

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

DATUM 15 juli 2025
KENMERK CGM/250715-01
ONDERWERP Advies Inschaling vaccinatieproeven op makaken met tuberculose-stam MTBVAC

Geachte heer Aartsen,

Naar aanleiding van een vergunningaanvraag (IG 250030_001) getiteld 'Verzoek om lagere inschaling pathogeniteitsklasse MTBVAC, een MTB stam met deletie van *phoP* en *fadD26*, gecombineerd met het verzoek om inschaling van de categorie fysische inperking van de handelingen met dieren met MTBVAC op DM-II' afkomstig van de stichting Biomedical Primate Research Centre (BPRC), deelt de COGEM u het volgende mee.

Samenvatting:

De COGEM is gevraagd te adviseren over werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde tuberculosebacterie (*Mycobacterium tuberculosis*) MTBVAC. De aanvrager wil MTBVAC via een beademingssysteem met een vernevelaar toedienen aan makaken en vervolghandelingen zoals bloedafname uitvoeren op inperkingsniveau DM-II.

MTBVAC bevat mutaties die de schadelijkheid van de bacterie sterk verminderen ten opzichte van de normale tuberculosebacterie. Uit verschillende dier- en humane studies blijkt dat MTBVAC veilig is. De aangebrachte mutaties in MTBVAC zouden theoretisch alleen ongedaan kunnen worden als zowel MTBVAC als wildtype *M. tuberculosis* zich in dezelfde cel bevinden. Dat is bij deze werkzaamheden uitgesloten, omdat de makaken in deze studie niet geïnfecteerd zijn met *M. tuberculosis* voordat MTBVAC toegediend wordt. Daarnaast is de kans op genoverdracht zeer klein en bevindt MTBVAC zich niet in dezelfde soort cellen (long) als *M. tuberculosis*.

Omdat MTBVAC niet in de longen gevonden wordt, wordt de kans op verspreiding door de lucht na toediening niet waarschijnlijk. De toediening van MTBVAC vindt plaats in een afgesloten systeem, waarbij verspreiding door de lucht ook niet waarschijnlijk is.

Op basis hiervan concludeert de COGEM dat de risico's van uitvoering van de voorgestelde werkzaamheden op inperkingsniveau DM-II verwaarloosbaar klein zijn.



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

Inschaling van vaccinatieproeven op makaken met *Mycobacterium tuberculosis*-stam MTBVAC

COGEM-advies CGM/250715-01

1. Inleiding

De COGEM is gevraagd te adviseren over de inschaling van werkzaamheden met de genetisch gemodificeerde (gg-) *Mycobacterium tuberculosis*-stam MTBVAC (IG 250030). Het verzoek is afkomstig van de stichting Biomedical Primate Research Centre (BPRC). MTBVAC is een geattenueerde stam die twee mutaties bevat in de virulentiegenen *phoP* en *fadD26*. De stam wordt in verschillende klinische studies getest als vaccin tegen *M. tuberculosis*. De aanvrager is voornemens vaccinatie-experimenten in makaken uit te voeren met MTBVAC op inperkingsniveau DM-II (dierverslijf) en handelingen met cellen en weefsels afkomstig van deze apen op inperkingsniveau ML-II (laboratorium). De huidige adviesvraag gaat alleen over de inschaling van werkzaamheden met proefdieren.

2. Achtergrondinformatie over mycobacteriën

Het genus *Mycobacterium* behoort tot de familie van *Mycobacteriaceae*.¹ Mycobacteriën zijn zuurvaste staafvormige bacteriën, die beschikken over een dikke celwand met een hoog gehalte aan vetzuren. De celwand biedt bescherming tegen uitdroging, antimicrobiële agentia, hoge temperaturen en lage zuurgraden.¹ Mycobacteriën zijn alom tegenwoordig in het milieu en worden onder meer aangetroffen in de bodem, stof en water.^{1,2,3,4} Daarnaast kunnen de bacteriën biofilms vormen. Het genus *Mycobacterium* omvat zowel pathogene als apathogene bacteriesoorten.

