



Stellungnahme der ZKBS zum Umgang mit rekombinanten Vacciniaviren

1. Einführung

Vacciniaviren finden in der biomedizinischen Forschung als Vektoren für die Expression von heterologen Genen in eukaryotischen Zellen weitreichende Verwendung. Sie eignen sich besonders für bestimmte Zielsetzungen wie hohe Expressionsraten heterologer Gene oder die Immunisierung von Tieren. Das breite Wirtsspektrum erlaubt die Replikation in den verschiedensten Zelltypen und in einer Reihe von Versuchstieren. Die Herkunft des Vacciniavirus ist unklar, möglicherweise ist es aus dem Variola- oder dem Kuhpockenvirus entstanden. Vacciniaviren wurden bis zur formellen Ausrottung der Pocken Ende des 20. Jahrhunderts zur Immunisierung gegen das menschliche Pockenvirus (Variola) verwendet.

Das Vacciniavirus gehört zum Genus Orthopoxviren, Familie *Poxviridae*. Das Virusgenom besteht aus einem doppelsträngigen DNA-Molekül von ca. 187 kbp mit terminalen *hairpin-loop*-Strukturen und inversen Repetitionen. Das Virus vermehrt sich im Zytoplasma der infizierten Zellen. Nach Infektion werden im Zytoplasma durch virale Enzyme, die sich im Virus-core befinden, frühe mRNAs gebildet. Diese kodieren u. a. für die Virus-eigene DNA-Polymerase. Nach Einsetzen der DNA-Replikation werden in zeitlichen Intervallen späte mRNAs synthetisiert, die für verschiedene Enzyme des Nukleinsäure-Metabolismus und für virale Strukturproteine kodieren. Im Zytoplasma werden die sogenannten „intrazellulären, reifen“ Virionen gebildet, die das Nukleoprotein, core-Partikel und einen oder zwei Lateralkörper enthalten. Sie werden durch Zellyse freigesetzt. Ein Teil dieser intrazellulären, reifen Virionen wird mit zwei weiteren Membranen umhüllt, die vom trans-Golgi-Netzwerk stammen und in die Virus-spezifische Polypeptide eingebaut werden („intrazelluläre, umhüllte“ Virionen). Diese Partikel werden als „extrazelluläre, umhüllte“ Virionen in die Umgebung abgegeben, indem ihre äußere Membran mit der Zytoplasmamembran verschmilzt.

Die Insertion heterologer Gene in das Vacciniavirusgenom erfolgt durch homologe Rekombination. Typische Vaccinia-Integrationsplasmide leiten sich von pBR322-Derivaten ab und enthalten einen Vacciniavirus-spezifischen Promotor, hinter den das fremde Gen inseriert wird. Das Fremdgen wird von Vacciniavirus DNA-Sequenzen flankiert, die eine Rekombination in nicht essentielle Regionen des Virusgenoms ermöglichen. In der Regel erfolgt die Insertion in das Thymidinkinasegen (Tk), so dass eine Selektion auf Tk-negative rekombinante Vacciniaviren vorgenommen werden kann. Es ist möglich, bis zu 25 kbp in das Vacciniavirusgenom zu inserieren. Das inserierte Gen darf keine Introns enthalten, da bei Vaccinia-Transkripten kein Spleißen stattfindet.

Gentechnische Arbeiten mit rekombinanten Vacciniaviren wurden von der ZKBS der Sicherheitsstufe 2 zugeordnet.

Das modifizierte Vacciniavirus Ankara (MVA) wurde durch vielfache Passagierung attenuiert und ist für den Menschen und verschiedenste Tiere avirulent. MVA wurde von der ZKBS der

Risikogruppe 1 zugeordnet (Allgemeine Stellungnahme der ZKBS, Vaccinia MVA, Az. 6790-10-74, Juni 2002). Entsprechend wurden gentechnische Arbeiten mit MVA, die heterologe Gene enthalten, die nicht das Wirtsspektrum verändern und nicht das Gefährdungspotential von MVA erhöhen, der Sicherheitsstufe 1 zugeordnet.

