

Aan de staatssecretaris van Openbaar Vervoer en Milieu
Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat
De heer Ch.A. Jansen
Postbus 20901
2500 EX Den Haag

DATUM 20 februari 2025
KENMERK CGM/250220-01
ONDERWERP Advies introductie van mycobacteriële genen in drie Mycobacterium-soorten

Geachte heer Jansen,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag over het dossier (IG 24-120_2.8-000) getiteld “Gentransfer van orthologe genen uit Mycobacteriën in andere mycobacteriële species”, ingediend door het Amsterdam UMC, deelt de COGEM u het volgende mee.

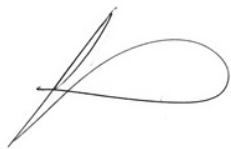
Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden waarbij genen uit verschillende *Mycobacterium*-soorten geïntroduceerd worden in andere mycobacteriën; *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium marinum* of *Mycolicibacterium smegmatis*. Het onderzoek heeft als doel de functie van de genen te onderzoeken in een veiliger organisme. De gemaakte gg-bacteriën worden gebruikt om cellen en vissen te infecteren. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op ML-II en DM-II met enkele aanvullende voorschriften. De COGEM is gevraagd of zij hiermee kan instemmen.

De geïntroduceerde genen verschillen per gastheer. In *M. bovis* BCG en *M. marinum* worden uitsluitend ‘orthologe’ genen toegevoegd; d.w.z. dat het geproduceerde eiwit in de gastheer en in het donororganisme een aminozuursequentieovereenkomst (homologie) van >65% over het gehele eiwit heeft. Bij een lagere homologie wordt een beslisboom gehanteerd om te bepalen of een gedeelte van de sequentie geïntroduceerd kan worden. In *M. smegmatis* worden ook niet-orthologe genen geïntroduceerd. Toxinegenen zijn in de aanvraag uitgesloten, maar introductie van virulentiegenen is wel toegestaan. De COGEM stemt in met het verzoek tot inschaling, mits aan enkele aanvullende voorwaarden wordt voldaan, zoals het introduceren van maximaal één (ortholoog) (virulentie)gen of in een operon gelegen (orthologe) (virulentie)genen. Op deze inperkingsniveaus en met inachtneming van de aanvullende voorschriften en in het advies genoemde voorwaarden, is de COGEM van oordeel dat de risico’s voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

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 series of loops and a final horizontal stroke.

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

Advies introductie van genen uit verschillende *Mycobacterium*-soorten in *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium marinum* en *Mycolicibacterium smegmatis*

COGEM advies CGM/250220-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met gg-*Mycobacterium*-soorten (IG 24-120). Het betreft een brede aanvraag, waarbij de aanvrager verzoekt (orthologe) genen afkomstig uit verschillende *Mycobacterium*-soorten ingedeeld in pathogeniteitsklassen 1, 2 en 3 te introduceren in een andere mycobacteriële gastheer, namelijk in *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium marinum*, *Mycobacterium* (tegenwoordig *Mycolicibacterium*) *smegmatis*, of insertie- en frameshiftmutanten hiervan. De aanvraag is afkomstig van het AMC. Het doel van het onderzoek is om de functie van de (orthologe) genen te onderzoeken in een veiliger modelorganisme en op een lager inperkingsniveau. De verworven gg-bacteriën zullen vervolgens worden gebruikt om cellen, amoebes, slijmzwammen en zebravissen (*Danio rerio*) te infecteren. De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te voeren op ML-II en DM-II met enkele aanvullende voorschriften. De COGEM is gevraagd of zij kan instemmen met dit verzoek.

2. Achtergrondinformatie mycobacteriën

Mycobacteriën zijn zuurvaste staafvormige bacteriën die tot de familie der *Mycobacteriaceae* behoren.¹ Ze beschikken over een dikke celwand met een hoog gehalte aan vetzuren, die bescherming biedt tegen uitdroging, antimicrobiële agentia, hoge temperaturen en lage zuurgraden.² Ook kunnen mycobacteriën biofilms vormen.³ Mycobacteriën komen overal voor, zoals in de bodem, in stof en in water.^{2,3,4,5} Grofweg kunnen soorten uit het genus *Mycobacterium* onderverdeeld worden in snelgroeiende soorten (bacteriën die minder dan 7 dagen nodig hebben om kolonies te vormen), en langzaam groeiende soorten (bacteriën die meer dan 7 dagen nodig hebben om kolonies te vormen).^{6,7,8} In het algemeen wordt aangenomen dat pathogene mycobacteriën langzamer groeien en gemiddeld een kleiner genoom hebben dan apathogene of opportunistische mycobacteriën.⁹ Bekende pathogene mycobacteriën zijn *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* en *Mycobacterium bovis*.

2.1 *Mycobacterium bovis* en *M. bovis* Bacillus Calmette-Guérin (BCG)

M. bovis is de hoofdveroorzaker van tuberculose in dieren, waaronder gedomesticeerde koeien. De bacterie heeft een breed gastheerbereik en kan vele zoogdieren infecteren, inclusief de mens.¹⁰ De primaire transmissieroute voor tuberculose-veroorzakende mycobacteriën is via aerosolen.^{11,12} Verspreiding van *M. bovis* via besmette stofdeeltjes en ongepasteuriseerde melkproducten is eveneens mogelijk.^{10,12,14}

Natuurlijke reservoirs van *M. bovis* zijn onder andere buidelratten ofwel voskoesoes (*Trichosurus vulpecula*), Europese dassen (*Meles meles*), kafferbuffels (*Syncerus caffer*), wilde zwijnen (*Sus scrofa*) en

herten in Noord-Amerika (*Odocoileus virginianus*).¹³ Een *M. bovis*-infectie kan zich onder gedomesticeerde koeien verspreiden door inhalatie van geïnfecteerde aerosolen van een hoestend of niezend dier met open tuberculose, of via besmette stofdeeltjes.¹⁴ In koeien vindt voornamelijk horizontale overdracht van *M. bovis* plaats.¹⁴ Humane tuberculose veroorzaakt door *M. bovis*, komt vooral voor in ontwikkelingslanden door consumptie van ongepasteuriseerde melkproducten.¹⁰ De symptomen van humane tuberculose door *M. bovis* zijn koorts, zwakheid, nachtelijk zweten en gewichtsverlies.¹⁰