2.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis is een bacteriesoort die behoort tot de klasse van Actinomyceten.⁵ De bacteriesoort is een intracellulair pathogeen die hoofdzakelijk macrofagen infecteert.⁶ *M. tuberculosis* is de belangrijkste oorzaak van tuberculose (tbc) bij de mens. Tuberculose is een veel voorkomende ziekte, waaraan in 2023 wereldwijd circa 1,25 miljoen mensen stierven.⁷ Besmetting vindt aërogeen plaats, wanneer met tbc-besmette mensen bijvoorbeeld hoesten of niezen.⁸ Infectie met *M. tuberculosis* verloopt doorgaans asymptomatisch, maar zo'n 5 tot 10% van de geïnfecteerde mensen ontwikkelt gedurende hun leven tbc.⁷ 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.

Tuberculose is moeilijk te behandelen en vereist het dagelijks gebruik van een combinatie van verschillende antibiotica. De behandeling duurt minstens zes maanden. Wereldwijd wordt een geattenueerde stam van *Mycobacterium bovis*, *M. bovis* 'Bacille de Calmette et Guérin' (BCG) gebruikt als vaccin tegen tuberculose.⁹

2.2 Vaccinstam MTBVAC

MTBVAC is een gg- *M. tuberculosis*-stam die mutaties bevat in de virulentiegenen *phoP* en *fadD26*. Het gen *phoP* codeert voor een transcriptiefactor die cruciaal is voor de regulatie van bepaalde virulentiefactoren van *M. tuberculosis*.¹⁰ Het *fadD26*-gen is essentieel voor de synthese van de complexe

lipiden phthiocerol dimycocerosaten (DIM), een van de belangrijkste virulentiefactoren van mycobacteriën.¹¹ MTBVAC stamt af de *M. tuberculosis* stam SO₂. In stam SO₂ is het *phoP*-gen geïnactiveerd door een insertie van een kanamycineresistentiegen. Door de stabiele inactivatie van het *phoP*-gen is in vitro de groei van de *M. tuberculosis*-mutant in muizenmacrofagen gereduceerd.^{10,12,13} Deletie van *phoP* in MTBVAC induceert onder andere een toegenomen immuunrespons ten opzichte van de vaccinstam *M. bovis* 'BCG'.¹⁴ Ook is de virulentie gereduceerd ten opzichte van zowel de wildtype *M. tuberculosis* en de vaccinstam *M. bovis* 'BCG'.¹³

De SO₂-stam voldoet echter niet aan de 'Geneva consensus'^a, waarin in 2005 is beschreven dat een tbc-vaccin twee onafhankelijk en niet-reverterende mutaties moet bevatten, en geen antibioticaresistente markers mag bevatten.¹⁵ Via een aantal stappen is de sequentie voor de kanamycineresistentie verwijderd uit de SO₂-stam – waarbij het *phoP*-gen wel verstoord gebleven is – en is ook het *fadD26* locus door een deletie verstoord.¹⁶ Deze uiteindelijke stam is de MBTVAC-stam.

3. Voorgenomen werkzaamheden

De aanvrager verzoekt de toediening van MTBVAC aan makaken (*Macaca mulatta*) en hiernavolgende huisvesting en handelingen uit te mogen voeren op DM-II. Bij verschillende handelingen zullen er samples gemaakt worden van longweefsel, die op een ML-II verder verwerkt zullen worden. De handelingen op het ML-II-lab zijn geen onderdeel van de adviesvraag. Gevaccineerde makaken zullen na vaccinatie met MTBVAC ook geïnfecteerd worden met *M. tuberculosis*. Deze infectie met *M. tuberculosis* en hier opvolgende handelingen met de geïnfecteerde makaken zullen plaatsvinden op DM-III.

