

**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 („Bacillus Calmette Guérin“) 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.

Die BCG-Impfung ist auch heute noch ein wichtiger Baustein der *End TB*-Strategie der *World Health Organization* (WHO)-Mitgliedsstaaten, deren Ziel es ist, die Zahl der durch Tuberkulose verursachten Todesfälle bis zum Jahr 2035 um 95 % zu reduzieren [2]. Die Vakzinierung mit BCG schützt dabei nicht nur vor Tuberkulose, sondern auch vor Lepra [3].

Die drei BCG-Substämme, die laut Meldung an die WHO weltweit am häufigsten für die Vakzinierung eingesetzt werden, sind der russische Stamm Moscow-368, der bulgarische Substamm Sofia SL222 und der Stamm Tokyo 172-1 [2]. Weitere häufig eingesetzte Stämme sind die Stämme Pasteur 1173P2, Danish 1331, Glaxo 1077, der vom Danish-Stamm abgeleitet ist, Russian BCG-I und Moreau-RJ

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 [5]. Die *region of difference* 1 (RD1), die in pathogenen Mykobakterien-Arten konserviert ist, ist im Genom aller BCG-Stämme deletiert. Sie umfasst in *M. tuberculosis* neun Gene, die u. a. für ein Typ-VII-Sekretionssystem mit seinen Effektorproteinen kodieren. Die Genomregion ist für die Virulenz relevant, da die Deletion der RD1 *M. tuberculosis* attenuiert [6] und die Wiedereinführung in BCG-Stämme deren Virulenz erhöht [7-9]. Inzwischen sind die Genome der meisten BCG-Substämme sequenziert. Eine vergleichende Analyse zeigt eine hohe Zahl von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im Vergleich zu *M. tuberculosis* und *M. bovis*, von denen einige allen BCG-Substämmen gemeinsam sind. Zum anderen werden individuelle Unterschiede deutlich, die auf die veränderten Anzuchtbedingungen nach der Verteilung zurückzuführen sind [10-14]. 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 [15]. 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 [16].

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-Dimycolat 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, die die Biosynthesegene *fadD26* und *ppsA* betrifft [17]. Während im Stamm Tokyo 172-1 eine Mutation im *ppsA*-Gen identifiziert werden konnte [18], ist die Ursache für die Defizienz im Stamm Glaxo 1077 unklar.

Die WHO empfiehlt, in Gebieten mit hoher Prävalenz von *M. tuberculosis* und/oder *Mycobacterium leprae* den BCG-Impfstoff an alle Neugeborenen mit intaktem Immunsystem zu verabreichen. Gemäß dieser Empfehlung werden jährlich ca. 100 Millionen Neugeborene weltweit 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 [19]. *M. bovis* BCG ist derzeit der einzige international verfügbare Impfstoff gegen Tuberkulose. Von der Ständigen Impfkommision (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 [20; 21]. 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 WHO empfiehlt die BCG-Impfung jedoch auch in Niedrig-Prävalenzgebieten für Tuberkulin- oder *Interferon gamma release assay*-negative Personen, die beruflich mit Tuberkulosekranken in Kontakt kommen könnten (z. B. medizinisches Personal oder Sozialarbeiter) [2].

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 5×10^5 – 3×10^6 *colony forming units*. Für die Anwendung des Impfstoffes sind in Abhängigkeit von Administrationsroute, verwendetem Stamm und eingesetzter Dosis unerwünschte Nebenwirkungen beschrieben [2; 22; 23]. Nebenwirkungen milder Art sind dabei Papula- oder Geschwür-Bildungen an der Einstichstelle, die bei nahezu allen Geimpften auftreten. Ernsthafte 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 medizinische Behandlung aus. Quast *et al.* beschreiben dabei, dass die Häufigkeit von Nebenwirkungen wie Lymphadenitiden mit der verabreichten Menge des Lebendimpfstoffes zusammenhängt. So war eine Reduktion der Zahl der lebensfähigen Bakterien des Stammes Danish 1331 um ein Viertel mit einer deutlichen Abnahme aller Nebenwirkungen verbunden [22]. In sehr seltenen Fällen wird von systemischen BCG-Infektionen (1,6 – 4,3 Fälle / 10^6 Impfungen) oder Entzündungen der Knochen (Osteitis) bzw. des Knochenmarks (Osteomyelitis; 0,01 – 30 / 10^6 Impfungen) berichtet [23]. Eitrige Lymphadenitiden und systemische BCG-Infektionen können in den meisten Fällen (> 99 %) mit einer Suppression des Immunsystems der Geimpften in Zusammenhang gebracht werden [24]. Die Osteitis-Fälle werden mit der Verwendung bestimmter Impfstämme assoziiert [10; 24]. 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. Hierfür werden phänotypische Unterschiede, insbesondere in der Zellwandstruktur, als ursächlich diskutiert [25]. Für Immunsupprimierte bzw. HIV-Infizierte rät die WHO von einer Vakzinierung mit BCG-Stämmen ab, es sei denn, es handelt sich um HIV-infizierte Kinder aus Hoch-Prävalenzgebieten, die immunologisch stabil und gesund sind und eine antiretrovirale Therapie erhalten [2]. Studien u. a. aus Südafrika belegen einen direkten Zusammenhang zwischen einem Immundefekt und dem Ausbruch einer disseminierten BCG-Infektion nach der

Impfung. Bei immunsupprimierten Kleinkindern mit einem Alter von weniger als einem Jahr verläuft eine disseminierte BCG-Infektion mit einer Wahrscheinlichkeit von 85 % tödlich [26].