Terwijl *M. bovis* een zoönotisch pathogeen is dat zowel mens als dier infecteert, veroorzaakt *M. tuberculosis* alleen tuberculose bij de mens. De genomen van *M. bovis* en *M. tuberculosis* zijn op nucleotideniveau > 99,95% identiek, maar door deleties heeft *M. bovis* een iets kleiner genoom. In het genoom zijn geen genen aangetroffen die uniek zijn voor *M. bovis*, wat erop lijkt te wijzen dat verschillen in genexpressie ten grondslag liggen aan het verschil in gastheertropisme.¹⁵

Wereldwijd wordt een geattenueerde stam van *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* 'Bacille de Calmette et Guérin' (BCG) gebruikt als vaccin tegen tuberculose.^{16,17,18} *M. bovis* BCG is in het laboratorium ontstaan door continue seriële *in vitro* passage van *M. bovis* gedurende een periode van 13 jaar.¹⁷ *M. bovis* BCG heeft in tegenstelling tot *M. bovis* geen natuurlijke niches. BCG mist de 'Region of Difference 1' (RD1) genoomsequentie, waardoor deze stam sterk geattenuerd is. Deze sequentie is aanwezig in virulente stammen van *M. tuberculosis* en *M. bovis* en codeert voor belangrijke virulentiefactoren.^{17,18} Na het ontstaan van de originele *M. bovis* BCG stam in 1921 zijn er door sub-kweken meerdere BCG sub-stammen geproduceerd die verschillen in mate van virulentie.¹⁷

2.2 *Mycobacterium marinum*

Mycobacterium marinum is een langzaam groeiende mycobacterie die veelvuldig voorkomt in het milieu. De bacterie wordt aangetroffen in oppervlaktewater maar ook in aquaria en drinkwater.¹⁹ *M. marinum* heeft een optimale groei bij temperaturen onder 35 °C en groeit slecht bij 37 °C.^{19,20} Deze mycobacterie kan een tuberculoseachtige ziekte veroorzaken bij koudbloedige dieren, zoals vissen en amfibieën. Ziekte kan langdurig en voor sommige soorten zelfs lethaal zijn.²¹

Gezonde mensen kunnen eveneens door *M. marinum* geïnfecteerd worden, voornamelijk door snijwondjes op de huid na direct contact met een geïnfecteerde vis of amfibie, of besmet aquariumwater.²² Hierbij kunnen huidinfecties ontstaan, die goed kunnen worden behandeld met tegen mycobacteriën gerichte antibiotica.

M. marinum kan zich niet verspreiden via de lucht of via menselijk contact. Fylogenetische analyses tonen een sequentiehomologie van >85% met *M. tuberculosis* op nucleotideniveau.¹⁹ Het genoom van *M. marinum* is groter dan dat van *M. tuberculosis* (~6,6 Mbp versus ~4,4 Mbp), waarbij verondersteld wordt dat de toename in genoomgrootte te maken heeft met de soort-specifieke specialisatie binnen de ecologische niche.²³

2.3 *Mycobacterium smegmatis*

M. smegmatis is voor het eerst in 1889 beschreven en is een snelgroeiende mycobacterie die wereldwijd verspreid in het milieu (bodem en water) voorkomt.^{1,24} In 2018 is op basis van een uitgebreide

fylogenetische studie voorgesteld het genus *Mycobacterium* onder te verdelen in vijf aparte genera: *Mycobacterium* (bevattende de bekende pathogenen zoals *M. bovis*, *M. leprae* en *M. tuberculosis*), *Mycobacteroides* gen. nov., *Mycolicibacillus* gen. nov., *Mycolicibacter* gen. nov. en *Mycolicibacterium* gen. nov. Op grond van de nieuwe indeling is *Mycobacterium smegmatis* hernoemd tot *Mycolicibacterium smegmatis*,^{25,26} al zijn er ook tegenstanders van deze nieuwe naamgeving.²⁷

Sinds de identificatie van *M. smegmatis* zijn een beperkt aantal infecties bij mens en dier beschreven, die enkel optreden bij individuen of dieren met een onderliggend ziektebeeld, of wanneer de eerste verdedigingsbarrière is doorbroken (trauma, chirurgische ingrepen). Zo is de bacterie enkele malen bij mens en dier (vee, hond, kat) geassocieerd met ernstige infecties van de huid en onderliggend weefsel ten gevolge van onderliggende ziektebeelden ('lipoid pneumonia', 'lymphadenopathy'), trauma, en chirurgische ingrepen,^{28,29,30,31,32,33,34} en eenmaal in verband gebracht met een systemische infectie bij een immuungecompromitteerde patiënt.³⁵

3. Voorgenomen werkzaamheden

Bij de voorgenomen werkzaamheden zullen verschillende donorsequenties geïntroduceerd worden in de wildtype organismen *M. marinum*, *M. smegmatis* en *M. bovis* BCG, of mutanten hiervan: insertiemutanten vervaardigd met Himar1 transposon³⁶ en frameshiftmutanten vervaardigd met CRISPR/Cas9³⁷. Om de donorsequenties te introduceren worden verschillende vectoren gebruikt. Met de verworven gg-mycobacteriëen zullen vervolgens (al dan niet gg-)cellen geïnfecteerd worden, alsook amoebes (*Acanthamoeba castellanii*) en slijmzwammen (genus *Dictyostelium*). Hiermee zullen onder andere fluorescentie-geactiveerde celsortering (FACS)-analyses uitgevoerd worden. Voor gg-*M. marinum* zullen daarnaast ook experimenten in (al dan niet gg-)zebravissen (*Danio rerio*) plaatsvinden.

De donorsequenties die gebruikt zullen worden verschillen per gastheer. Voor *M. bovis* BCG en *M. marinum* zullen uitsluitend orthologe donorsequenties toegevoegd worden. De aanvrager spreekt van een orthologe donorsequentie wanneer het geproduceerde eiwit in de gastheer en in het donororganisme een aminozuursequentiehomologie van meer dan 65% van over de gehele lengte van het eiwit heeft. Wanneer de sequentiehomologie lager is, hanteert de aanvrager een beslisboom om te bepalen of een gedeelte van de sequentie geïntroduceerd kan worden. In de volgende paragraaf zal de beslisboom nader worden toegelicht. Voor *M. smegmatis* is de aminozuursequentiehomologie niet bepalend, en kunnen ook niet-orthologe mycobacteriële genen in dit organisme geïntroduceerd worden. Hieronder wordt voor de verschillende gastheren verder gespecificeerd aan welke eisen de donorsequenties dienen te voldoen, en is aangegeven van welk donororganisme de sequenties afkomstig zullen zijn.

