



## Stellungnahme der ZKBS

zur Einstufung von zwei *Salmonella* „*enterica*“-Serovar Typhimurium-Impfstämmen für Hühner (Impfstoffe Zoosaloral H bzw. TAD *Salmonella* vacT), einem *Salmonella* „*enterica*“-Serovar Choleraesuis-Impfstamm für Schweine (Impfstoff Suisaloral) sowie einem *Salmonella* „*enterica*“-Serovar Dublin-Impfstamm für Rinder (Impfstoff Bovisaloral) als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten

### I. Einführung:

Salmonellen sind zur Familie der *Enterobacteriaceae* zählende Organismen, die als Wildtyp für den Menschen und/oder verschiedene Tiere obligat pathogen sind und gemäß § 5 Abs. 2 und 6 i. V. m. Anhang I Teil B GenTSV der **Risikogruppe 2** oder **3\*\*** (*S. enterica* Typhi) zugeordnet werden. Für gentechnische Arbeiten werden vielfach Stämme (z. B. Mutanten) von Enteritis-Salmonellen verwendet, die über eine stark abgeschwächte Virulenz verfügen. Es stellt sich daher die Frage, ob auch diese Stämme der **Risikogruppe 2** zuzuordnen sind.

Wildtypstämme von *S. „enterica“*-Serovar Typhimurium verursachen nach Aufnahme von wenigstens  $10^5$ - $10^6$  Bakterien mit der Nahrung beim gesunden erwachsenen Menschen eine Gastroenteritis. Dabei dringen die Bakterien in die Epithelzellen des unteren Dünndarmes ein, werden zum darunterliegenden Bindegewebe (Lamina propria) transportiert und vermehren sich, zum Teil im Inneren von Makrophagen. Infolge der entzündlichen Reaktion unter Beteiligung des bakteriellen Endotoxins und Enterotoxins kommt es zu Störungen des Flüssigkeits- und Elektrolyttransportes und zu Durchfällen, Erbrechen und Fieber. Das Krankheitsbild hält wenige Tage an. Die Salmonellen sind in der Regel im Stuhl noch 4-6 Wochen nach Krankheitsbeginn nachweisbar.

Im Gegensatz zur Gastroenteritis beim Menschen ruft *S. „enterica“*-Serovar Typhimurium bei Mäusen Typhus-ähnliche Krankheitssymptome hervor. Während Stämme des Serovars Typhimurium für den Menschen und viele Tiere pathogen sind, handelt es sich bei den *S. „enterica“*-Serovaren Choleraesuis und Dublin um wirtsadaptierte *Salmonella*-Varianten, deren Pathogenität sich auf das Schwein bzw. Rind konzentriert. Obwohl beide Serovare im Einzelfall schwere Infektionen beim Menschen verursachen können, spielen sie epidemiologisch für die Salmonellose des Menschen keine Rolle. Das Krankheitsbild, daß diese beiden *S. „enterica“*-Serovare bei ihren Wirten hervorrufen, ähnelt den oben beschriebenen durch *S. „enterica“*-Serovar Typhimurium verursachten Krankheitsbildern beim Menschen bzw. bei Mäusen. Neben Durchfällen und Fieber verursachen die Serovare Choleraesuis und Dublin häufig Pneumonien, Gelenkentzündungen und zyklische Allgemeininfektionen, von denen überwiegend Jungtiere betroffen sind. Die Mortalitätsrate kann bei diesen Tieren bis zu 20 – 50 % betragen.

Das Pathogenitätsprinzip der Enteritis-Salmonellen besteht aus einer Reihe von Faktoren, die z.T. in ihrer Bedeutung noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Hierzu gehören u. a. das Lipopolysaccharid (LPS) der äußeren Zellmembran mit dem O-Antigen und dem als Endotoxin wirkenden Lipoid A, ein Enterotoxin mit ADP-Ribosyltransferaseaktivität (Chopra et al., 1987), ein Cytolysin mit hemmender Wirkung auf die Proteinsynthese (Koo et al., 1984) und eine Reihe plasmidkodierter Faktoren, die vermutlich an der Serumresistenz beteiligt sind

(Hackett et al., 1987; Vandenbosch et al., 1987). Das Ausschalten einzelner Faktoren des Pathogenitätsprinzips wie z. B. das des vollständigen O-Antigens der Zellwand führt in der Regel zu einer starken Verminderung oder sogar zum vollständigen Verlust der Virulenz der Bakterien (Groisman et al., 1990; Jimenez-Lucho & Leive, 1990).

