

Beschluss des ABAS zur Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen**Beschluss des ABAS zur Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen
in Risikogruppe 2 nach Biostoffverordnung****Hintergrund:**

Verschiedene Stämme von *Bacillus anthracis* dienen aufgrund fehlender Virulenzfaktoren als Referenzstämmen und spielen somit eine wichtige Rolle in der klinischen Diagnostik. Ihre Einstufung in eine Risikogruppe nach § 4 der Biostoff-Verordnung ist für die Auswahl der Schutzstufe der Laboratorien von großer Bedeutung.

Beschluss des ABAS vom 13.08.2012

Der ABAS hat für folgende *Bacillus anthracis*-Stämme:

1. *B. anthracis* Sterne Impfstamm (34F₂)(pXO1⁺,pXO2⁻)
2. *B. anthracis* STI-1 (russ. Impfstamm) (pXO1⁺,pXO2⁻)
3. *B. anthracis* Stamm Pasteur ATCC 4292 (pXO1⁻,pXO2⁺) und
4. *B. anthracis* Stamm CDC1014 (pXO1⁻,pXO2⁻).

die Herabstufung von Risikogruppe 3 in Risikogruppe 2 beschlossen.

Begründung des Unterausschuss 3 „Einstufung“ des ABAS für die Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen

B. anthracis gehört zur Gattung *Bacillus* und ist ein sporenbildendes, aerob oder fakultativ anaerob wachsendes, Gram-positives, unbewegliches Stäbchen, das in die Risikogruppe 3 eingestuft ist.

Vollvirulente *Bacillus anthracis*-Erreger besitzen zwei Plasmide, welche für die Hauptvirulenzfaktoren kodieren. Die Komponenten des Syntheseapparats für die Ausbildung einer Kapsel aus Poly- γ -D-Glutaminsäure werden vom Plasmid pXO2 kodiert. Die Kapselsynthese erfolgt im infizierten Wirt oder unter speziellen Laborbedingungen. Das Plasmid pXO1 kodiert die Komponenten der beiden Haupttoxine, das Protektive Antigen (PA), den Ödemfaktor (EF) und den Letalfaktor (LF). Das PA bindet an zelluläre Rezeptoren. Nach proteolytischer Prozessierung wird kompetitiv EF oder LF gebunden. Diese Komplexe werden in die Zelle aufgenommen. Beim Ödemfaktor handelt es sich um eine calmodulinabhängige Adenylatzyklase, der Letalfaktor ist eine Zink-Metalloprotease mit proteolytischer Wirkung auf mitogenabhängige Proteinkinase-Kinasen. Beide Toxine wirken synergistisch und führen zur Unterdrückung zellvermittelter und humoraler Immunreaktionen sowie zu massiven Gefäßschädigungen, die in Verbindung mit Gewebe-Hypoxie zu einem Schocksyndrom führen.

Beschluss des ABAS zur Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen

Das kaum immunogene Kapselpolymer verhindert die Opsonierung der Bakterienzelle und damit eine effektive Phagozytose. Außerdem schützt es die darunter liegende Zellwand vor der Bindung von Antikörpern.

Plasmid defiziente Stämme von *B. anthracis*, negativ entweder für das Toxinplasmid pXO1 oder das Kapselplasmid pXO2 oder für beide Plasmide, sind hochgradig in ihrer Virulenz geschwächt und werden daher seit langer Zeit als Veterinär- und Humanvakzine (siehe Übersicht bei Beyer, 2004) bzw. als Laborstamm zur Vermehrung des diagnostischen Gamma-Phagen (CDC1014, negativ für pXO1 und pXO2) eingesetzt.

Der von STERNE 1937 entwickelte Kapselplasmid defiziente Stamm 34F₂ ist der am häufigsten weltweit in der Veterinärmedizin verwendete, kommerziell erhältliche Impfstamm.

Entsprechende Varianten werden heute als „Sterne-like“ bezeichnet und gelten als avirulent für die meisten Tierarten. Die vom Hersteller Onderstepoort Biological Products angegebene Impfdosis beträgt $>2 \times 10^7$ Sporen pro Impfung.