3.1 Vaccinatie van makaken met MTBVAC

Om de makaken te vaccineren met MTBVAC, zullen gesedeerde makaken worden geïntubeerd en aangesloten worden op een beademingssysteem waar een vernevelaar op aangesloten zit. Het vaccin, een volume van 2 mL met 5×10^7 colony forming units (CFU) per dosis, zal als aerosol worden toegediend via de vernevelaar. De verneveling zal circa 5 minuten duren. Het beademingssysteem is een gesloten systeem, waarbij uitgeademde lucht uit het gesloten systeem wordt gevoerd via een koolstoffilter. Na vaccinatie zullen de makaken in koppels van twee worden gehuisvest.

3.2 Weefselafname en PET-CT bij MTBVAC-gevaccineerde makaken

De aanvrager is voornemens samples af te nemen bij de MTBVAC-gevaccineerde makaken. Hiervoor zal een longspoeling plaatsvinden van de rechterlonglob, waarbij driemaal voorverwarmd fysiologisch zout via een endoscoop in de long gebracht wordt en afgezogen wordt. De vloeistof met longcellen zal worden opgevangen en in een ML-II-ruimte verder worden verwerkt.

Er zal ook met een naald beenmerg uit het bot van een bovenarm afgenomen worden bij de makaken, en zal er bloed afgenomen worden, waarbij het bloed opgevangen zal worden in zogenoemde 'vacutainer'; een afgesloten buis voor bloedafname. Ook deze samples zullen verwerkt worden in een ML-II lab. Daarnaast zal er van gesedeerde makaken een PET-CT gemaakt worden, waarbij de dieren voorafgaand aan de scan op een DM-II-locatie geïntubeerd worden voor de anesthesie.

a. De 'Geneva consensus' verwijst naar een internationale bijeenkomst van deskundigen die in 2005 gezamenlijk richtlijnen opstelden ter waarborging van de veiligheid bij laboratoriumwerkzaamheden met *Mycobacterium tuberculosis*, met name in het kader van vaccinontwikkeling en dierstudies met apen.

3.3 Voorgenomen maatregelen

De aanvrager geeft aan bij de handelingen op DM-II extra maatregelen te nemen, naast de geldende standaardmaatregelen in DM-II ruimtes, zoals het dragen van werkkleding en handschoenen. De aanvrager geeft aan deze onderstaande aanvullende maatregelen standaard te handhaven bij werkzaamheden met makaken, ook in situaties waarin geen sprake is van (het risico op) aëroge verspreiding.

- Tijdens de werkzaamheden wordt een mond- en neuskapje (P2 of hogere specificatie) en een spatgelaatsscherm gedragen;
- Tijdens de werkzaamheden wordt apart schoeisel gedragen, die wordt achtergelaten in de werkruimte.

4. Eerder COGEM-advies

De COGEM heeft *M. tuberculosis* ingedeeld in pathogeniteitsklasse 3.¹⁷ De *M. tuberculosis*-stam H37Ra is door de COGEM in 2022 ingeschaald in pathogeniteitsklasse 2.¹⁸ Deze stam wordt in laboratoria gebruikt in virulentieonderzoek en is geattenuëerd ten opzichte van virulente stammen. De COGEM heeft niet eerder geadviseerd over MTBVAC. In 2009 heeft de COGEM in vitro werkzaamheden met een *M. tuberculosis phoP*-mutant (SO₂, de voorloper van MTBVAC) ingeschaald op inperkingsniveau ML-II.¹⁹ Vanwege het aërogeen overdraagbare karakter van *M. tuberculosis*, de kanamycine-resistentie van de mutant, en de mogelijke reversie van de aangebrachte modificatie, adviseerde de COGEM de volgende aanvullende voorschriften:

- Open handelingen dienen uitgevoerd te worden in een veiligheidskabinet van klasse II;
- De *M. tuberculosis phoP* mutant dient opgegroeid te worden onder kanamycine-selectiedruk;
- De te gebruiken *M. tuberculosis phoP*-batch dient getest te zijn op de gevoeligheid voor ten minste één algemeen voorgeschreven eerstelijns anti-tuberculosemiddel.