Von *S. "enterica"*-Stämmen wurden in den letzten Jahren mit dem Ziel der Entwicklung von avirulenten Lebendimpfstämmen eine Reihe stabiler Mutanten erzeugt (Cardenas & Clements, 1992). Die in die Salmonellen eingeführten Mutationen führten u. a. zu Auxotrophien für bestimmte Aminosäuren und Purine (Linde, 1980; Fields et al., 1986) oder zu Störungen im bakteriellen Stoffwechsel, z.B. bei der DNA-Replikation und Transkription (Linde et al., 1990). Die Auswirkung der Mutationen auf die Virulenz wurde überwiegend an Mäusen getestet. Während bei *S. "enterica"*-Wildtypstämmen bereits eine intraperitoneale Verabreichung von etwa 10 Bakterien zum Tod der Mäuse führen kann, steigt die LD<sub>50</sub> für die attenuierten Mutanten auf 10<sup>5</sup> bis über 10<sup>9</sup> Bakterien, so daß diese Stämme als schwach virulent anzusehen sind.

#### **a) *S. "enterica"*-Serovar Typhimurium-Mutante aus dem Impfstoff Zoosaloral**

Bei dem Zoosaloral-Impfstamm handelt es sich um eine Doppelmutante (his<sup>-</sup>155/ade<sup>-</sup>4), die auxotroph für Histidin und Adenin ist. Die Mutationen wurden durch Behandlung des *S. "enterica"*-Serovar Typhimurium-Wildtypstammes M415 mit N-Methyl-N'-Nitrosoguanidin in einer Konzentration von 100 µg/ml erzeugt. Die Stabilität der beiden Mutationen wird mit einer Reversionsrate von jeweils 10<sup>-7</sup>-10<sup>-8</sup>/Bakterium und Generation angegeben. Der Grad der Attenuierung wurde an Mäusen getestet, bei denen nach intraperitonealer Verabreichung eine LD<sub>50</sub> von >10<sup>8</sup> Bakterien ermittelt wurde (Mitov et al., 1992).

Nach einem vorliegenden Gutachten des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen im Robert Koch-Institut wurden 1985-1989 etwa drei Millionen Impfdosen dieses Lebendimpfstoffes eingesetzt. Während der Entwicklungs- und Erprobungsphase wurden das veterinärmedizinische Fachpersonal und Tierpfleger, die intensiven Kontakt mit diesem Impfstoff hatten, einer Gesundheitsüberwachung unterzogen. Dabei konnte mit Ausnahme eines Falles, der auf einen unsachgemäßen Umgang mit dem Lebendimpfstoff zurückgeführt wurde, keine Erkrankung des Personals oder Ausscheidung des Impfstammes bei diesen Menschen festgestellt werden. Darüberhinaus haben sich bei Untersuchungen zur Rückmutationshäufigkeit die in diesen Impfstamm eingeführten Mutationen als stabil erwiesen.

#### **b) *S. „enterica“*-Serovar Typhimurium-Mutante aus dem Impfstoff TAD Salmonella vacT**

Der in dem Impfstoff TAD Salmonella vac T enthaltene Impfstamm ist ebenfalls ein Derivat des *S. „enterica“*-Serovar Typhimurium-Wildtypstammes M415. Es handelt sich hierbei um eine antibiotikaresistente Stoffwechsel-Doppelmutante (Nal 2/Rif 9), die auf Nährmedien mit 400 µg/ml Nalidixinsäure und 100 µg/ml Rifampicin isoliert wurde und vermutlich Mutationen in den Genen für die Gyrase und RNA-Polymerase aufweist. Hierdurch hat sich die Generationszeit dieses Stammes von ca. 21 Minuten auf ca. 31,4 Minuten verlängert.

