



**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung der *Salmonella enterica*-Impfstämme
„TAD Salmonella vacE“, „Salmovac SE“ und „Nobilis SG9R“
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

„TAD Salmonella vacE“

Der Impfstamm ist eine Streptomycin- und Rifampicin-resistente Stoffwechselmutante von *Salmonella enterica enterica* Serovar Enteritidis 318. Dieser Ausgangsstamm hat in Mäusen eine LD_{50} (ip) = 10^5 KbE und wird deshalb als deutlich virulenzabgeschwächt im Vergleich zu anderen *Salmonella enterica enterica* Serovar Enteritidis (LD_{50} (ip) = 10^{1-2} KbE) bezeichnet. Die oben genannten Spontanmutationen führen durch Veränderungen in der Transkription und Translation zu einer Verlängerung der Generationszeit von normalerweise 22 min auf 28 min². Zusätzlich besitzt der Impfstamm eine „supersensitivity to quinolones“-Mutation (ssq-Marker), die durch chemische Mutagenese mit N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin in die Stoffwechselmutante eingeführt wurde. Dieser antiepidemische ssq-Marker beruht auf Mutationen in Genen für die äußere Membran des Bakteriums. Als Konsequenz zeigt das Bakterium eine erhöhte Sensitivität gegen über Tensiden und Makrolidantibiotika, sowie eine verringerte Überlebensfähigkeit in der Umwelt. Die Reversionsrate aller drei Mutationen liegt jeweils bei 10^{-7} - 10^{-8} ³.

Bei Impfungen von 795.000 Hühnern wurden keine Krankheiten festgestellt, die auf den Impfstamm zurückzuführen waren. Eine Überdosierung mit 10^{10} KbE bei Hühnerküken hatte keine Nebenwirkungen. Gleiche Ergebnisse wurden bei Gabe des Impfstammes an andere Geflügelarten, Kälber und Schweine verzeichnet². Eine Infektion des Menschen mit diesem Impfstamm wurde bisher nicht festgestellt⁶. Dieser Impfstoff für Hühner ist seit Juli 1999 vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) zugelassen.

„Salmovac SE“

Es handelt sich um ein Lebendvakzin gegen Salmonellen-Infektionen bei Hühnern. Der verwendete Impfstamm ist von dem Plasmid-freien Stamm *Salmonella enterica enterica* Serovar Enteritidis 6403 PT4 abgeleitet. Der Verlust von Serovar-spezifischen Plasmiden bei *Salmonella enterica enterica* Serovar Enteritidis führte nach Chart et al. in Mausexperimenten zu einer Erhöhung der LD_{50} von <20 auf $>10^6$ KbE⁵.

Eine zusätzliche Attenuierung wurde bei dem Impfstamm über die Einführung einer Adenin- und einer Histidinauxotrophie durch chemische Mutagenese mit N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidin erreicht. Die Einführung der Auxotrophien führte in NMRI-Mäusen zu einer weiteren Virulenzabschwächung um ca. eine Zehnerpotenz⁴. Die Reversionsrate für beide Mutationen lag jeweils bei 10^7 , damit ergibt sich eine theoretische Rückmutationsrate von 10^{-14} um beide Auxotrophien aufzuheben. Die Auxotrophien dienen auch zur Differenzierung des Stammes von virulenten Wildtypstämmen. In Versuchen mit Mäusen und Hühnerküken konnte auch nach einer Überdosierung und mehrfachen Gabe des Impfstammes keine Unverträglichkeitsreaktionen festgestellt werden. Die Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit des Impfstammes in Hühnerexkrementen zeigen, dass dieser mit 13 Tagen deutlich schlechter überlebt als der Ausgangsstamm mit 40 Tagen. In Experimenten zur Sicherheit des Vakzins für den Menschen konnte in Stuhlproben von Personen, die intensiv mit dem Impfstoff gearbeitet haben, keine Infektion mit dem Impfstamm nachgewiesen werden⁸. Der Impfstamm ist gegenüber therapeutischen Antibiotika sensitiv. Dieser Impfstoff für Hühner gegen Salmonelleninfektionen wurde Ende 1999 durch das Paul-Ehrlich-Institut zugelassen.

Bewertung:

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden die *Salmonella enterica*-Impfstämme in den Lebendvakzinen „TAD Salmonella vacE“ und „Salmovac SE“ als



Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 1** eingestuft.

Begründung:

Die Einstufung in die **Risikogruppe 1** begründet sich im Wesentlichen auf die langjährige sichere Anwendung dieser Impfstämme.

Hinweis:

Es ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Mutanten durch Klonierung von Fremd-DNA, die auch in einem Gemisch von DNA-Sequenzen (z. B. Genbanken) vorliegen kann, zum Wildtyp komplementiert werden können. Eine Höherstufung der GVO's in die **Risikogruppe 2** ist dann im Einzelfall notwendig.

Gentechnische Arbeiten, bei denen bakterielle Nukleinsäuresequenzen in die Mutanten eingeführt werden, die die Überlebensfähigkeit der Bakterien erhöhen können oder die für Virulenzfaktoren anderer pathogener Bakterien kodieren, sind zur Einstufung der ZKBS vorzulegen.