Daarnaast heeft de COGEM geadviseerd over de inschaling van vaccinatiewerkzaamheden in makaken met twee recombinante *M. bovis* 'BCG' stammen. Het betrof hier zogeheten 'endosomal escape' varianten, die een sterkere immuniserende werking hebben.²⁰ *M. bovis* 'BCG' is in de Regeling ggo geclassificeerd als klasse 2 pathogeen.²¹ De COGEM beschouwde beide gg-BCG stammen sterker geattenuëerd dan de BCG ouderstam, en heeft geadviseerd dat de voorgenomen werkzaamheden op ML-I/DM-I niveau uitgevoerd konden worden onder inachtneming van de volgende voorwaarden:

- Het dragen van een veiligheidsbril en mond- en neuskapje is verplicht;
- Het dragen van handschoenen is verplicht.

5. Overweging

De COGEM is gevraagd om te adviseren over de inschaling van handelingen met makaken die gevaccineerd worden of zijn met de MTBVAC-stam. De aanvrager verzoekt deze handelingen uit te mogen voeren op inperkingsniveau DM-II. Voor de beoordeling hiervan acht de COGEM het belangrijk om te stabiliteit de mutaties in MTBVAC in kaart te brengen, evenals de attenuatie van de stam en het risico op aëroge verspreiding.

5.1 Attenuatie van MTBVAC

De aangebrachte mutaties in MTBVAC maken het aannemelijk dat deze stam geattenuëerd is ten opzichte van *M. tuberculosis*. Het *phoP*-gen codeert voor een transcriptiefactor die verschillende virulentiefactoren reguleert, terwijl het *fadD26*-gen essentieel is voor synthese van complexe lipiden

die bijdragen aan de virulentie. Er zijn verschillende dierstudies uitgevoerd om de attenuatie van MTBVAC en diens voorloper *M. tuberculosis*-stam SO₂ aan te tonen. Zo laten SCID-muizen (immuungecompromitteerde muizen) die MTBVAC of SO₂ toegediend kregen, een hoger overlevingspercentage zien dan controlemuizen die *M. tuberculosis* stam MT₁₀₃ of *M. bovis* 'BCG' toegediend kregen.¹³ Subcutane inoculatie van SCID-muizen met MTBVAC resulteerde in vergelijkbare overlevingspercentages en verminderde intracellulaire replicatie in de longen en milt ten opzichte van zowel MT₁₀₃ als twee *M. bovis* 'BCG' varianten.¹⁶

Er zijn daarnaast verschillende klinische studies uitgevoerd om de veiligheid van MTBVAC aan te tonen, bij zowel dieren, als kinderen en volwassenen.^{22, 23, 24, 25, 26} Vaccinatie met MTBVAC werd hierbij veilig bevonden en goed verdragen door baby's, en BCG-naïeve en met BCG-gevaccineerde volwassenen. MTBVAC is niet gedetecteerd in feces en urine van proefpersonen.²³

De COGEM concludeert op basis van het bovenstaande dat de MTBVAC-stam geattenuëerd is ten opzichte van *M. tuberculosis*.

5.2 Verspreiding van MTBVAC

De aanvrager is voornemens MTBVAC toe te dienen via een gesloten beademingssysteem. Op dit gesloten systeem is een vernevelaar aangesloten waarmee MTBVAC als aerosol toegediend zal worden aan de makaken. De kans op de aanwezigheid van aerosolen van MTBVAC in de ruimte wordt door de COGEM als verwaarloosbaar beoordeeld. Ook de weefselaufnames vinden op zo'n manier plaats dat de kans op vorming van aerosolen verwaarloosbaar is.