3.1 Orthologe donorsequenties in *M. bovis* BCG en *M. marinum*

In de gastheer *Mycobacterium bovis* BCG (of insertie- of frameshiftmutanten hiervan) zullen orthologe mycobacteriële genen afkomstig van *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. marinum*, en *M. smegmatis* geïntroduceerd worden. In de gastheer *Mycobacterium marinum* (en insertie- of frameshiftmutanten

hiervan) worden orthologe genen afkomstig van *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. marinum*, *M. abscessus*, *M. xenopi* en *M. smegmatis* geïntroduceerd.

Daarnaast kunnen ook antibioticaresistentiegenen voor kanamycine, hygromycine, zeocine of streptomycine geïntroduceerd worden in de gastheren.

De orthologe genen zullen meestal als enkel gen geïntroduceerd worden, maar ook kunnen meerdere orthologe genen als operon (coderend voor meerdere eiwitten) geïntroduceerd worden. Om te bepalen welke orthologe genen in *M. marinum* en *M. bovis* BCG kunnen worden geïntroduceerd, wordt een beslisboom gehanteerd. Een donorsequentie mag geïntroduceerd worden als over de gehele lengte van het eiwit een aminozuursequentiehomologie vastgesteld is van >65%, bepaald door middel van FASTA-analyse. Als de homologie lager is, wordt gekeken of het eiwit meerdere domeinen heeft en worden alleen eiwitdomeinen met >65% homologie geïntroduceerd. Hierbij zal het eiwitdomein van de gastheer vervangen worden door het orthologe domein van de donor waarmee homologie is vastgesteld. Een eiwitdomein is door de aanvrager gedefinieerd als een specifiek gebied of segment van de polypeptideketen dat een aparte functionele of structurele eenheid vormt. De niet-homologe domeinen van het eiwit dienen afwezig of niet-functioneel te zijn bij introductie. Of een domein niet-functioneel is zal op basis van literatuur of experimenten met het donororganisme bepaald worden. Als deze informatie niet beschikbaar is, zal het domein niet geïntroduceerd worden.

In de aanvraag is expliciet vermeld dat orthologe genen die coderen voor toxines zijn uitgezonderd. Alleen introductie van de orthologe donorsequentie die codeert voor het toxine CpnT, wordt toegestaan, mits het eiwit gedetoxificeerd is door middel van mutaties in de aminozuursequentie. De aanvrager verwijst hiervoor naar een publicatie waarin beschreven is dat twee puntmutaties in het C-terminale domein van CpnT (H792N en Q822K) voor inactivatie van dit katalytische domein zorgen.³⁸ Orthologe virulentiegenen kunnen onder deze aanvraag wel worden geïntroduceerd.

3.2 Mycobacteriële donorgensequenties in *M. smegmatis*

Voor de gastheer *Mycobacterium smegmatis* (of insertie- of frameshiftmutanten hiervan) wordt geen beslisboom gehanteerd en worden ook niet-orthologe donorgensequenties toegevoegd. In deze gastheer kunnen verschillende mycobacteriële genen geïntroduceerd worden afkomstig van *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. leprae*, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. avium*, *M. abscessus* en *M. xenopi*. Genen die die coderen voor toxines zijn uitgezonderd. Virulentiegenen kunnen wel worden geïntroduceerd. Ook kunnen in deze gastheer antibioticaresistentiegenen voor kanamycine, hygromycine, zeocine of streptomycine geïntroduceerd worden.

3.3 Aanvullende voorschriften bij de werkzaamheden

De aanvrager verzoekt de werkzaamheden uit te mogen voeren op inperkingsniveau ML-II, en op DM-II voor activiteiten met gg-*M. marinum* in zebravissen (*D. rerio*). Hierbij worden de aanvullende voorwaarden in acht genomen voor ggo's die zich aerogeen, oro-fecaal of oraal kunnen verspreiden, infectieus zijn via wondjes van de huid, en die zich via gebruiksvoorwerpen (fomites) kunnen verspreiden, zoals vermeld in Bijlage 9 van de Regeling ggo.³⁹

- a. Tijdens de werkzaamheden worden handschoenen tot over de mouw van de werkkleding gedragen;
- b. Open handelingen worden in een veiligheidskabinet van klasse II uitgevoerd.

Naast verschillende cellijnen worden de gg-mycobacteriën ook toegediend aan de amoebe *Acanthamoeba castellanii* (pathogeniteitsklasse 2⁴⁰) en amoebe/slijmzwam *Dictyostelium* spp. (pathogeniteitsklasse 1⁴¹). Voor werkzaamheden met *A. castellanii* op ML-II worden daarnaast nog enkele aanvullende maatregelen beschreven:

- a. De kweek vindt plaats in sporendichte containers;
- b. Brildragers dragen een bril of veiligheidsbril over contactlenzen;
- c. Voor activiteiten met FACS apparatuur wordt daarnaast het standaard aanvullende voorschrift gehanteerd dat de FACS apparatuur dusdanig is geconstrueerd, dat verspreiding van aerosolen wordt voorkomen.

Voor experimenten met gg-*M. marinum* in *D. rerio* worden op inperkingsniveau DM-II de volgende extra aanvullende maatregelen gehanteerd:

- a. De proefdieren worden gehouden in aquaria die voorzien zijn van een afsluitbaar deksel om verspreiding van aërosolen te voorkomen;
- b. De aquaria worden niet aangesloten op een doorstroomsysteem;
- c. Onder de aquaria bevinden zich lekbakken welke de gehele inhoud van het aquarium kunnen opvangen;
- d. Tijdens de werkzaamheden wordt een waterdicht schort gedragen;
- e. Tijdens de werkzaamheden wordt waterdicht schoeisel gedragen.