Darüber hinaus besitzt der Stamm einen sog. RTT (*reversion to tenside tolerance*)-Marker, der eine hohe Sensibilität gegenüber Makrolid-Antibiotika vermittelt und als antiepidemischer Marker dient. Dieser Marker soll die Überlebensfähigkeit der Bakterien in der Umwelt reduzieren. Für die Stoffwechsellmutationen wird jeweils eine Reversionsrate von 10<sup>-7</sup>/Bakterium und Generation angegeben. Die Reversionsrate für den RTT-Marker beträgt 10<sup>-8</sup>/Bakterium und Generation. Die LD<sub>50</sub> für die Maus beträgt nach intraperitonealer Verabreichung 2 x 10<sup>6</sup> Bakterien. Nach einem vorliegenden Gutachten des Paul Ehrlich-Institutes wurden bei der Zulassung dieses Impfstammes auch Untersuchungen zur humanen Unbedenklichkeit gefordert. Die Prüfung hierzu erfolgte u.a. an Kälbern, die hinsichtlich der Empfänglichkeit ähnlich einzustufen sind wie der Mensch. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen haben belegt,

daß die Mutante für Kälber unschädlich ist. Darüber hinaus wurde während der Entwicklung und beim praktischen Einsatz dieses Impfstammes kontrolliert, ob Menschen, die einen intensiven Kontakt mit dem Lebendimpfstoff hatten, daran erkrankt sind. Hinweise auf eine Gefährdung des Menschen sind bisher nicht bekannt geworden. Die in den Impfstamm eingeführten Mutationen werden im Rahmen jeder Chargenprüfung kontrolliert.

#### **c) S. „enterica“-Serovar Choleraesuis-Mutante aus dem Impfstoff Suisaloral**

Die im Impfstoff Suisaloral enthaltene Mutante basiert auf dem S. „enterica“-Serovar Choleraesuis-Wildtypstamm 431/031. Von diesem Stamm wurde nach Spontanmutation ein Thiamin- und Folsäure-auxotrophes Derivat isoliert, das ein rauhes LPS (unvollständiges O-Antigen) aufwies. Die Mutante wurde daraufhin mit N-Methyl-N'-Nitrosoguanidin (100 µg/ml) behandelt, wodurch eine weitere Mutation erzeugt wurde, die eine Auxotrophie für Adenin (Hypoxanthin) verursachte.

Die Stabilität der Mutationen wurde unter *in vitro*- und unter *in vivo*-Bedingungen untersucht. Für die R-Form-Mutation und die Purin-Auxotrophie wurden jeweils Reversionsraten von ca.  $10^{-8}$ /Bakterium und Generation ermittelt. An verschiedenen Mäusestämmen durchgeführte Passageversuche haben ebenfalls keine Hinweise auf Revertanten erbracht. Die LD<sub>50</sub> dieser Mutante für ICR-Mäuse beträgt nach intraperitonealer Injektion  $10^9$  Bakterien, im Gegensatz zu  $10^3$  Bakterien bei dem Wildtypstamm. Der Impfstamm ist nicht wie ein virulenter Infektionsstamm im Blut von geimpften Ferkeln nachweisbar. Die generelle Verweildauer im Impfling beträgt in der Regel nicht mehr als 3 Wochen. Die Identität der Mutante und die Stabilität der Mutationen werden im Rahmen jeder Chargenprüfung des Impfstoffes kontrolliert.

Von dem Impfstoff Suisaloral wurden mittlerweile über 40 Millionen Impfdosen eingesetzt. Nach vorliegenden Gutachten des Nationalen Referenzzentrums für Salmonellen und des Paul Ehrlich-Institutes sind bisher keine Fälle bekannt geworden, bei denen der Impfstamm zu Erkrankungen von Menschen oder Tieren geführt hat.

#### **d) S. „enterica“-Serovar Dublin-Impfstamm aus dem Impfstoff Bovisaloral**

Bei dem Bovisaloral-Impfstamm handelt es sich um eine Doppelmutante (ade<sup>-</sup>23, thia<sup>-</sup>), die auxotroph für Adenin und Thiamin ist. Die Mutante ist ein Derivat des Nicotinsäureamid-auxotrophen S. enterica-Serovar Dublin-Wildtypstammes 81, der mit N-Methyl-N'-Nitrosoguanidin (100 µg/ml) mutagenisiert wurde. Die Stabilität der erzeugten Mutationen beträgt jeweils  $10^{-7}$ - $10^{-8}$ /Bakterium und Generation und wird routinemäßig bei der Chargenprüfung des Impfstoffes kontrolliert. Die LD<sub>50</sub> des Impfstammes für ICR-Mäuse liegt nach intraperitonealer Applikation bei  $7 \times 10^8$  Bakterien, wohingegen für den Wildtypstamm ein Wert von 5 Bakterien ermittelt wurde. Darüber hinaus haben Untersuchungen zum Persistenzvermögen die Attenuierung des Impfstammes belegt.

