Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit

Az. 45241.0147 September 2015

Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von *Mycobacterium bovis* BCG-Stämmen als Spender- oder Empfängerorganismen gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Allgemeines

Der seit mehr als 90 Jahren weltweit als Vakzine gegen Tuberkulose eingesetzte Stamm *Mycobacterium bovis* BCG wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts von Albert Calmette und Camille Guérin generiert. Sie isolierten *M. bovis* aus der Milch einer an tuberkulöser Mastitis erkrankten Kuh und kultivierten es auf einem Medium aus Glycerin und Kartoffeln. Unter Zugabe von Rindergalle und einer kontinuierlichen Subkultivierung (230 Passagen) generierten sie den attenuierten Stamm *M. bovis* BCG [1]. Dieser wurde seit 1921 zunächst in Frankreich und ab 1924 weltweit für eine Impfung gegen *M. tuberculosis* eingesetzt. Die ursprünglich abgegebenen Kulturen wurden vor Ort weiter subkultiviert, so dass sich im Laufe der Zeit aus dem ursprünglichen BCG-Stamm verschiedene Substämme entwickelten. Diese lassen sich geno- sowie phänotypisch voneinander unterscheiden. Derzeit werden für ca. 90 % der weltweiten Impfstoffproduktion die Stämme Pasteur 1173P2, Danish 1331, Glaxo 1077, welcher vom Danish-Stamm abgeleitet ist, Russian BCG-I, Tokyo 172-1 und Moreau-RJ verwendet [2].

Die Genome aller BCG-Stämme weisen die gleichen attenuierenden Mutationen auf, die auf die ersten *in vitro*-Passagierungen von 1908 – 1921 zurückzuführen sind. Darüber hinaus enthalten sie stammspezifische Mutationen, die durch die individuellen Kultivierungsbedingungen nach der Verteilung entstanden sind [3]. So ist im Genom aller BCG-Stämme die in pathogenen Mykobakterien-Arten konservierte *region of difference* 1 (RD1) deletiert. Diese umfasst in *M. tuberculosis* 9 Gene, welche u. a. für ein Typ-VII-Sekretionssystem mit seinen Effektorproteinen kodiert. Die Genomregion gilt als Virulenzfaktor, da die Deletion der RD1 *M. tuberculosis* attenuiert [4] und die Wiedereinführung in BCG-Stämme deren Virulenz erhöht [5-7]. Inzwischen sind die Genome der meisten BCG-Substämme sequenziert. Eine vergleichende Analyse zwischen ihnen zeigt eine hohe Zahl von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im Vergleich zu *M. tuberculosis* und *M. bovis*, die zum Teil allen BCG-Stämmen gemeinsam sind. Zum anderen werden individuelle Unterschiede deutlich, die auf die veränderten Anzuchtbedingungen nach der Verteilung zurückzuführen sind [8-12]. So ist den nach 1927 erhaltenen („späten“) Stämmen Pasteur 1173P2, Danish 1331, und Glaxo 1077 die Deletion einer weiteren *region of difference* (RD2) gemeinsam. Diese kodiert u. a. für MPB64, ein Protein mit antigenen Eigenschaften. Des Weiteren führt eine Mutation im Gen des regulatorischen Sigma-Faktors K zu einer deutlich verringerten Expression der Antigene MPB70 und MPB83 [13]. Eine Punktmutation im *mmaA3*-Gen führt aufgrund eines Defekts in der Synthese von Methoxymycolat zu einer Veränderung der Zellwandstruktur.

Den vor 1927 erhaltenen („frühen“) Stämmen Russian BCG-I, Tokyo 172-1 und Moreau-RJ ist eine Insertion im Promotorbereich des *phoP*-Gens gemeinsam. PhoP ist Teil des Zwei-Komponentensystems PhoP-PhoR. Durch Übertragung eines Phosphatrestes von der Histidinkinase PhoR auf PhoP wird die Expression verschiedener Gene induziert. Die Insertion im Promotorbereich von *phoP* bewirkt eine erhöhte Expression der Zielgene [14].

BVL_FO_05_4100_402_V1.0

Ferner unterscheiden sich die Stämme Tokyo 172-1, Moreau-RJ und Glaxo 1077 von allen anderen BCG-Stämmen durch Mutationen in Biosynthesegenen für komplexe Lipide mit methylverzweigten Fettsäuren. So werden kein Phthiocerol-Dimycocerosat und phenolische Glykolipide mehr gebildet. Diesen Zellwandbausteinen wird bei pathogenen Mykobakterien eine Rolle in der Immunmodulation des Wirtes zugeschrieben. Die verursachenden Mutationen sind voneinander unabhängig entstanden. So ist im Stamm Moreau-RJ eine Deletion über 975 bp beschrieben, welche die Biosynthesegene *fadD26* und *ppsA* betrifft [15]. Während im Stamm Tokyo 172-1 eine Mutation im *ppsA*-Gen identifiziert werden konnte [16], ist die Ursache für die Defizienz im Glaxo 1077-Stamm unklar.