4. Eerdere COGEM adviezen

De COGEM heeft *Mycobacterium marinum* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 2.⁴² *Mycobacterium smegmatis* is als opportunistisch pathogeen ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1.^{42,43} *Mycobacterium bovis* BCG is niet in de pathogeniteitsclassificatielijsten van de COGEM opgenomen, maar is in de Regeling ggo geclassificeerd als klasse 2 pathogeen.⁴⁴ De mycobacteriumsoorten waar de verscheidene donorsequenties van afkomstig zijn, zijn ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3 (*M. bovis*, *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. leprae*), of pathogeniteitsklasse 2 (*M. avium*, *M. abscessus*, *M. xenopi*).⁴²

De COGEM heeft eerder geadviseerd over de inschaling van vaccinatiewerkzaamheden in makaken met twee recombinante *M. bovis* BCG stammen. Het betreft zogeheten ‘endosomal escape’ varianten, die een sterkere immuniserende werking hebben.⁴⁵ De COGEM beschouwde beide gg-BCG stammen sterker geattenuëerd ten opzichte van de BCG ouderstam, en heeft geadviseerd dat de voorgenomen werkzaamheden op ML-I/DM-I niveau uitgevoerd konden worden. Een gg-BCG stam die het *listeriolysine* gen tot expressie brengt is gebruikt voor een klinische studie in patiënten met blaaskanker.⁴⁶ De COGEM beschouwde deze gg-BCG stam als verzwakt ten opzichte van de ouderstam en apathogeen voor mens en dier en oordeelde dat de milieurisico's verbonden aan deze klinische studie verwaarloosbaar klein zijn. Daarnaast heeft zij geadviseerd over werkzaamheden met gg-*M. bovis* BCG waarin het PGL-1 gen is uitgewisseld met dat van *M. leprae*.⁴⁷ Op basis van de aangeleverde informatie kon de COGEM niet uitsluiten dat het uitwisselen van virulentiegen PGL-1 van

M. leprae in *M. bovis* BCG mogelijk een verhoging van de pathogeniteit van *M. bovis* BCG tot gevolg heeft. Zij adviseerde deze werkzaamheden uit te voeren op inperkingsniveau ML-III.

Ook is geadviseerd over werkzaamheden met gg-*M. smegmatis* stammen, waarin niet nader gedefinieerde gekarakteriseerde genen coderend voor DNA-replicatie en hersteleiwitten van verschillende mycobacteriumsoorten uit pathogeniteitsklasse 1, 2 en 3 geïntroduceerd worden. COGEM adviseerde de introductie van de betreffende genen uit een mycobacteriumsoort ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1 uit te voeren op ML-I. Introductie van deze genen uit mycobacteriën ingedeeld in klasse 2 en 3 adviseerde de COGEM op ML-II uit te voeren, omdat op voorhand niet uit te sluiten was dat er bij het tot expressie brengen van deze genen een toename in pathogeniteit van de opportunistisch pathogeen *M. smegmatis* kan optreden.⁴³

5. Overweging

De aanvrager is voornemens donorgensequenties uit verschillende mycobacteriumsoorten ingedeeld in pathogeniteitsklasse 1, 2 of 3 in de gastheren *M. marinum*, *M. bovis* BCG en *M. smegmatis* (of insertie- en frameshiftmutanten hiervan) te insereren. In de gastheren *M. marinum* en *M. bovis* BCG worden enkel orthologe donorgensequenties geïnsereerd om een mycobacterieel eiwit of eiwitdomein in de gastheer tot expressie te brengen. In de opportunist *M. smegmatis* kunnen ook niet-orthologe mycobacteriële donorgensequenties geïnsereerd worden. Introductie van toxines is niet toegestaan, met uitzondering van de introductie van de orthologe sequentie die codeert voor het gedetoxificeerde toxine CpnT in de gastheren *M. marinum* en *M. bovis* BCG. Daarnaast kunnen antibioticaresistentiegenen voor zeocine, kanamycine, hygromycine of streptomycine geïntroduceerd worden.

De COGEM merkt op dat de aanvraag alleen betrekking heeft op introductie van gensequenties (al dan niet gebaseerd op aminozuursequentiehomologie) en niet op uitwisseling van niet-coderende DNA-sequenties (inclusief promotoren).

Het doel van de experimenten is om de functie van verschillende mycobacteriële genen in een veiligere gastheer te onderzoeken. Omdat de donorsequenties niet verder gespecificeerd worden, is de aanvraag zeer breed. Zo kunnen ook virulentiefactoren geïntroduceerd worden in de gastheren. Volgens de Regeling ggo dienen activiteiten waarbij schadelijke donorsequenties worden gebruikt in gastheren uit PG2 (i.e., *M. bovis* BCG en *M. marinum*) ingeschaald te worden op ML-III, waarbij indien afdoende is onderbouwd dat de donorsequentie niet in een schadelijk effect resulteert, deze ook op ML-II kunnen worden ingeschaald.

Werkzaamheden waarbij een schadelijk genproduct geïntroduceerd wordt in een apathogeen micro-organisme (i.e., *M. smegmatis*) worden volgens de Regeling ggo standaard ingeschaald op ML-II niveau.

De aanvrager levert een onderbouwing aan waarom inschaling op ML-II en DM-II voor deze activiteiten gerechtvaardigd is. De COGEM is gevraagd of zij op basis van de aangeleverde criteria en onderbouwing van de aanvrager in kan stemmen met het voorgestelde inperkingsniveau.

5.1 Introductie van orthologe genen

De aanvrager hanteert een cut-off waarde van >65% homologie over de gehele lengte van het eiwit om een donorsequentie als ortholoog aan te merken. Als de homologie lager is, worden enkel eiwitdomeinen met >65% homologie geïntroduceerd. De aanvrager baseert dit op een gepubliceerd artikel waarin een ortholoog gen is gedefinieerd als een identiteit van meer dan 80% aminozuren over 30% of meer van de lengte van beide sequenties bij een FASTA-analyse.¹⁹

Orthologe genen kunnen verschillen in functie door bijvoorbeeld de aanwezigheid van een extra eiwitdomein of een andere enzymspecificiteit, of door verschillen in post-transcriptionele modificatie. Dit zou van invloed kunnen zijn op onder andere het metabolisme en de virulentie van de gastheer. Een beperkte verandering van de eigenschappen van de bacterie na introductie van de orthologe genen ligt daarom in lijn der verwachting.

