resulteert in een verhoogde gevoeligheid voor bepaalde antibiotica (ampicilline, cefapirine, isoniazide en streptomycine).²⁹ Ook verhoogt expressie van het *M. smegmatis* MspA-porine in *M. tuberculosis* de gevoeligheid voor koper (aanwezig in bloed en macrofaag fagosomen waarin wildtype *M. tuberculosis* overleeft en repliceert), waardoor al bij lage koperconcentraties de groei afneemt.³⁰ Daarnaast is aangetoond dat de groei van *M. tuberculosis* die MspA van *S. smegmatis* tot expressie brengt significant afneemt in muizen en humane macrofagen, en de virulentie van *M. tuberculosis* in muizen door expressie van MspA vermindert.³¹ Het is derhalve aannemelijk dat expressie van MspA de mutanten verder zal

attenueren, de opname van antibiotica zal verbeteren en daarmee de gevoeligheid voor antibiotica zal verhogen.

6.3 Overexpressie van Rv0194 in de *M. tuberculosis* stammen

De Rv0194 effluxpomp behoort tot één van de zeven membraantransporter-superfamilies, namelijk de 'ATP-binding cassette' (ABC-)transporters. Deze transporters gebruiken ATP als energiebron voor transport van onder andere suikers en aminozuren.^{6,32,33} Rv0194 behoort tot de exportsystemen en is verantwoordelijk voor de efflux van onder andere antibiotica uit de cel.³² Rv0194 is reeds aanwezig in *M. tuberculosis* en de te gebruiken deletiemutanten, en zal tot overexpressie worden gebracht. Overexpressie van Rv0194 kan echter een verminderde gevoeligheid geven voor verschillende antibiotica door het uit de cel pompen van antibiotica.

Beschreven is dat een verhoogde expressie van het *rv0194*-homoloog in *M. bovis* (*bcg0231*) zorgt voor een 32- tot 64-voudige toename in de 'minimum inhibitory concentration' (MIC; de laagste concentratie van een antibioticum die zichtbaar bacteriegroei remt) van de antibiotica ampicilline, streptomycine en chlooramfenicol, en een 4- tot 8-voudige toename van de MIC van vancomycine en tetracycline.³⁴ Overexpressie van *rv0194* uit *M. tuberculosis* in *M. smegmatis* zorgde eveneens voor een toegenomen resistentie (i.e., een hogere MIC) tegen de antibiotica ampicilline, vancomycine, novobiocine, en erythromycine, maar niet tegen chlooramfenicol en tetracycline.³⁴

Overexpressie van *rv0194* is ook bestudeerd in *M. tuberculosis* stam mc² 6230, en leidt tot een tweevoudige toegenomen resistentie tegen ampicilline en chlooramfenicol, maar vertoont geen toegenomen resistentie tegen streptomycine.³⁵ Ook is een verminderde gevoeligheid voor het veelgebruikte isoniazide beschreven bij een klinisch *M. tuberculosis*-isolaat waarin overexpressie van efflux-genen (waaronder *rv0194*) is gedetecteerd.³⁶ De werkzaamheid van andere soorten antibiotica wordt echter niet beïnvloed.

De COGEM acht de kans op een verhoogde antibioticumresistentie door overexpressie van Rv0194 aanwezig. Uit onderzoek blijkt dat overexpressie van Rv0194 in enkele mycobacteriën de gevoeligheid voor bepaalde antibiotica vermindert. Voor welke antibiotica een verhoogde gevoeligheid zal optreden in de deletiemutanten is lastig te voorspellen, omdat experimentele gegevens hierover ontbreken. Gezien de verschillen in moleculaire lading, massa en structuur van de verschillende antibiotica, is het onwaarschijnlijk dat overexpressie van Rv0194 resistentie tegen alle gangbare tuberculosemiddelen opwekt.

De kans dat Rv0194-overexpressie de mutaties en tekortkomingen in de deletiemutanten opheffen, is verwaarloosbaar klein, omdat Rv0194 als effluxtransporter niet voor een verhoogde nutriëntopname kan zorgen. De COGEM is daarom van oordeel dat een mogelijk geïnduceerde antibioticumresistentie door overexpressie van Rv0194 geen verdere invloed heeft op het geattenueerde karakter (verminderde virulentie) van de deletiemutanten.

7. Conclusie en advies

Alles in огenschouw nemende, stemt de COGEM ermee in om werkzaamheden met deletiemutanten in combinatie met toegevoegde donorsequenties *rv0194* (*M. tuberculosis* H37Rv) en *mshA* (*M. smegmatis*) uit te voeren op het voorgelegde inperkingsniveau ML-II, met inbegrip van de aanvullende

voorwaarden uit bijlage 9 van de Regeling ggo voor activiteiten met aerogeen overdraagbare ggo's (9.1.1.3.3.9)¹:

- Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen gedragen;
- Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

De COGEM is van oordeel dat bij uitvoering van de voorgenomen werkzaamheden op dit inperkings-niveau en onder navolging van de aanvullende voorwaarden, de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

8. Signalerende opmerking

Om uit voorzorg de risico's voor (kwetsbare) medewerkers te minimaliseren, signaleert de COGEM dat het raadzaam kan zijn om uit Arbo-overwegingen de te gebruiken batches van de gg-stammen te testen op de gevoeligheid voor ten minste drie algemeen voorgeschreven eerstelijns anti-tuberculosemiddelen. Dit om eventuele onvoorziene resistenties volledig uit te sluiten, en omdat tuberculose met combinatietherapie wordt behandeld waarbij verschillende antibiotica tegelijkertijd worden toegediend.