Eine Übersicht zu Impfstoff-Herstellern findet sich in „Anthrax in Humans and Animals“, 4th ed. WHO 2008.

Der Sterne-like Impfstamm STI-1 wurde 1953 in der Sowjetunion für den Einsatz zur Impfung von Menschen lizenziert und in Dosen von $>2 \times 10^9$ an Menschen verimpft.

Eine Mindestinfektionsdosis Virulenzplasmid defizienter Stämme von *B. anthracis* für den Menschen ist nicht bekannt.

Stämme, die nur das kapselkodierende Plasmid pXO2 tragen werden häufig als Pasteur-like bezeichnet. Die Bezeichnung geht auf die erstmals 1881 von L. Pasteur als Veterinärvakzin verwendete Mutante eines *B. anthracis* zurück, die nach längerer Inkubation bei 42°C das toxinkodierende Plasmid verloren hatte. Die Inkubation in Flüssigkultur bei 42°C wird noch heute für das Curing des Plasmids angewandt. Die von L. Pasteur verwendeten Mischungen von plasmidfreien und noch plasmidtragenden *B. anthracis* führten zu unterschiedlichen Restvirulenzen in vakzinierten Tieren. Das noch Vorhandensein eines geringen Anteils an Toxin-positiven Bazillen in den Vakzinedosen wird heute für die schwankende Protektivität des Pasteur-Vakzin verantwortlich gemacht, da bekannt ist, dass Stämme, die keine der Toxin-komponenten kodieren, als Vakzin keine Schutzwirkung entfalten.

Ivins et al. (1986) immunisierten Ratten und Meerschweinchen mit dem originalen Pasteur-Stamm ATCC 4292 (pXO1⁻, pXO2⁺). Ratten wurden vier Wochen lang zwei Mal wöchentlich mit einer Dosis von 2×10^7 KBE immunisiert. Meerschweinchen erhielten die gleiche Dosis zweimal mit zwei Wochen Abstand.

Beschluss des ABAS zur Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen

Welkos et al. (1990, 1993) bestimmten die LD₅₀ eines Pasteur-Stammes (Bezeichnung nicht bekannt) in wenig empfindlichen CBA/J-Mäusen mit 10^{>7.3} und in extrem sensitiven A/J-Mäusen mit 10^{6.1}.

Andere pXO1⁻, pXO2⁺ Mutanten von *B. anthracis* waren in diesen beiden Mauslinien nur schwach oder gar nicht attenuiert, mit Unterschieden zwischen den Mauslinien.

Brossier et al. (2002) bestimmten die LD₅₀ einer Negativmutante für das Protektive Antigen und damit Toxin defizient aber Kapsel bildend (9602P) mit 10⁶-10⁷ für Meerschweinchen. Dasselbe Konstrukt war virulent für eine Auszuchtmauslinie (LD₅₀ = 50 Sporen).

Ähnliche Ergebnisse in einer relativ resistenten Mauslinie (Balb/c) publizierten Heninger et al. (2006). Ihre Toxin defiziente aber Kapsel bildende Mutante war nach intratrachealer oder intravenöser Applikation so virulent wie der Ausgangsstamm.

Zusammenfassend wird festgestellt:

Die Virulenz pXO1 negativer, pXO2 positiver (Pasteur-like) Stämme von *B. anthracis* wird bestimmt durch den chromosomalen Hintergrund des jeweiligen Plamidträgers sowie vom genetischen Hintergrund des infizierten Wirts (Mauslinie). Mäuse sind die bislang einzige Tierart, für die eine hohe Virulenz derartiger Stämme beschrieben wurde. Meerschweinchen und Ratten erwiesen sich als hoch resistent gegenüber der Infektion mit derartigen Stämmen. Der originale Pasteur-Stamm, ATCC 4292, wurde an Ratten und Meerschweinchen in Mehrfachdosen von 2x10⁷ zur Vakzinierung eingesetzt. Vermutlich derselbe Stamm war auch in Versuchen an Mäuselinien hochgradig attenuiert.

