



**Stellungnahme der ZKBS zur  
Einstufung der *Salmonella* Typhimurium Stämme MvP101 und MvP103 (HH104) mit  
Mutationen in den Genen *sseD* bzw. *sseC***

*S. enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium wird gemäß § 5 Abs. 2 und 6 i.V.m. Anhang I Teil B GenTSV der Risikogruppe 2 zugeordnet, da dieser Organismus für den Menschen und verschiedene Tiere obligat pathogen ist.

Die Zentrale Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) hat bereits verschiedene *S. Typhimurium* Mutantenstämme als Empfängerorganismen in die Risikogruppe 1 eingeordnet (siehe Stellungnahmen der ZKBS zur „Einstufung von *S. Typhimurium* LT2-Stämmen und von *S. Typhimurium*-Stämmen mit stabilen Mutationen in den Genen *aroA*, *gaE* oder *cya* und *crp* als Empfängerorganismen bei gentechnischen Arbeiten“ sowie zur „Einstufung von zwei *Salmonella* „*enterica*“-Serovar Typhimurium-Impfstämmen für Hühner (Impfstoffe Zoosaloral H bzw. TAD *Salmonella vac T*), 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“).

Die *S. Typhimurium*-Stämme MvP101 und MvP103 (HH104) enthalten stabile Mutationen in den Genen *sseD* bzw. *sseC*, die für Proteine des Typ-III-Sekretionssystems kodieren. Diese und weitere Gene, die für die systemische Infektion in Mäusen notwendig sind, sind in der Pathogenitätsinsel SPI2 lokalisiert. Homologien zu bekannten Genen von enteropathogenen *E. coli*- und *Yersinia enterocolitica*-Stämmen lassen den Schluß zu, daß es sich bei den *sseC*- und *sseD*-Genprodukten offenbar um Transmembranproteine handelt.

Für die gezielte Herstellung der Mutantenstämme wurden die Gene *sseD* und *sseC* isoliert und mit Hilfe der Vektoren pUC18 bzw. pKS+ in *Escherichia coli* K12 kloniert. Die Kanamycin-Resistenz-Kassette *aphT* wurde in das jeweilige Gen inseriert, wodurch im Gen *sseD* zusätzlich eine Deletion von ca. 40 bp entstand. Nach Subklonierung der mutierten Gene wurden die resultierenden Konstrukte in *E. coli* S17-1 transferiert und anschließend durch Konjugation auf den Wildstamm *S. Typhimurium* NCTC12023 (ATCC 14028s) übertragen. Durch Selektion auf Kanamycin-Resistenz entstanden Klone, die durch homologe Rekombination das intakte Gen gegen das mutierte Gen ausgetauscht hatten.

Die Mutanten wurden durch PCR und Southern-Analyse charakterisiert. Beide Stämme sind in ihrer Virulenz stark abgeschwächt. Die LD<sub>50</sub> bei intraperitonealer Injektion von Balb/c-Mäusen liegt bei 2 - 3x10<sup>6</sup>, bei oraler Gabe liegt sie bei über 10<sup>9</sup> Bakterien, im Vergleich zu dem Wildtyp-Stamm mit einer LD<sub>50</sub> von 6 (i.p.) bzw. 6,9 x 10<sup>5</sup> (oral) Bakterien.

Die beiden *S. Typhimurium* Stämme, die Mutationen in den Genen *sseC* oder *sseD* tragen, werden aufgrund ihrer stabilen Attenuierung in die Risikogruppe 1 eingeordnet, wenn sie bei gentechnischen Arbeiten als Empfängerorganismen eingesetzt werden. 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. 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.