



Antrag 6786-01-0213

Zusammenfassung der Risikobewertung des gentechnisch veränderten Bakterienstammes *Rhodococcus equi* RG2837 im Rahmen eines Freisetzungsvorhabens, durchgeführt von der deutschen zuständigen Behörde

Berlin, den 4. Juni 2012

Hinweis zu diesem Dokument:

Der folgende Text fasst die Risikobewertung von gentechnisch veränderten Organismen zusammen, die für ein Freisetzungsvorhaben in Deutschland genutzt werden sollen. Der Text ist Bestandteil des Genehmigungsbescheids, der zu einem Antrag auf Genehmigung einer Freisetzung von gentechnisch veränderten Organismen nach der Richtlinie 2001/18/EG und dem deutschen Gentechnikgesetz (GenTG) erteilt worden ist. Der Bescheid wurde vom Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) als der in Deutschland nach dem Gentechnikrecht zuständigen Behörde ausgestellt und enthält die Abschnitte:

- I. Genehmigung
- II. Nebenbestimmungen
- III. Begründung
 - III.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 GenTG
 - III.1.1. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 1 GenTG
 - III.1.2. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG
 - III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 2 GenTG
 - III.1.4. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 4 und 5 GenTG
 - III.2 Würdigung und Bescheid der Einwendungen
- IV. Kosten
- V. Rechtsbehelfsbelehrung

Nur der Bescheid ist rechtlich verbindlich. Der folgende Auszug umfasst das Kapitel III.1.2. des Bescheides und wurde für das Biosafety Clearing-House zusammengestellt.

III.1.3. Genehmigungsvoraussetzungen gemäß § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG

Das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit ist nach Anhörung der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit und nach Beteiligung des Bundesamts für Naturschutz, des Bundesinstituts für Risikobewertung und des Robert Koch-Instituts im Rahmen des Benehmensverfahrens sowie nach Prüfung der Stellungnahmen des Julius Kühn-Instituts und des Friedrich-Loeffler-Instituts nach § 16 Abs. 4 Satz 1 GenTG zu dem Schluss gelangt, dass nach dem Stand der Wissenschaft keine schädlichen Einwirkungen auf die in § 1 Nr. 1 GenTG bezeichneten Rechtsgüter zu erwarten sind, wie unter III.1.3.1. bis III.1.3.4. begründet wird.

Der Zweck des GenTG nach § 1 Nr. 1 ist es,

unter Berücksichtigung ethischer Werte, Leben und Gesundheit von Menschen, die Umwelt in ihrem Wirkungsgefüge, Tiere, Pflanzen und Sachgüter vor schädlichen Auswirkungen gentechnischer Verfahren und Produkte zu schützen und Vorsorge gegen das Entstehen solcher Gefahren zu treffen.

Mit dieser Formulierung wollte der Gesetzgeber sicherstellen, dass neben der Gefahrenabwehr auch eine „größtmögliche Vorsorge gegen vorhandene oder vermutete Gefahren, die von gentechnischen Verfahren oder Produkten ausgehen können“, getroffen wird (Amtliche Begründung zu § 1 GenTG, BT-Drs. 11/5622, S. 22). Prüfungsmaßstab im Rahmen einer Freisetzungsgenehmigung ist mithin, ob gentechnikspezifische Gefahren auftreten könnten, vgl. auch § 22 Absatz 2 GenTG. Die Annahme einer Gefahr hängt maßgeblich von der Wahrscheinlichkeit des Schadenseintritts und der Art und dem Ausmaß des möglichen Schadens ab.

Nach der Rechtsprechung des BVerwG müssen bei der Gefahrenvorsorge „auch solche Schadensmöglichkeiten in Betracht gezogen werden, die sich nur deshalb nicht ausschließen lassen, weil nach dem derzeitigen Wissensstand bestimmte Ursachenzusammenhänge weder bejaht noch verneint werden können und daher insoweit noch keine Gefahr“ besteht (BVerwGE 72, 300, 315). Hier trifft den Gesetzgeber eine besondere Sorgfaltspflicht, die auch das Bundesverfassungsgericht betont hat (BVerfG, Urteil vom 24.11.2010, Az. 1 BVF 2/05, Rn. 135, zitiert nach Juris).