2. Problemstellung

Obleich die Wahrscheinlichkeit einer akzidentellen Infektion bei Arbeiten mit rekombinanten Vacciniaviren unter Einhaltung der Grundregeln mikrobiologischer Arbeitstechniken als gering angesehen werden kann und unter Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 nach ausreichender Unterweisung nahezu auszuschließen sein sollte, sind seit Inkrafttreten des Gentechnikgesetzes im Jahr 1990 vereinzelt Infektionen bei Arbeiten mit rekombinanten Vacciniaviren in gentechnischen Laboratorien bekannt geworden. Die klinischen Symptome (lokale Augeninfektion, Enzephalitis, generalisierter Hautausschlag) der Infektionen gingen auf das pathogene Potential von Vacciniaviren zurück.

Außerdem sinkt die Immunität, die innerhalb der Bevölkerung durch eine deutschlandweite Impfkampagne bis zum Jahr 1976 aufgebaut wurde, stetig. So sind nach 1976 Geborene nicht gegen Vacciniaviren immunisiert und es ist fraglich, ob bis 1976 geimpfte Personen mit zunehmendem Alter noch einen hinreichenden Impfschutz besitzen.

Die ZKBS spricht deshalb folgende Empfehlungen für den Umgang mit rekombinanten Vacciniaviren aus:

3. Empfehlungen

1. Vorzugsweise sollten sich gentechnische Arbeiten auf Vacciniaviren mit geringer Virulenz konzentrieren. Beispielhaft wird auf MVA sowie auf die ebenfalls stark attenuierten Stämme NYVAC (Plaque-kloniertes Isolat des Copenhagen-Stammes mit 18 deletierten ORF und stark reduzierter Replikationsfähigkeit in humanen Zellkulturen) und ALVAC (durch Passagierung und Plaque-Klonierung attenuierter Stamm des *Canarypox virus*) verwiesen, die von den *Centers for Disease Control and Prevention* in die Risikogruppe 1 eingestuft wurden [CDC. Vaccinia (smallpox) vaccine: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP), 2001. MMWR 2001;50(No. RR-10):1-25].
2. Um ein Infektionsrisiko bei Arbeiten mit Vacciniaviren der Risikogruppe 2 auszuschließen, ist insbesondere die unbedeckte Haut des Experimentators durch geeignete Maßnahmen vor Verspritzungen zu schützen (z. B. Sicherheitswerkbank, Schutzkleidung, Schutzhandschuhe, ggf. Schutzschild oder geeigneter Gesichtsschutz).
3. Bei der Inokulation von Versuchstieren oder beim Umgang mit Vacciniavirus-infizierten Tieren könnten beteiligte Personen einem höheren Infektionsrisiko (durch Biss, Stich oder Verspritzen bei Injektion) ausgesetzt sein als bei Zellkulturarbeiten. Dies trifft auch auf die Vermehrung rekombinanter Vacciniaviren in großen Volumina und für nachfolgende Konzentrierungsschritte, z. B. bei der Impfstoffproduktion, zu, bei denen der Experimentator/Arbeiter erheblich größeren Mengen infektiöser Viren ausgesetzt sein kann. Daher sind in Tierhaltungsräumen und im Produktionsbereich besondere Sicherheitsmaßnahmen einzuhalten:
 - Einsatz von speziellen Systemen für die Haltung der Tiere (wie z. B. *individually ventilated cages*, IVCs)
 - Bereitstellen von Fixationsvorrichtungen für die gefahrlose Handhabung der Tiere
 - Verwendung einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank bei Tätigkeiten, bei denen Aerosole entstehen können.

Sind die genannten technische Maßnahmen nicht ausreichend oder nicht anwendbar, ist eine geeignete persönliche Schutzausrüstung (z.B. mindestens partikelfiltrierende Halbmaske FFP 2 und Gesichtsschutz) zu tragen.

In diesem Zusammenhang wird darauf hingewiesen, dass die Inaktivierung von Vacciniaviren mit mindestens „begrenzt viruziden“ Desinfektionsmitteln (siehe beispielsweise „Liste der vom RKI geprüften und anerkannten Desinfektionsmittel und -verfahren“, Bundesgesundheitsbl. 2013: 56:1706–1728) durchzuführen ist, da Vacciniaviren sehr widerstandsfähig sind und nach Austrocknung oder Behandlung mit organischen Lösungsmitteln ihre Infektiosität behalten können.

4. Hinweis

Es besteht die Möglichkeit einer Impfprophylaxe mithilfe eines replikationsinkompetenten MVA-Stammes.