Om aëroge verspreiding mogelijk te maken na toediening van MTBVAC, zou de MTBVAC-stam zich moeten kunnen vestigen en repliceren in de longen. Bij muizen waarbij MTBVAC via de neus was toegediend, werd geen groei van MTBVAC gedetecteerd in de longen.²⁷ Resultaten van onderzoek naar de bio-distributie van MTBVAC wijzen erop dat MTBVAC, net als *M. bovis* 'BCG', hoofdzakelijk gedetecteerd wordt in lymfeklieren en de milt, en niet of nauwelijks in de longen.²⁸ Ook werd na subcutane inoculatie van SCID-muizen en cavia's, MTBVAC niet gedetecteerd in de feces of urine.¹⁶ Bij een klinische studie met volwassenen die niet eerder blootgesteld waren aan *M. tuberculosis* of *M. bovis* 'BCG' werd geen MTBVAC gevonden in urine en feces.²⁵ MTBVAC werd voornamelijk teruggevonden in de lymfeklieren, waar na 2 tot 4 weken er een steeds grotere afname was.

De aanvrager meldt daarnaast een verkennende studie te hebben uitgevoerd waarbij 3 aerosol-MTBVAC-gevaccineerde makaken gezamenlijk werden gehuisvest met 3 niet-gevaccineerde makaken. De aanvrager geeft aan dat na langdurige gezamenlijke huisvesting en nauw onderling contact geen MTBVAC-specifieke immuunrespons gedetecteerd kon worden bij de niet-gevaccineerde makaken.

Op basis van bovenstaande gegevens is de COGEM van oordeel dat de kans op verspreiding van MTBVAC tijdens of na toediening aan de makaken, verwaarloosbaar klein is.

5.3 Reversie van aangebrachte mutaties in MTBVAC niet mogelijk

De MTBVAC-stam bevat geen genen die coderen voor antibioticaresistentie en bevat een deletie in twee afzonderlijke virulentiegenen *phoP* en *fadD26* van respectievelijk 94 bp en 1511 bp.¹⁶ Hiermee voldoet deze *M. tuberculosis*-stam aan de 'Geneva-consensus'.¹⁵ Theoretisch zou alleen reversie van

deze mutaties kunnen plaatsvinden wanneer er wildtype-sequenties van beide genen in de nabije omgeving aanwezig zijn, zoals bij een Mycobacterie-co-infectie. Hierbij zou een tweevoudig event van horizontale gen-overdracht nodig zijn voor volledige reversie. De kans hierop wordt door de COGEM zeer klein geacht. De MTBVAC-stam lijkt zich daarnaast niet te kunnen vestigen in de longen,^{13,16,22,28} waardoor er geen fysieke nabijheid is tussen een wildtypestam, die hoofdzakelijk longmacrofagen infecteert, en de MTBVAC-stam die nodig is voor horizontale gen-overdracht.

Gezien de grootte van de deleties en de onwaarschijnlijkheid dat MTBVAC en wildtype *M. tuberculosis*-stammen in nabijheid aanwezig zijn in het lichaam, is de COGEM van oordeel dat de kans op reversie door horizontale gen-overdracht verwaarloosbaar klein is. Hoewel het niet expliciet wordt vermeld door de aanvrager, gaat de COGEM ervan uit dat de makaken die gevaccineerd zullen worden vrij zijn van mycobacteriën, waardoor reversie met een wildtype-sequentie niet mogelijk is.

6. Advies

Op basis van de stabiele attenuatie van de MTBVAC, de tweevoudige attenuatie hiervan ten opzichte van *M. tuberculosis*, de verminderde intracellulaire replicatie en de afwezigheid van aëroge verspreiding van MTBVAC, is de COGEM van oordeel dat de risico's voor mens en milieu van uitvoering van de voorgestelde werkzaamheden op inperkingsniveau DM-II verwaarloosbaar klein zijn.