Gemäß WHO (*World Health Organization*)-Empfehlung werden weltweit jährlich ca. 100 Millionen Neugeborene in Gebieten mit hoher *M. tuberculosis*-Prävalenz mit den genannten BCG-Stämmen vakziniert. Dies entspricht einer Gesamtabdeckung der betroffenen Bevölkerung von ca. 90 %. Bei der WHO bzw. *European Pharmacopeia* sind die entsprechenden Referenzstämme mit Empfehlungen für die Lizenzierung hinterlegt [17]. *M. bovis* BCG ist derzeit der einzige international verfügbare Impfstoff gegen Tuberkulose. Von der Ständigen Impfkommission (STIKO) in Deutschland wird die Impfung mit BCG-Stämmen seit 1998 aufgrund des geringen Infektionsrisikos und der begrenzten Wirksamkeit in Verbindung mit nicht seltenen unerwünschten Nebenwirkungen nicht mehr empfohlen [18; 19]. Dies ist im Einklang mit der Empfehlung der WHO, in Populationen, deren Infektionsrisiko für Tuberkulose unter 0,1 % liegt, keine generelle BCG-Impfung durchzuführen.

Die von der WHO empfohlenen Impfstämme werden einmalig intradermal appliziert. Dabei variiert die Lebendzellzahl in den Ampullen nach Rekonstitution der gefriergetrockneten Bakterien je nach Stamm zwischen $5 \times 10^5 – 3 \times 10^6$ *colony forming units.* Für die Anwendung des Impfstoffes sind in Abhängigkeit von Administrationsroute, verwendetem Stamm und eingesetzter Dosis unerwünschte Nebenwirkungen beschrieben [2; 20; 21]. Nebenwirkungen milder Art sind dabei Papula- oder Geschwür-Bildungen an der Einstichstelle, die bei nahezu allen Geimpften auftreten. Ernsthaftere Nebenwirkungen umfassen mit einer Häufigkeit von 0,01 % – 0,1 % die Ausbildung von Abszessen oder Narben außerhalb des Bereiches der Einstichstelle oder eitrige Lymphadenitiden. Diese heilen i. d .R ohne medizinischen Behandlung aus. Quast *et al*. beschreiben dabei die Korrelation der auftretenden Nebenwirkungen wie Lymphadenitiden mit der verabreichten Menge des Lebendimpfstoffes. So war eine Reduktion der lebensfähigen Bakterien des Stammes Danish 1331 um ein Viertel mit einer deutlichen Abnahme aller Nebenwirkungen verbunden [20]. In sehr seltenen Fällen wird über systemische BCG-Infektionen oder über Entzündungen der Knochen (Osteitis, $10^{-4} – 10^{-8}$) berichtet. Eitrige Lymphadenitiden und systemische BCG-Infektionen können in den meisten Fällen (> 99 %) mit einer Suppression des Immunsystems der Geimpften in Zusammenhang gebracht werden [21]. Die Fälle von Entzündungen der Knochen werden mit der Verwendung bestimmter Impf-Chargen assoziiert [8; 21]. Es ist auffällig, dass die Stämme Tokyo 172-1, Glaxo 1077 und Moreau-RJ insgesamt weniger häufig Nebenwirkungen verursachen als die Stämme Pasteur 1173P2, Russian BCG-I und Danish 1331; wofür phänotypische Unterschiede, insbesondere in der Zellwandstruktur, als ursächlich diskutiert werden [22]. Für Immunsupprimierte bzw. HIV-Infizierte wird eine Vakzinierung mit BCG-Stämmen von der WHO nicht mehr empfohlen [2]. Studien u. a. aus Südafrika belegen einen direkten Zusammenhang zwischen einem Immundefekt und dem Ausbruch einer disseminierten BCG-Infektion nach der Impfung. Immundefekt und disseminierte BCG-Infektion der meist unter 1jährigen sind mit einer Letalität von ca. 85 % begleitet [23].

Die ZKBS ordnet bei gentechnischen Arbeiten *M. bovis* BCG als Spender- und Empfängerorganismus unabhängig von der Zuordnung zu einem Substamm seit ca. 20 Jahren der Risikogruppe 1 zu. Begründet wird dies mit der weltweiten Verwendung der Stämme als Impfstoff gegen Tuberkulose.

Der ABAS ordnete den Stamm *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 gemäß BiostoffV in einem Beschluss aus dem Jahr 2013 aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen der Risikogruppe 2 zu [24].