„Nobilis SG9R“

In diesem Impfstoff wird eine LPS-Mutante (*semi-rough*) des Wildtypstammes *Salmonella enterica enterica* Serovar Gallinarum 9 verwendet. Dieser Wildtypstamm hat eine ausgeprägte Wirtsspezifität für Geflügel. *Salmonella gallinarum* wird allgemein als apathogen für Mäuse, Kälber und Menschen beschrieben. Allerdings gibt es zwei Veröffentlichungen von 1933 bzw. 1934, in denen von Isolationen aus Säugetieren berichtet wird. Andere Veröffentlichungen zeigen, dass die Infektionsdosis für Mäuse bei oraler Gabe mit $10^{7,3}$ KbE deutlich höher als für Hühner mit 100 bzw. $10^{4,2}$ KbE (Infektion am Tag 0 bzw. 21) ist. Trotz der Infektion zeigen die Mäuse keine Krankheitssymptome¹. In den USA wird mit dem Ausgangsstamm im BSL 2 gearbeitet.

Die 9R-Mutante wurde 1956 von Smith entwickelt und wird seither als Lebendvakzin gegen die virulenten Stämme *S. enteritidis*, *S. gallinarum* und *S. pullorum* verwendet. Der teilweise Verlust der Lipopolysaccharide führt bei der Mutante zu einer abgeschwächten Virulenz für Geflügel. Allerdings ist die genetische Ursache dieser Attenuierung bisher nicht geklärt⁹. Nach Herstellerangaben ist die Virulenzabschwächung über 50 Passagen in bebrüteten Eiern und fünf Passagen in Geflügel stabil. Der Stamm kann bei den geimpften Küken eine milde Salmonellose hervorrufen, die sich pathologisch durch Läsionen in Leber und Milz manifestiert, aber nicht tödlich ist⁷. Die Herstellerfirma gibt in ihrem Datenblatt zu „Nobilis SG9R“ an, dass der Impfstamm das Potential hat Menschen zu infizieren. Diese Infektion kann sich in klinischen Symptomen äußern. Über die vorhandene Novobiocin-Resistenz kann der Impfstamm leicht von Wildtypstämmen differenziert werden.

In dem Vakzin „Nobilis SG9R“ ist der Impfstamm *Salmonella enterica enterica* Serovar Gallinarum 9R im August 2001 für die Vakzinierung von Hühnern vom PEI zugelassen worden.

Bewertung:

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird der *Salmonella enterica*-Impfstamm in dem Lebendvakzin „Nobilis SG9R“ als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten in die **Risikogruppe 2** eingestuft.

Begründung:

Der Ausgangsstamm *Salmonella enterica enterica* Serovar Gallinarum 9 besitzt eine hohe Wirtsspezifität für Geflügel. Trotzdem haben Versuche mit Mäusen und Kälbern gezeigt, dass eine Infektion, wenn auch mit höheren Dosen als bei Hühnern, möglich ist. Zudem ist nach Angaben der Herstellerfirma nachgewiesen, dass der Impfstamm humanpathogenes Potential hat und Infektionen beim Menschen auslösen kann, die sich in klinischen Symptomen äußern.



Literatur:

- ¹ P. A. Barrow, M. B. Huggins, and M. A. Lovell, "Host specificity of Salmonella infection in chickens and mice is expressed in vivo primarily at the level of the reticuloendothelial system," *Infect. Immun.* **62**(10), 4602 (1994).
- ² I Hahn, "A Contribution to Consumer Protection: TAD Salmonella VacE - A New Live Vaccine for Chickens Against Salmonella Enteritidis", *Lohmann Information* 23, 29-32 (2000).
- ³ K Linde, J Beer, and B Randhagen, Germany Patent No. EP0642796 (1 September 1993).
- ⁴ G. Martin, *et al.*, "[Immunization with potential Salmonella enteritidis mutants--1. Production and in vitro characterization]," *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **109**(9), 325 (1996).
- ⁵ G. Martin, *et al.*, "[Immunization with potential Salmonella enteritidis mutants-- 2. Investigations on the attenuation and immunogenicity for mice and young hens]," *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **109**(10), 369 (1996).
- ⁶ W. Rabsch, A. Liesegang, and H. Tschape, "[Laboratory-based surveillance of salmonellosis of humans in Germany--safety of Salmonella typhimurium and Salmonella enteritidis live vaccines]," *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **114**(11-12), 433 (2001).
- ⁷ E. N. Silva, *et al.*, "Studies on the use of 9R strain of Salmonella gallinarum as a vaccine in chickens," *Avian Dis.* **25**(1), 38 (1981).
- ⁸ S. Springer, *et al.*, "[A new live Salmonella enteritidis vaccine for chickens--experimental evidence of its safety and efficacy]," *Berl Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **113**(6), 246 (2000).
- ⁹ P. Wigley, *et al.*, "Oral infection with the Salmonella enterica serovar Gallinarum 9R attenuated live vaccine as a model to characterise immunity to fowl typhoid in the chicken," *BMC. Vet. Res.* **1**, 2 (2005).