Der Ausschluss jeglicher schädlicher Auswirkungen kann jedoch nicht verlangt werden, worauf auch in der Begründung des Gesetzes hingewiesen wird (vgl. Amtliche Begründung zu § 16 GenTG, BT-Drs. 11/5622, S. 29). Nach der Vorschrift des § 16 Abs. 1 Nr. 3 GenTG kommt es darauf an, dass nach dem Stand der Wissenschaft im Verhältnis zum Zweck der Freisetzung keine unvermeidbaren schädlichen Einwirkungen zu erwarten sind. Bei der Freisetzung ist nach der Begründung des GenTG eine Gesamtabwägung der zu erwartenden

Wirkungen unter Berücksichtigung der beabsichtigten oder in Kauf genommenen schädlichen Auswirkungen und dem Nutzen des Vorhabens vorzunehmen.

Unter Berücksichtigung dieser rechtlichen Vorgaben ist festzustellen, dass unter Einbeziehung der vorsorglich angeordneten Sicherheitsvorkehrungen (siehe Kapitel III.1.2.) nach dem Stand der Wissenschaft keine schädlichen Einwirkungen auf die Schutzgüter des § 1 Nr. 1 GenTG durch das Vorhaben zu erwarten sind, was im Folgenden begründet wird. Damit ist zugleich festzustellen, dass unvertretbare Risiken nicht bestehen.

Zweck der beabsichtigten Freisetzung ist nach Angaben der Antragstellerin die Bestätigung vorhandener Labordaten zur Wirksamkeit der Impfung unter Feldbedingungen. Die Freisetzung ist Bestandteil einer Studie, deren Ziel die Erhebung von Daten ist, mit denen bei der Europäischen Arzneimittelagentur die Zulassung des Impfstoffs gemäß der EU-Richtlinie 2001/82/EG beantragt werden soll. Der angegebene Zweck ist hier mangels Anhaltspunkten für Gefahren nicht zu bewerten, und eine Risiko-Nutzen-Abwägung ist dementsprechend nicht vorzunehmen.

III.1.3.1. Bewertung der gentechnischen Veränderung

R. equi RG2387 ist eine markerfreie Deletionsmutante ($\Delta ipdAB \Delta ipdAB2$), die sich vom Ausgangsstamm *R. equi* RE1 durch das Fehlen großer Teile der kodierenden Regionen der chromosomalen Gene *ipdAB* und *ipdAB2* unterscheidet.

Die Antragstellerin hat durch die Analyse der Genomsequenz des Vakzinstamms nachgewiesen, dass das Chromosom der Deletionsmutante keine Vektorbestandteile, außer den zur Klonierung der flankierenden Regionen erforderlichen Restriktionsschnittstellen (jeweils sechs Nukleotide), enthält und dass die Rekombinationsereignisse nicht zu genomischen Neukombinationen geführt haben. Des Weiteren ergab eine Sequenzanalyse des im Impfstamm enthaltenen Virulenzplasmides, dass dieses mit dem Plasmid des Ausgangsstammes *R. equi* RE1 übereinstimmt und auch hier keine Bestandteile der verwendeten Plasmid-Vektoren pSelAct-*ipd1* und pSelAct- $\Delta ipdAB2$ integriert wurden.

Die Antragstellerin konnte zeigen, dass der Verlust der Cholesterinkatabolismogene dazu führt, dass *R. equi* RG2837 im Tierversuch apathogen für Fohlen ist, denen der Impfstamm im Abstand von zwei Wochen zweimal oral verabreicht wurde. Auch in einer zweiten Studie, deren Ziel es war zu untersuchen, ob eine orale oder eine rektale Impfung effektiver ist, führte die bis zu viermalige Verabreichung des Impfstamms nicht zu einer Erkrankung der Fohlen. Dies gilt sowohl für die oral als auch für die rektal behandelten Fohlen. Genauso wenig führte die intratracheale Verabreichung des Stammes *R. equi* RG1341, der die für die Attenuierung verantwortliche Deletion $\Delta ipdAB$ aufweist, zu einer Erkrankung der Fohlen. Hinge-

gen konnten bei mit dem Wildtypstamm *R. equi* RE1 behandelten Tieren Krankheitssymptome festgestellt werden.