Onder de aangevraagde vergunning kunnen orthologe gensequenties op domeinniveau geïntroduceerd worden. De COGEM is van oordeel dat de introductie van een orthologe sequentie op domeinniveau geen wezenlijk groter risico vormt dan de introductie van het volledige gen. Niet-homologe domeinen mogen volgens de aanvrager alleen geïntroduceerd worden als deze niet-functioneel zijn, gebaseerd op informatie in de wetenschappelijke literatuur of experimenten met het donororganisme. De COGEM merkt op dat in sommige gevallen de functie van het eiwitdomein beschreven zal zijn, maar indien niet bekend is welke functie het domein heeft, het op basis van experimenteel onderzoek niet altijd eenvoudig te achterhalen zal zijn of het eiwit daadwerkelijk niet-functioneel is. Omgevingsfactoren kunnen een grote rol spelen in het bepalen van de functie van het eiwit en ook dient gelet te worden op 'protein moonlighting', waarbij hetzelfde eiwit verschillende functies kan hebben in hetzelfde organisme.⁴⁸

Introductie van orthologe sequenties die coderen voor toxines zijn niet toegestaan, met uitzondering van een gedetoxificeerd CpnT (zie paragraaf 5.2). Introductie van orthologe virulentiegenen is in deze aanvraag wel toegestaan. Het effect van het tegelijkertijd inbrengen van verschillende (orthologe) virulentiegenen in een gastheer is niet altijd goed voorspelbaar. De aanvrager geeft aan dat orthologe genen meestal als enkel gen geïntroduceerd zullen worden, maar dat ook meerdere orthologe genen als operon (coderend voor meerdere eiwitten) geïntroduceerd kunnen worden. Volgens de aanvrager maakt het voor de risicobeoordeling geen verschil of er een enkel gen of meerdere orthologe genen uitgewisseld zullen worden.

Om de functionaliteit van een (ortholoog) gen in een operon te bestuderen, is het soms noodzakelijk om meerdere genen uit het operon te introduceren. In deze gevallen kan het operon gezien worden als functionele unit, waarbij de genen in het operon vaak co-gereguleerd zijn. De COGEM is van oordeel dat het risico van de introductie van meerdere genen in een operon of een volledig operon dat fungeert als een functionele eenheid, bij deze vergunningaanvraag vergelijkbaar is met introductie van een enkel gen met dezelfde functie. De COGEM merkt hierbij wel op dat bij de introductie van meerdere genen deze in de gastheer ook op hetzelfde operon dienen te liggen. Het introduceren van een operon waarin meerdere (virulentie)genen zijn gekloneerd die van oorsprong niet uit één operon afkomstig

zijn, of het introduceren van meerdere operons, dient uitgesloten te worden van de werkzaamheden omdat hiermee het risico op het verkrijgen van een virulentere gastheer toeneemt.

Tevens adviseert de COGEM dat uitgesloten moet worden dat tegelijkertijd of achtereenvolgend meerdere (niet in een operon gelegen) virulentiegenen geïntroduceerd worden, waarmee een steeds virulentere stam ontwikkeld kan worden.

Daarnaast adviseert de COGEM dat het inbrengen van een ortholoog operon dat codeert voor een volledig 'pathogen-associated genomic island' (met bijvoorbeeld ESX-genen) uitgesloten moet worden, omdat dit een groter effect kan hebben op de virulentie. Er kan namelijk niet worden uitgesloten dat hierdoor extra kopieën van het 'pathogen-associated genomic island' in de gastheer geïntroduceerd worden (indien de gastheer zelf ook al over een vergelijkbaar 'pathogen-associated genomic island' beschikt), of dat er frame-shift mutaties aanwezig zijn in de individuele genen van een 'pathogen-associated genomic island' van het donororganisme, dat in beide gevallen mogelijk grote verschillen in virulentie van de gastheer kan veroorzaken.^{49,50}

De COGEM is van oordeel dat introductie van de genoemde antibioticaresistentiegenen geen invloed zal hebben op de geattenueerde fenotypes van de gastheren. Daarnaast spelen de antibiotica geen rol bij de behandeling van tuberculose, of bij infectie door *M. marinum*.^{51,52}

5.2 Orthologe genen in *M. bovis* BCG

De orthologe gensequenties zullen geïntroduceerd worden in gastheren *M. bovis* BCG en *M. marinum* of insertie- en frameshiftmutanten hiervan. *M. bovis* BCG is geattenuëerd door deletie van het RD1 locus dat codeert voor het ESX-1 secretiesysteem. Dit secretiesysteem is betrokken bij het transport van eiwitten die bijdragen aan de overleving van de (myco)bacterie in de gastheercel.⁵³ Het ESX-1 systeem in *M. tuberculosis* is belangrijk voor de resistentie tegen, of ontwijking van afweerreacties van de gastheer. Een deel van het *esx-1* locus bevindt zich in het gebied van RD1, waardoor in *M. bovis* BCG niet het volledige ESX-1 systeem aanwezig is. De afwezigheid van dit systeem is een factor in de attenuatie van deze vaccinstam.⁵³ Aangezien er geen ESX-1 ortholoog in *M. bovis* BCG aanwezig is, en in deze adviesvraag alleen orthologe genen worden geïntroduceerd, is complementeren met een functioneel ESX-1 systeem in *M. bovis* BCG niet toegestaan.

De COGEM acht het onwaarschijnlijk dat het defect in ESX-1 in *M. bovis* BCG gecompenseerd kan worden door de introductie van orthologe genen. De COGEM acht het tevens onwaarschijnlijk dat de introductie van een enkel ortholoog gen of operon in *M. bovis* BCG bij afwezigheid van het RD-1 locus tot een sterk verhoogde virulentie zal leiden. Bovendien vertonen bestaande *M. bovis* BCG stammen reeds verschillen in virulentie.⁵⁴ In een eerder advies over een andere vergunningaanvraag heeft de COGEM aangegeven dat het uitwisselen van het virulentiegen PGL-1 van *M. leprae* in *M. bovis* BCG mogelijk een verhoging van de pathogeniteit van *M. bovis* BCG tot gevolg heeft. De aanvrager stelt dat in de huidige vergunningaanvraag een dergelijke complementatie volgens de beslisboom niet is toegestaan, omdat PGL-1 van *M. leprae* geen 65% gelijkenis heeft met PGL in *M. bovis* en er dus geen sprake is van een ortholoog gen.