Trotz der starken Attenuierung der BCG-Stämme ist es in der Vergangenheit zu Infektionen von medizinischem Personal gekommen. Zwei Krankenschwestern entwickelten Handinfektionen, nachdem sie sich während der Vorbereitung einer BCG-Impfung bzw. einer Blaseninstillation mit BCG-Stämmen mit einer Spritze bzw. Kanüle gestochen hatten [27; 28]. Eine weitere Krankenschwester entwickelte eine Arthritis des Zeigefingers, nachdem sie sich vor der Verabreichung des BCG-Impfstoffes in den Finger gestochen hatte [29]. Eine vierte Krankenschwester erkrankte an einem hartnäckigen Abszess des Oberschenkels, nachdem sie nach der Verabreichung des BCG-Impfstoffes die benutzte Spritze auf den Oberschenkel hatte fallen lassen [30]. Zur erfolgreichen Behandlung der Infektionen waren chirurgische Interventionen zusätzlich zur medikamentösen Behandlung erforderlich [27-30]. Die Krankenschwestern wurden als immunkompetent beschrieben.

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

Der ABAS hat den Stamm *M. bovis* BCG Pasteur 1173P2 gemäß BiostoffV in einem Beschluss aus dem Jahr 2013 aufgrund der beschriebenen Nebenwirkungen der Risikogruppe 2 zugeordnet [31].

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 der **Risikogruppe 2** 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 ihre Attenuierung im Tiermodell gezeigt. Ernsthafte Nebenwirkungen der Vakzinierung sind bei Immunkompetenten sehr selten und hängen hauptsächlich von einer fehlerhaften Verabreichung des Impfstoffs und von der Dosis der applizierten lebenden Bakterien ab. Im Falle einer akzidentellen Exposition im Labor, zum Beispiel im Verlauf einer Stichverletzung, kann nicht ausgeschlossen werden, dass das Laborpersonal an ggf. langwierigen und schwierig zu behandelnden Infekten erkrankt.

Literatur

- 1 Calmette A, Guérin C (1920). Nouvelles recherches experimentales sur la vaccination des bovides contre la tuberculose. *Ann Inst Pasteur* **34**:553-60.
- 2 WHO (2018). BCG vaccines: WHO position paper. *Weekly Epidemiol Rec* **93**(8):73-96.
- 3 SAGE Working Group on BCG Vaccines and WHO Secretariat (2017). Report on BCG vaccine use for protection against mycobacterial infections including tuberculosis, leprosy, and other nontuberculous mycobacteria (NTM) infections. http://www.who.int/immunization/sage/meetings/2017/october/1_BCG_report_revised_version_online.pdf?ua=1
- 4 WHO (April 2012). Information Sheet Observed rate of vaccine reactions Bacille Calmette-Guérin (BCG) Vaccine.
- 5 Osborn TW (1983). Changes in BCG strains. *Tubercle* **64**:1-13.

- 6 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**: 117-23.
- 7 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.
- 8 Behr MA (2002). BCG-different strains, different vaccines? *Lancet Infect Dis* **2**:86-92.
- 9 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**:709-17.
- 10 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):70-8.
- 11 Stover CK (1996). Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol* **178**(5):1274-82.
- 12 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.
- 13 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.
- 14 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.
- 15 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.
- 16 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.
- 17 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.
- 18 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.
- 19 WHO Geneva (Switzerland): Expert committee on biological standardization. In: recommendations to assure the quality, safety and efficacy of BCG vaccines. 2011:1-48.
- 20 Öppling V (1999). Einsatz bakterieller Impfstoffe beim Menschen. Bundesgesundheitsbl-Gesundheitsforsch-Gesundheitsschutz **1** **99**:64-8.
- 21 <http://www.rki.de/SharedDocs/FAQ/Impfen/Tuberkulose/FAQ01.html>
- 22 Quast U, Merkle W, Bijok U (1986). Side effects of BCG vaccination with strain Copenhagen 1331. *Developments in Biological Standardization* **58**:321-9
- 23 Lotte A, Wasz-Höckert O, Poisson N, Dumitrescu N, Verron M, Couvet E (1984). A bibliography of the complications of BCG vaccination. A comprehensive list of the world literature since the introduction of BCG up to July 1982, supplemented by over 100 personal communications. *Adv Tuberc Res* **21**:194-245.
- 24 WHO (2004). Weekly epidemiological record. No. 4 (79):25-40.
- 25 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**:8114-22.
- 26 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.

- 27 Warren J, Nairn DS, Robertson MH (1984). Cold abscess after accidental BCG inoculation. *The Lancet*, **324**(8397):289.
- 28 Vigler M, Mulett H, Hausman MR (2008). Chronic Mycobacterium infection of first dorsal web space after accidental Bacilli Calmette-Guérin injection in a health worker: case report. *J Hand Surg*, 33(9):1621-4.
- 29 Klacar M, Ilic G, Pavkovic B (2014). Arthritis following an accidental inoculation with a BCG vaccine in a paediatric nurse. Poster im Rahmen der WONCA Europe Konferenz, Lissabon. <http://woncaeuropa.org/content/po691-arthritis-following-accidental-inoculation-bcg-vaccine-paediatric-nurse>
- 30 Pinocy J, Eingartner C, Ruck P, Weise, K (1998). Rezidivierende Weichteilinfekte nach akzidenteller Inokulation mit BCG-Impfstoff. *Der Unfallchirurg*, **101**(8):658-60.
- 31 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