Schutzmaßnahmen bei Tätigkeiten mit den herabgestuften Stämmen

Tätigkeiten mit den folgenden Virulenzplasmid defizienten Stämmen von *B. anthracis*

- Stamm Sterne 34F₂ (pXO1⁺, pXO2⁻)
- Stamm STI-1 (pXO1⁺, pXO2⁻)
- Stamm Pasteur ATCC 4292 (pXO1⁻, pXO2⁺)
- Stamm CDC1014 (pXO1⁻, pXO2⁻)

werden – sofern im Verlauf der Tätigkeiten die fehlenden Virulenzfaktoren nicht anderweitig ersetzt werden – der Schutzstufe 2 zugeordnet. Es sind die Schutz- und Sicherheitsmaßnahmen der Schutzstufe 2 gemäß Biostoffverordnung (BioStoffV) und TRBA 100 anzuwenden.

Mit den oben genannten Stämmen stehen in der Virulenz abgeschwächte Laborstämme zur Verfügung, mit denen die Substitutionspflicht nach § 10 (2) BioStoffV für Arbeiten zu Forschungszwecken erfüllt werden kann. Die Virulenzschwächung ist ausreichend und Art und

Beschluss des ABAS zur Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen

Umfang der Attenuierung sowie die genaue Identität des Stammes, der die Virulenzabschwächung aufweist, sind bekannt.

Beschluss des ABAS zur Herabstufung von *Bacillus anthracis*-Stämmen**Literatur**

1. Anthrax, JMAM, vol. 30, 2009, spec. issue.
2. *Bacillus spp.*, in: Mikrobiologische Diagnostik, 2. Auflage, 2009, Hrsg.: B. Neumeister, H. K. Geiss, R. W. Braun, P. Kimmig., S. 386–397.
3. Beyer W. (2004). Impfstrategien zur Milzbrandprophylaxe. Berl. Münchn. Tierärztl. Wschr. (BMTW), 117:508–524.
4. Brossier F., M. Levy, and M. Mock (2002) Anthrax spores make an essential contribution to vaccine efficacy. *Inf. Immun.* 70:661-664.
5. Heninger, S., Drysdale, M., Lovchik, J., Hutt, J., Lipscomb, M.F., Koehler, T.M., and Lyons, C.R. (2006) Toxin-deficient mutants of *Bacillus anthracis* are lethal in a murine model for pulmonary anthrax. *Infect Immun* 74: 6067-6074.
6. In: Anthrax in Humans and Animals, 4th edition. WHO 2008.
7. In: Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, MIQ 26: Hochpathogene Erreger/Biologische Kampfstoffe. Kapitel: *Bacillus anthracis* (Milzbrand), Wolfgang Beyer, Carsten Bartling, Heinrich Neubauer. ELSEVIER, MIQ 26, 2008, Teil I, S. 38–55.
8. Ivins, B.E., J.W. Ezzell, JR., J. Jemski, K.W. Hedlund, J.D. Ristroph, and S.H. Leppla (1986) Immunization studies with attenuated strains of *Bacillus anthracis*. *Inf. Immun.* 52:454-458.
9. Welkos, S., D. Becker, A. Friedlander, and R. Trotter (1990) Pathogenesis and host resistance to *Bacillus anthracis*: a mouse model. *Salisbury Medical Bulletin* 68:49-52.
10. Welkos, S.L., Vietri, N.J., and Gibbs, P.H. (1993) Non-toxigenic derivatives of the Ames strain of *Bacillus anthracis* are fully virulent for mice: role of plasmid pX02 and chromosome in strain-dependent virulence. *Microb Pathog* 14: 381-388.

Der ABAS UA 3 "Einstufung" dankt Herrn PD Dr. med. vet. habil. W. Beyer (Universität Hohenheim) für seine Unterstützung.