5.3 Orthologe genen in *M. marinum*

Voor gastheer *M. marinum* stelt de aanvrager dat de virulentie van deze mycobacteriumsoort beperkt is door gevoeligheid voor hogere temperaturen. In experimenten van de aanvrager konden er met 'gesatureerde (>10x) transposon mutagenese' geen mutanten gegenereerd worden die bij 37 °C groeien. Ook verspreidt *M. marinum* zich volgens de aanvrager niet via aerosolen, maar alleen via contactbesmetting. De aanvrager acht de kans dat door introductie van een (virulentie)gen van een pathogene mycobacterium-soort deze temperatuurgevoeligheid, of de methode van transmissie verandert, verwaarloosbaar klein tot niet bestaand.

M. marinum is een pathogeen van koudbloedige dieren en groeit nauwelijks bij 37 °C. Wel is er tussen *M. marinum* en *M. tuberculosis* een sterke sequentiehomologie met betrekking tot virulentiefactoren, en is geconserveerde functie aangetoond.⁵⁵ De COGEM kan niet geheel uitsluiten dat door introductie van orthologe genen die betrokken zijn bij de temperatuurgevoeligheid (zoals 'heat shock' genen, of andere genen betrokken bij het opvangen van 'heat stress') mogelijk een verandering in het temperatuur-groeibereik van *M. marinum* op kan treden. Hierdoor zou een bacterie met een op *M. tuberculosis* gelijkend virulentiemechanisme met groei bij 37 °C kunnen ontstaan. Een verandering in de transmissiewijze van *M. marinum* door introductie van een enkel ortholoog gen of meerdere orthologe genen (operon) acht de COGEM onwaarschijnlijk. Echter, indien introductie van een ortholoog gen of operon de temperatuurgevoeligheid van *M. marinum* zou verminderen waardoor longinfecties mogelijk worden, zou een veranderde transmissiewijze niet geheel uitgesloten kunnen worden. De COGEM adviseert daarom introductie van orthologe genen die een vermindering van de temperatuurgevoeligheid tot stand kunnen brengen, uit te sluiten.

Het introduceren van orthologe sequenties die coderen voor toxines in gastheren *M. bovis* BCG en *M. marinum* is uitgesloten in deze aanvraag, met uitzondering van het toxine CpnT dat gedetoxificeerd dient te zijn. De aanvrager stelt dat detoxificatie plaats zal vinden door middel van mutaties in de aminozuursequentie zoals beschreven in de wetenschappelijke literatuur.³⁸ De COGEM is van oordeel dat met deze mutaties de detoxificatie van CpnT voldoende onderbouwd is.

5.4 Introductie van mycobacteriële genen in *M. smegmatis*

In de gastheer *M. smegmatis* zullen mycobacteriële genen geïntroduceerd worden (uitgezonderd toxines), waarbij geen rekening wordt gehouden met de mate van aminozuursequentiehomologie. Volgens de aanvrager wordt het apathogene karakter van *M. smegmatis* bepaald door de afwezigheid van 'phthiocerol dimycocerosates' (PDIM-)lipiden en aanwezigheid van porines (MspA, MspB, MspC en MspD). Porines zijn betrokken bij de diffusie van nutriënten in de cel. Er is beschreven dat expressie van MspA afkomstig van *M. smegmatis* in *M. tuberculosis* de pathogeniteit vermindert.⁵⁶ Door de afwezigheid van PDIM-lipiden en de aanwezigheid van de porines in *M. smegmatis* is de uitvoerder van mening dat expressie van eiwitten van pathogene mycobacteriën (of een transposon) niet zal leiden tot een verhoging van de pathogeniteit van *M. smegmatis*.

PDIM-lipiden zijn complexe lipiden die aangetroffen worden in de celwand van pathogene, langzaam-groeiende mycobacteriën, waaronder *M. tuberculosis* en *M. marinum*, en dragen onder andere bij aan het overleven in macrofagen.⁵⁷ Introductie van het PDIM-gencluster in *M. smegmatis* wordt niet uitgesloten

in de aanvraag. Er kan niet geheel uitgesloten worden dat introductie van het PDIM-gencluster mogelijk zou kunnen leiden tot PDIM-synthese en daarmee kunnen bijdragen aan de overleving in macrofagen. Ook kan niet geheel uitgesloten worden dat expressie van porines beïnvloed wordt door introductie van additionele genen. Daarnaast is aangetoond dat expressie van verschillende *M. tuberculosis* eiwitten in *M. smegmatis* leidt tot verandering van cytokine productie en orgaanpathologie, snellere groei en betere overleving van de bacterie in muismacrofagen.^{58,59,60} De COGEM kan derhalve niet uitsluiten dat er bij introductie van mycobacteriële genen in *M. smegmatis* sprake kan zijn van een virulentieverhogend effect.

In het dossier is niet duidelijk aangegeven of de restrictie tot de introductie van een enkel gen of operon ook geldt voor de experimenten met *M. smegmatis*. Omdat het effect van het tegelijkertijd of achtereenvolgend inbrengen van verschillende mycobacteriële virulentiegenen die niet uit één operon afkomstig zijn, niet altijd goed voorspelbaar is, adviseert de COGEM de gecombineerde introductie van verschillende virulentiegenen of genen met verschillende of onbekende functies in *M. smegmatis* (zoals het PIMD-cluster in combinatie met PPE-eiwitten) uit te sluiten. Ook voor *M. smegmatis* adviseert de COGEM dat het inbrengen van een ortholoog operon dat codeert voor een volledig ‘pathogen-associated genomic island’, of het introduceren van meerdere operons, uitgesloten moet worden. Onder deze voorwaarden is de COGEM van oordeel dat een mogelijke virulentieverhoging niet dusdanig zal zijn dat een hoger inperkingsniveau vereist is.