Nach einem vorliegendem Gutachten des Paul Ehrlich-Institutes wurden von dem Impfstoff Bovisaloral bisher 12 Millionen Impfdosen eingesetzt. Berichte über Erkrankungen bei Menschen oder Tieren liegen nicht vor. Eine Identifizierung des Impfstammes und Unterscheidung von Wildtypstämmen ist möglich.

## **II. Empfehlung der ZKBS zur Einstufung von zwei *Salmonella* „enterica“-Serovar Typhimurium-Impfstämmen für Hühner, einem *Salmonella* „enterica“-Serovar Choleraesuis-Impfstamm für Schweine sowie einem *Salmonella* „enterica“-Serovar Dublin-Impfstamm für Rinder als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten:**

Die in den Impfstoffen Zoosaloral H, TAD Salmonella vac T, Suisaloral und Bovisaloral enthaltenen attenuierten *Salmonella* „enterica“-Stämme sind gemäß § 5 Abs. 2 i. V. m. Anhang I Teil B GenTSV der **Risikogruppe 1** zuzuordnen, wenn sie bei gentechnischen Arbeiten als

Empfängerorganismen eingesetzt werden. Die Einstufung in die **Risikogruppe 1** begründet sich im wesentlichen auf die langjährige sichere Anwendung dieser Impfstämme. 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 GVOs 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.

## Literatur

- Cardenas, L., & J. D. Clements. 1992. Oral immunization using live attenuated *Salmonella* spp. as carriers of foreign antigens. *Clinical Microbiology* **5**:328-342
- Chopra, A. K., Houston, C. W., Peterson, J. W., Prasad, R. & J. J. Mekalanos. 1987. Cloning and expression of the *Salmonella* enterotoxin gene. *Journal of Bacteriology* **169**:5095-5100
- Fields, P. I., Swanson, R. V., Haidaris, C. G. & F. Hefron. 1986. Mutants of *Salmonella* Typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* **83**:5189-5193
- Groisman, E. A., Fields, P. I. & F. Hefron. 1990. Molecular biology of *Salmonella* pathogenesis. In: *The Bacteria*. Vol. XI: Molecular basis of bacterial pathogenesis. B. H. Iglewski & V. L. Clark eds. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Hackett, J., Wyk, P., Reeves, P. & V. Mathan. 1987. Mediation of serum resistance in *Salmonella* Typhimurium by an 11-kilodalton polypeptide encoded by the cryptic plasmid. *Journal of Infectious Diseases* **155**: 540-549
- Jimenez-Lucho, V. E. & L. L. Leive. 1990. Role of the O-antigen of lipopolysaccharide in *Salmonella* in protection against complement action. In: *The Bacteria*. Vol. XI: Molecular basis of bacterial pathogenesis. B. H. Iglewski & V. L. Clark eds. Academic Press, Inc., San Diego, Calif.
- Koo, F. C. W., Peterson, J. W., Houston, C. W. & N. C. Molina. 1984. Pathogenesis of experimental salmonellosis: Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infection and Immunity* **43**:93-100
- Linde, K.. 1980. Herstellung von stabilen *Salmonella*-Impfstämmen durch Kopplung von zwei unabhängig voneinander nichtvermehrungsbegrenzenden attenuierenden Markern. *Arch. exper. Vet.med.; Leipzig* **34**:19-32
- Linde, K., Beer, J. & V. Bondarenko. 1990. Stable *Salmonella* live vaccine strains with two or more attenuating mutations and any desired level of attenuation. *Vaccine* **8**:278-282
- Mitov, I., Denchev, V. & K. Linde. 1992. Humoral and cell-mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of *Salmonella* Typhimurium: auxotrophic mutants with two attenuating markers. *Vaccine* **10**:61-66
- Vandenbosch, J. L., Rabert, D. K. & G. W. Jones. 1987. Plasmid-associated resistance of *Salmonella* Typhimurium to complement activated by the classical pathway. *Infection and Immunity* **55**:2645-2652