Referenties

1. Skerman VBD et al. (1980). Approved lists of bacterial names. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 30: 225-420
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 & Huit G (2006). Infections due to rapidly growing mycobacteria. Clin. Infect. Dis. 2: 1756-1763
4. Marsheck WJ et al. (1972). Microbial degradation of sterols. App. Microbiol. 23: 72-77
5. NCBI taxonomy browser – *Mycobacterium tuberculosis*
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1773&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmod=e1&unlock> (bezocht op 1 juli 2025)
6. Smith I (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin. Microbiol. Rev. 16: 463-496
7. World Health Organisation. Tuberculosis. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis> (bezocht op 1 juli 2025)
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Tuberculosis. <https://www.cdc.gov/tb/topic/basics/howtbspreads.htm> (bezocht op 1 juli 2025)
9. Fatima S et al. (2020). Tuberculosis vaccine: A journey from BCG to present. Life Sci. 252: 117594
10. Perez E et al. (2001) An essential role for *phoP* in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. Mol. Microbiol. 41: 179-187
11. Camacho LR et al. (1999). Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. Mol. Microbiol. 34: 257-267
12. Cardona JP et al. (2009). Extended safety studies of the attenuated live tuberculosis vaccine SO2 based on *phoP* mutant. Vaccine 27: 2499-2505
13. Martin C et al. (2006) The live *Mycobacterium tuberculosis phoP* mutant strain is more attenuated than BCG and confers protective immunity against tuberculosis in mice and guinea pigs. Vaccine 24: 3408-3419
14. Pérez I et al. (2022). The *Mycobacterium tuberculosis* PhoPR virulence system regulates expression of the universal second messenger c-di-AMP and impacts vaccine safety and efficacy. Mol. Ther. Nucleic Acids 27: 1235-1248
15. Kamath AT et al. (2005). New live mycobacterial vaccines: the Geneva consensus on essential steps towards clinical development. Vaccine 23: 3753-3761
16. Arbués A et al. (2013). Construction, characterization and preclinical evaluation of MTBVAC, the first live-attenuated *M. tuberculosis*-based vaccine to enter clinical trials. Vaccine 31: 4867-4873
17. COGEM (2024). Actualisatie van de pathogeniteitsclassificatielijsten van (a)pathogene bacteriën. COGEM-advies CGM/241127-02

18. COGEM (2022). Advies Pathogeniteitsclassificatie van de bacteriestam *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. COGEM-advies CGM/220314-01
19. COGEM (2009). Inschaling van in vitro werkzaamheden met een *Mycobacterium tuberculosis* *phoP* mutant. COGEM-advies CGM/090212-01
20. COGEM (2007). Inschaling van vaccinatie van makaken met de genetisch gemodificeerde *Mycobacterium bovis* stam Calmette-Guérin. COGEM-advies CGM/070402-05
21. Regeling ggo milieubeheer 2013. wetten.nl - Regeling - Regeling genetisch gemodificeerde organismen milieubeheer 2013 - BWBR0035072 <https://wetten.overheid.nl/BWBR0035072/2025-07-01> (bezocht op 1 juli 2025)
22. Aguilo N et al. (2015). MTBVAC vaccine is safe, immunogenic and confers protective efficacy against *Mycobacterium tuberculosis* in newborn mice. *Tuberculosis* 96: 71-74
23. Tameris M et al. (2019). Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine MTBVAC versus BCG in adults and neonates: a randomised controlled, double-blind dose-escalation trial. *Lancet Respir. Med.* 7: 757-770
24. Tameris M et al. (2025). Safety, reactogenicity, and immunogenicity of MTBVAC in infants: a phase 2a randomised, double-blind, dose-defining trial in a TB endemic setting. *EBioMedicine* 114: 105628
25. Spertini F et al. (2015). Safety of human immunisation with a live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine: a randomised, double-blind, controlled phase I trial. *Lancet Respir. Med.* 3: 953-962.
26. Luabeya AKK et al. (2025). Live-attenuated *Mycobacterium tuberculosis* vaccine, MTBVAC, in adults with or without *M tuberculosis* sensitisation: a single-centre, phase 1b-2a, double-blind, dose-escalation, randomised controlled trial. *Lancet Glob. Health* 13: e1030-e1042
27. Aguilo JI et al. (2013). ESX-1-induced apoptosis is involved in cell-to-cell spread of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell. Microbiol.* 15: 1994-2005
28. University of Zaragoza (2012). Six-months biodistribution and excretion in BALB/C mice. UNIZAR_MTBVAC_o2