BVL_FO_05_4100_402_V1.0

Empfehlung

Gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV und gemäß § 7 Abs. 3 (1) GenTSV werden die von *M. bovis* BCG-abgeleiteten Stämme als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten weiterhin der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Begründung

Bei den seit fast 100 Jahren als Vakzine genutzten *M. bovis* BCG-Stämmen handelt es sich um phänotypisch wie genotypisch gut charakterisierte Bakterien. Vor der Anwendung als Impfstoff gegen Tuberkulose beim Menschen wurde die Attenuierung der Stämme im Tiermodell gezeigt. Die ernsthaften Nebenwirkungen der Vakzinierung werden hauptsächlich von der Dosis der applizierten lebenden Bakterien und vom Immunstatus des Geimpften bestimmt. Im Falle einer akzidentellen Exposition im Labor, zum Beispiel im Verlauf einer Stichverletzung, ist nicht von der bei der Impfung applizierten Menge an Bakterien auszugehen.

Die genannten BCG-Stämme werden bereits langjährig sicher in gentechnischen Anlagen der Sicherheitsstufe 1 als Spender- und Empfängerorganismen verwendet.

Literatur

1 Calmette A, Guérin C (1920). Nouvelles recherches experimentales sur la vaccination des bovides contre la tuberculose. *Ann Inst Pasteur* **34**:553-560.

2 WHO (April 2012). Information Sheet observed rate of vaccine reactions Bacille Calmette-Guérin (BCG) Vaccine.

3 Osborn TW (1983). Changes in BCG strains. *Tubercle* **64**:1-13.

4 Lewis KN, Liao R, Guinn KM, Hickey MJ, Smith S, Behr MA, et al. (2003). Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* mimics bacille Calmette–Guérin attenuation *J Infect Dis* **187**: 117-123.

5 Wards BJ, de Lisle GW, Collins DM (2000). An esat6 knockout mutant of *Mycobacterium bovis* produced by homologous recombination will contribute to the development of a live tuberculosis. *Tuber Lung Dis* **80**(4-5):185-9.

6 Behr MA (2002). BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* **2**:86-92.

7 Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST (2002). Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis* BCG and *Mycobacterium microti. Mol Microbiol* **46**:709–717.

8 Liu J, Tran V, Leung AS, Alexander DC, Zhu A&B (2009). BCG Vaccines; Their mechanism of attenuation and impact on safety and protective efficacy. *Human Vaccines* **5**(2):70-78.

9 Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**(5):1274-82.

10 Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM (1999). Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284**(5419):1520-3.

11 Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S, Koyama A (2009). Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: a comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine* **27**(11):1710-6.

12 Pan Y, Yang X, Duan J, Lu N, Leung AS, Tran V, Hu Y, Wu N, Liu D, Wang Z, Yu X, Chen C, Zhang Y, Wan K, Liu J, Zhu B (2011). Whole-genome sequences of four *Mycobacterium bovis* BCG vaccine strains. *J Bacteriol* **193**(12):3152-3.

13 Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, *et al*. (2007). Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. *PNAS* **104**:5596-601.

BVL_FO_05_4100_402_V1.0

14 Gupta S, Sinha A, Sarkar D (2006). Transcriptional autoregulation by *Mycobacterium tuberculosis* PhoP involves recognition of novel direct repeat sequences in the regulatory region of the promoter. *FEBS Lett* **580**(22):5328-38.

15 Leung AS, Tran V, Wu Z, Yu X, Alexander DC, Gao GF, Zhu B, Liu J (2008). Novel genome polymorphisms in BCG vaccine strains and impact on efficacy. *BMC Genomics* **9**:413.

16 Naka T, Maeda S, Niki M, Ohara N, Yamamoto S, Yano I, Maeyama J, Ogura H, Kobayashi K, Fujiwara N (2011). Lipid phenotype of two distinct subpopulations of *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette-Guerin Tokyo 172 substrain. *J Biol Chem* **286**(51):44153-61.

17 WHO Geneva (Switzerland): Expert committee on biological standardization. In: recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. 2011:1-48.

18 Öppling V (1999). Einsatz bakterieller Impfstoffe beim Menschen. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz 1 **99**:64-68.

19 http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Tuberkulose/FAQ01.html

20 Quast U, Merkle W, Bijok U (1986). Side effects of BCG vaccination with strain Copenhagen 1331. Developments in Biological Standardization 58:321-329

21 WHO (2004). Weekly epidemiological record. No. 4 (79):25–40.

22 Chen JM, Islam ST, Ren H, Liu J (2007). Differential productions of lipid virulence factors among BCG vaccine strains and implications on BCG safety. *Vaccine* **25**:8114-8122.

23 Hesseling AC, Marais BJ, Gie RP, Schaaf HS, Fine PEM, Godfrey-Faussett P, Beyers N (2007). The risk of disseminated Bacille Calmette-Guerin (BCG) disease in HIV-infected children. *Vaccine* **25**:14-18.

24 Ausschuss für Biologische Arbeitsstoffe (ABAS) Beschluss 15/2013. Begründungspapier zur Einstufung des Stammes *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur 1173P2 in Risikogruppe 2 nach BiostoffV. Stand Dezember 2013