Referenties

1. Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013. Bijlage 9. <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2026-01-01#Bijlage9> (bezocht op 18 februari 2026)
2. NCBI taxonomy browser – *Mycobacterium tuberculosis* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy> (bezocht op 18 februari 2026)
3. Smith I (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin. Microbiol. Rev. 16: 463-496
4. World Health Organisation. Tuberculosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (bezocht op 18 februari 2026)
5. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tuberculosis: causes and how it spreads. https://www.cdc.gov/tb/causes/?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/howtbspreads.htm (bezocht op 18 februari 2026)
6. Remm S et al (2022). Critical discussion on drug efflux in *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol. Rev. 46: fuab050
7. Jacobo-Delgado YM et al (2023). *Mycobacterium tuberculosis* cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? Front. Immunol. 14: 1194923
8. Zaw MT et al. (2018). Mutations inside rifampicin-resistance determining region of *rpoB* gene associated with rifampicin-resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Infect. Public Health 11: 605-610
9. Kadura S et al. (2020). Systematic review of mutations associated with resistance to the new and repurposed *Mycobacterium tuberculosis* drugs bedaquiline, clofazimine, linezolid, delamanid and pretomanid. J. Antimicrob. Chemother. 75: 2031-2043
10. Laws M et al. (2022). Efflux pumps in *Mycobacterium tuberculosis* and their inhibition to tackle antimicrobial resistance. Trends Microbiol. 30: 57-68
11. WHO operational handbook on tuberculosis (2025). Module 4: treatment and care. Geneva: World Health Organization. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
12. Fatima S et al. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. Life Sci. 252: 117594
13. 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
14. Hsu T et al. (2003). The primary mechanism of attenuation of bacillus Calmette-Guerin is a loss of secreted lytic function required for invasion of lung interstitial tissue. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 12420-12425
15. Sambandanmurthy V et al. (2002). A pantothenate auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis* is highly attenuated and protects mice against tuberculosis. Nat. Med. 8: 1171-1174

16. Sambandamurthy VK et al. (2006). *Mycobacterium tuberculosis* $\Delta RD1 \Delta panCD$: A safe and limited replicating mutant strain that protects immunocompetent and immunocompromised mice against experimental tuberculosis. *Vaccine* 24: 6309-6320
17. Larsen MH et al. (2009). Efficacy and safety of live attenuated persistent and rapidly cleared *Mycobacterium tuberculosis* vaccine candidates in non-human primates. *Vaccine* 27: 4709-4717
18. Hondalus MK et al. (2000). Attenuation of and protection induced by a leucine auxotroph of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 68: 2888-2898
19. Jain P et al. (2014). Specialized transduction designed for precise high-throughput unmarked deletions in *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio* 5: e01245-14
20. Berney M et al. (2015). Essential roles of methionine and S-adenosylmethionine in the autarkic lifestyle of *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 112: 10008-10013
21. Vilchèze C et al. (2018). Rational design of biosafety level 2-approved, multidrug-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* through nutrient auxotrophy. *mBio* 9:e00938-18
22. Tiwari S et al (2018). Arginine-deprivation-induced oxidative damage sterilizes *Mycobacterium tuberculosis*. *PNAS* 115: 9779-9784
23. Stahl C et al. (2001). MspA provides the main hydrophilic pathway through the cell wall of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 40: 451-464
24. COGEM (2025). Advies Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten van (a)pathogene bacteriën (2025). COGEM-advies CGM/251218-02
25. COGEM (2022). Inschaling van werkzaamheden met vier verzwakte genetisch gemodificeerde *Mycobacterium tuberculosis* stammen. COGEM-advies CGM/221206-01
26. COGEM (2009). Inschaling van in vitro werkzaamheden met een *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant. COGEM-advies CGM/090212-01
27. Zhang Z et al (2026). Functional divergence of Msp porins in substrate uptake and stress resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Microb. Pathog.* 210: 108185
28. Danilchanka O et al (2008). Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 3127-3134
29. Mailaender C et al. (2004). The MspA porin promotes growth and increases antibiotic susceptibility of both *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol.* 150: 853-864
30. Speer A et al. (2013). Porins increase copper susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol* 195: 5133-5140
31. Lamrabet O et al. (2014). MspA-*Mycobacterium tuberculosis*-transformant with reduced virulence: The “unbirthday paradigm”. *Microb. Pathog.* 76: 10-18
32. Barreto de Oliveira MC & Balan A (2020). The ATP-Binding Cassette (ABC) transport systems in *Mycobacterium tuberculosis*: structure, function, and possible targets for therapeutics. *Biology* 9: 443
33. Du D et al (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nat. Rev. Microbiol.* 16: 523-539
34. Danilchanka O et al (2008). Identification of a novel multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 2503-2511
35. Philpott R (2009). Identification of the function of Rvo194 in *Mycobacterium tuberculosis*. *All ETDs from UAB.* 6726.
36. Narang A et al (2017). Contribution of putative efflux pump genes to isoniazid resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Mycobacteriol.* 6: 177-183