6. Advies

Bij de voorgenomen werkzaamheden zullen al-dan-niet orthologe mycobacteriële gensequenties afkomstig van organismen uit pathogeniteitsklassen 1, 2 of 3 in drie laagpathoge gastheren (*M. bovis* BCG, *M. marinum* en *M. smegmatis*) geïntroduceerd worden. Introductie van dergelijke gensequenties kan voor verschillen in eigenschappen van de gastheren zorgen, waarbij ook een licht verhoogde virulentie niet uitgesloten kan worden. Er is echter geen reden om aan te nemen dat onder de in het advies gestelde voorwaarden deze laagpathogene gastheren hoogpathogeen zullen worden. Daarnaast wordt het potentiële milieurisico van het veranderen van de eigenschappen van de gastheer ondervangen door het nemen van aanvullende maatregelen op inperkingsniveaus ML-II en DM-II om de kans op verdere verspreiding te minimaliseren.

Al het bovenstaande in overweging nemende, kan de COGEM instemmen met een inschaling op inperkingsniveau ML-II en DM-II voor de voorgenomen werkzaamheden waarbij één of meerdere (uit één operon afkomstig) orthologe mycobacteriële genen (of orthologe gensequenties coderend voor een eiwitdomein) met de genoemde beperkingen geïntroduceerd worden in gastheren *M. bovis* BCG en *M. marinum* (of insertie- en frameshiftmutanten hiervan), en waarbij verdere activiteiten met de verworven gg-mycobacteriën uitgevoerd worden in cellen, amoebes of slijmzwammen. Zij adviseert hierbij de door de aanvrager genoemde aanvullende voorschriften in acht te nemen, en enkele aanvullende voorwaarden te hanteren:

- Er vindt introductie plaats van één gen of meerdere genen in de vorm van een operon, met maximale introductie van één volledig natuurlijk operon;

- Het introduceren van een operon waarin meerdere (virulentie)genen zijn gekloneerd die van oorsprong niet uit één operon afkomstig zijn, wordt uitgesloten;
- Het achtereenvolgend introduceren van diverse virulentiegenen met verschillende of onbekende functie wordt uitgesloten;
- Introductie van een operon coderend voor een volledig 'pathogenicity-associated genomic island' wordt uitgesloten;
- Voor *M. marinum* wordt introductie van orthologe genen die een vermindering van de temperatuurgevoeligheid tot stand kunnen brengen, uitgesloten.

De COGEM kan ook instemmen met een inschaling op inperkingsniveau ML-II voor de voorgenomen werkzaamheden waarbij mycobacteriële genen geïntroduceerd worden in gastheer *M. smegmatis* (of insertie- en frameshiftmutanten hiervan), en waarbij verdere activiteiten met de verworven gg-mycobacteriën uitgevoerd worden in cellen, amoebes of slijmzwammen. Hierbij dienen de genoemde aanvullende voorschriften in acht genomen te worden adviseert de COGEM daarnaast enkele aanvullende voorwaarden te hanteren:

- Er vindt introductie plaats van één gen of meerdere genen in de vorm van een operon, met maximale introductie van één volledig natuurlijk operon;
- Het introduceren van een operon waarin meerdere (virulentie)genen zijn gekloneerd die van oorsprong niet uit één operon afkomstig zijn, wordt uitgesloten;
- Het achtereenvolgend introduceren van diverse virulentiegenen met verschillende of onbekende functie wordt uitgesloten;
- Introductie van een operon coderend voor een volledig 'pathogenicity-associated genomic island' wordt uitgesloten.

Op deze inperkingsniveaus en met inachtneming van de aanvullende voorschriften en genoemde voorwaarden, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN). <https://lpsn.dsmz.de/genus/mycobacterium> (bezocht: 4 februari 2025)
2. Saier MH (2009). Cell structure chemical composition. In: Encyclopedia of Microbiology. Third edition. Ed. Schaechter M, Academic Press, Elsevier, Oxford (UK)
3. De Groote MA & Huitt G (2006). Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clin. Infect. Dis. 42: 1756-1763
4. Marsheck WJ *et al.* (1972). Microbial degradation of sterols. App. Microbiol. 23: 72-77
5. Tsukamura M *et al.* (1983). Numerical taxonomy of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria of the *Mycobacterium parafortuitum* complex: *Mycobacterium austroafricanum* sp. nov. and *Mycobacterium diernhoferi* sp. nov., nom. Rev. Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 460-469
6. Wayne LG & GP Kubica (1986). Mycobacteria. In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. Sneath PHA (ed.). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md

7. Wayne LG & Sramek A (1992). Agents of newly recognized or infrequently encountered mycobacterial diseases. Clin. Microbiol. Rev. 5:1-25
8. Howard ST & Byrd TF (2000). The rapidly growing mycobacteria: saprophytes and parasites. Microbes and Infection 2: 1845-1853
9. Rahman SA *et al.* (2014). Comparative analyses of nonpathogenic, opportunistic, and totally pathogenic mycobacteria reveal genomic and biochemical variabilities and highlight the survival attributes of *Mycobacterium tuberculosis*. MBio. 5. doi: 10.1128/mBio.02020-14
10. Esteban J & Muñoz-Egea MC (2016). *Mycobacterium bovis* and other uncommon members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Microbiol. Spectr. doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0021-2016
11. Martinez L *et al.* (2019). Detection, survival and infectious potential of *Mycobacterium tuberculosis* in the environment: a review of the evidence and epidemiological implications. Eur. Respir. J. 53: 1802302
12. Shiloh MU (2016). Mechanisms of mycobacterial transmission: how does *Mycobacterium tuberculosis* enter and escape from the human host. Future Microbiol. 11: 1503-1506
13. Palmer MV (2013). *Mycobacterium bovis*: characteristics of wildlife reservoir hosts. Transbound. Emerg. Dis. 60: 1-13
14. Cousins DV (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. Rev. Sci. Tech. 20: 71-85
15. Garnier T *et al.* (2003). The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc. Natl. Acad. Sci 100: 7877-7882
16. Fatima S *et al.* (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. Life Sci. 252: 117594
17. Liu J *et al.* (2009). BCG vaccines: their mechanisms of attenuation and impact on safety and protective efficacy. Hum. Vaccin. 5: 70-78
18. Mahairas GG *et al.* (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. J. Bacteriol. 178: 1274-1282
19. Stinear TP *et al.* (2008). Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Genome Res. 18: 729-741
20. Clark HF & Shepard CC (1963). Effect of environmental temperatures on infection with *Mycobacterium marinum* (balnei) of mice and a number of poikilothermic species. J. Bacteriol. 86: 1057-1069
21. Decostere A *et al.* (2004). Piscine mycobacteriosis: a literature review covering the agent and the disease it causes in fish and humans. Vet. Microbiol. 99: 159-166
22. Petrini B (2006). *Mycobacterium marinum*: ubiquitous agent of waterborne granulomatous skin infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 25:609-613
23. Stamm LM & Brown EJ (2004). *Mycobacterium marinum*: the generalization and specialization of a pathogenic mycobacterium. Microbes and Infection 6: 1418-1428
24. Trevisan V (1889). I generi e la specie dell Batteriacee. Zanaboui e Gabuzzi: 14
25. Gupta RS *et al.* (2018). Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus mycobacterium into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera. Front. Microbiol. 9: 67
26. Ohren A & Garrity G (2018). List of new names and new combinations previously effectively, but not validly, published. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68: 1411-1417
27. Tortoli E *et al.* (2019). Same meat, different gravy: ignore the new names of mycobacteria. Eur. Respir. J. 54: 1900795
28. Brown-Elliott BA & Philley JV (2017). Rapidly growing mycobacteria. Microbiol. Spectr. 5. doi: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0027-2016.
29. Bercovier H & Vincent V (2001). Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. Jcansasii*, *M. simiae* and *M. genavense*. Rev. Sci. Tech. 20: 265-290