Hühner, Schweine, Kälber, Mäuse und Ratten erwiesen sich im Tierversuch als nicht-suszeptibel gegenüber einer oralen bzw. oronasalen Infektion sowohl mit dem Ausgangsstamm *R. equi* RE1 als auch mit dem gentechnisch veränderten Stamm *R. equi* RG2837. Im Rahmen dieser Experimente wurde überdies keine Kolonisierung der untersuchten Tiere mit dem gentechnisch veränderten Bakterienstamm festgestellt.

R. equi gehört zur Familie der Nocardiaceae, zu der verschiedene pathogene Erreger zählen, die ebenso wie *R. equi* in Makrophagen überleben können, woraus sie hauptsächlich ihre Virulenz gewinnen. Deshalb hat die Antragstellerin untersucht, ob die Fähigkeit von *R. equi* RG2837, sich *in vitro* in humanen Makrophagen zu etablieren, im Vergleich zu *R. equi* RE1 reduziert ist. Dazu wurde in Zellkulturversuchen die bakterielle Replikation in humanen Makrophagen 76 h nach Infektion bestimmt. Im Ergebnis zeigen die Zellkulturversuche, dass der Impfstamm infolge der gentechnischen Veränderung eine signifikant erniedrigte Fähigkeit aufweist, sich *in vitro* in humanen Makrophagen zu etablieren.

Da die Fähigkeit von *R. equi*, in Makrophagen überleben zu können, maßgeblich für die Virulenz des Bakteriums ist, kann davon ausgegangen werden, dass der Impfstamm infolge der gentechnischen Veränderung eine allgemeine Virulenzminderung erfahren hat, die nicht nur für den empfindlichsten Wirt, das Fohlen, sondern ggf. für alle Tiere gelten dürfte, die suszeptibel gegenüber dem Elternstamm sind.

Allerdings erlaubt der Versuch nur begrenzt Rückschlüsse auf eine mögliche Pathogenität der Vakzine für immunsupprimierte Menschen. Dies liegt vor allem daran, dass nicht bekannt ist, ob der als Negativkontrolle verwendete *R. equi*-Stamm 103⁻, der aufgrund des Fehlens eines VapA-Plasmids bei Fohlen keine Krankheit verursachen kann, auch für immunsupprimierte Menschen apathogen ist. Auch wenn anhand der vorgelegten Daten letztlich nicht ausgeschlossen werden kann, dass der Impfstamm immunsupprimierte Menschen infizieren könnte, so lässt die reduzierte Fähigkeit von *R. equi* RG2837, sich *in vitro* in humanen Makrophagen zu etablieren, darauf schließen, dass der Impfstamm im Vergleich zum Elternstamm RE1 ein vermindertes pathogenes Potential für den Menschen aufweist.

Die gentechnische Veränderung selbst führt nicht zur Generierung eines Bakteriums, das infolge der vorgenommenen Gendeletionen negative Auswirkungen auf die menschliche Gesundheit hat. Die entfernten Gene spielen keine Rolle für die Wirtsspezifität. Da es für den gentechnisch veränderten Impfstamm überdies schwieriger ist, in humanen Makrophagen zu überleben als für den Elternstamm, kann davon ausgegangen werden, dass der Impfstamm im Vergleich zum Ausgangsstamm kein erhöhtes pathogenes Potential aufweist.

In Laborversuchen wurde seitens der Antragstellerin festgestellt, dass geimpfte Fohlen große Mengen von RG2837 in den ersten Tagen nach Impfung mit dem Kot ausscheiden können. Für einige der Versuchsfohlen konnte eine intermittierende Ausscheidung kleiner Mengen des Impfstamms bis zu vier Wochen nach Impfung nachgewiesen werden. Da der Versuch nach vier Wochen beendet wurde, kann eine längere Ausscheidung, die über die getesteten vier Wochen hinausgeht, nicht ausgeschlossen werden. In diesem Zusammenhang gibt die Antragstellerin an, dass bei geimpften Pferden eine langfristige Kolonisierung des Darms theoretisch möglich ist. *R. equi* lebt im Darmlumen als harmloser Kommensale. Infolge der gentechnischen Veränderung wurde die Fähigkeit des Impfstamms abgeschwächt, sich in Makrophagen zu etablieren, worauf die Virulenzminderung des Bakteriums zurückzuführen ist. Da im Darmlumen keine Makrophagen vorhanden sind, ist davon auszugehen, dass sich der Impfstamm hier nicht anders als der Elternstamm verhält. Eine Makrophagen assoziierte Infektion des Respirationstraktes erweist sich hingegen für den Impfstamm als Sackgasse. In einer Studie, in der Mutterstuten und unbehandelte Kontaktfohlen mit dem Kot von mit dem Impfstamm behandelten Testfohlen in Berührung kamen, konnte die Antragstellerin überdies keine Besiedlung dieser Tiere mit dem Impfstamm nachweisen.