30. Brown-Elliott BA & Wallace RJ (2002). Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. Clin. Microb. Rev. 15: 716-746
31. Malik R et al. (2000). Infection of the subcutis and skin of cats with rapidly growing mycobacteria: a review of microbiological and clinical findings. J. Feline Med. Surg. 2: 350-48
32. Malik R et al. (2004). Infections of the subcutis and skin of dogs caused by rapidly growing mycobacteria. J. Small Anim. Pract. 45: 485-494
33. Sigueira SM et al. (2016). Identification of *Mycobacterium smegmatis* in bovine mastitis. Acta Scientiae Veterinariae 44: 166-170
34. Ergon B et al. (2004). *Mycobacterium smegmatis* pneumonia. Respirology 9: 283-285
35. Pierre-Audigier C et al. (1996). Fatal disseminated *Mycobacterium smegmatis* infection in a child with inherited γ interferon receptor deficiency. Clin. Infect. Dis. 24: 982-984
36. Rubin EJ et al (1999). In vivo transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1645-1650
37. Meijers AS et al. (2020). Efficient genome editing in pathogenic mycobacteria using *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9. Tuberculosis 124: 1019-83
38. Sun J et al. (2015). The Tuberculosis Necrotizing Toxin kills macrophages by hydrolyzing NAD. Nat. Struct. Mol. Biol. 22: 672-678
39. Regeling ggo milieubeheer 2013. Bijlage 9 <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2025-01-01#Bijlage9> (bezocht op: 4 februari 2025)
40. Regeling ggo milieubeheer 2013. Bijlage 4 <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2025-01-01#Bijlage4> (bezocht op: 4 februari 2025)
41. Regeling ggo milieubeheer 2013. Bijlage 2 <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2025-01-01#Bijlage2> (bezocht op: 4 februari 2025)
42. COGEM (2024). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten van (a)pathogene bacteriën. COGEM advies CGM/241127-02
43. COGEM (2018). Heroverweging pathogeniteitsclassificatie *Mycobacterium (Mycobacterium) smegmatis* en inschaling van werkzaamheden met twee *M. smegmatis* stammen. COGEM advies CGM/180913-01
44. Regeling ggo milieubeheer 2013. wetten.nl - Regeling - Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - BWBR0035072 (overheid.nl)
45. COGEM (2007). Inschaling van vaccinatie van makaken met de genetisch gemodificeerde *Mycobacterium bovis* stam Calmette-Guérin. COGEM advies CGM/070402-05
46. COGEM (2018). Klinische studie met genetisch gemodificeerd *Mycobacterium bovis* BCG in patiënten met blaaskanker. COGEM advies CGM/180111-01
47. COGEM (2022). Inschaling infectiewerkzaamheden met recombinant *Mycobacterium bovis* BCG-PGL-I. COGEM advies CGM/220530-01
48. Jeffrey CJ (2017). Protein moonlighting: what is it, and why is it important? Phil. Trans. R. Soc. B 373: 20160523
49. Casali N & Riley LW (2007). A phylogenomic analysis of the Actinomycetales mce operons. BMC Genomics 8: 60
50. Shimonono N et al. (2003). Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the mce1 operon. Proc. Natl. Acad. Sci. 100: 15918-15923
51. Zorginstituut Nederland. Farmaceutisch kompas - Indicaties.
<https://www.farmacotherapeutischkompas.nl/bladeren/indicatieteksten/tuberculose> (bezocht: 13 februari 2025)

52. Aubry A *et al.* (2000). Antibiotic susceptibility pattern of *Mycobacterium marinum*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44: 3133-3136
53. Gröschel MI *et al.* (2016). ESX secretion systems: mycobacterial evolution to counter host immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 677-691
54. Leung AS *et al.* (2008). Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics* 9: 413
55. Tobin DM & Ramakrishnan L (2008). Comparative pathogenesis of *Mycobacterium marinum* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 10: 1027-1039
56. Lamrabet O *et al.* (2014). MspA-*Mycobacterium tuberculosis*-transformant with reduced virulence: The “unbirthday paradigm”. *Microbial Pathogenesis* 76: 10-18
57. Rens C *et al.* (2021). Roles for phthiocerol dimycocerosate lipids in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Microbiology* 167: 001042
58. Mi Y *et al.* (2017). *Mycobacterium tuberculosis* PPE25 and PPE26 proteins expressed in *Mycobacterium smegmatis* modulate cytokine secretion in mouse macrophages and enhance mycobacterial survival. *Res. Microbiol.* 168: 234-243
59. Peng X *et al.* (2019). PPE11 of *Mycobacterium tuberculosis* can alter host inflammatory response and trigger cell death. *Microbial Pathogenesis* 126: 45-55
60. Li Z *et al.* (2019). PE17 protein from *Mycobacterium tuberculosis* enhances *Mycobacterium smegmatis* survival in macrophages and pathogenicity in mice. *Microbial Pathogenesis* 126: 63-73