Für *R. equi* sind keine Überlebensorgane (Sporen) bekannt. In Überlebensexperimenten im Boden sowie in Teich- und Frischwasser mit anschließender Aufbewahrung bei 4 °C, 22 °C oder 37 °C konnte die Antragstellerin zeigen, dass die Anzahl an Bakterien innerhalb weniger Tage um mehr als 99 % zurückging. Allerdings konnten geringe Mengen des Impfstammes über einen langen Zeitraum überleben, so dass das Bakterium auch nach über einem Jahr isoliert werden konnte. Dabei konnte kein Unterschied in der Überlebensfähigkeit zwischen Impfstamm und Elternstamm festgestellt werden. Entsprechend kann festgehalten werden, dass der gentechnisch veränderte Stamm *R. equi* RG2837 in der Umwelt nicht länger überlebt als der Wildtypstamm RE1.

Die gentechnische Veränderung an sich führt weder zur Generierung eines Bakteriums mit persistenten oder invasiven Eigenschaften noch sind infolge der vorgenommenen Gendelektionen Selektionsvorteile in der Umwelt erkennbar. Da die entfernten Gene auch in verwandten Bakterien zu finden sind, ist ihr Vorhandensein möglicherweise mit einem Vorteil verbunden. Ein evolutionärer Selektionsvorteil durch das Entfernen dieser Gene in *R. equi* ist indessen nicht ersichtlich.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die gentechnische Veränderung zu einer Attenuierung des Impfstamms geführt hat, so dass dieser im Gegensatz zum Elternstamm bei Fohlen keine Erkrankung mehr verursacht. Darüber hinaus ist nicht davon auszugehen, dass die gentechnische Veränderung unbeabsichtigt zu einer Verstärkung der Pathogenität, einer Veränderung des Wirtsspektrums oder einer Veränderung der Umwelteigenschaften geführt hat.

III.1.3.2. Bewertung des Freisetzungsversuchs

R. equi ist ein weltweit verbreitetes Bodenbakterium, das im Erdreich allgegenwärtig vorkommt.

Untersuchungen haben gezeigt, dass in der Umgebung von Pferdefarmen ca. 4×10^3 bis 1×10^4 cfu je Gramm Boden vorkommen, wobei der Anteil der *R. equi*-Isolate mit VapA-Antigen mit 28 % bei einer Farm mit vielen *R. equi*-Infektionen im Vergleich zu 5 % bei einer Farm ohne *R. equi*-Infektionen erhöht war.

Eine auf dem Hauptgestüt durchgeführte Untersuchung hat ergeben, dass *R. equi* hier weit verbreitet ist. Von 64 im Frühjahr 2003 genommenen Bodenproben wurden 87 % positiv auf *R. equi* getestet, wobei 21 % der *R. equi*-Isolate das VapA-Plasmid enthielten. Eine erneute Untersuchung im Hauptgestüt im Sommer 2003 ergab, dass *R. equi* aus 68 % der genommenen Bodenproben isoliert werden konnte. Von diesen Isolaten erwiesen sich sogar 81 % als VapA-positiv. Somit ist zu erwarten, dass die auf dem Gestüt beschäftigten Personen häufig Kontakt mit *R. equi*-Wildtypstämmen haben. Das für die Freisetzung beantragte Stallgebäude befindet sich auf einem zum Gestüt gehörenden, vollständig eingezäunten Gelände, das zwölf Kilometer vom Hauptstandort des Gestüts entfernt liegt und auf dem zeitweise Pferde gehalten werden.

Insgesamt ist davon auszugehen, dass *R. equi* als ubiquitär verbreitetes Bodenbakterium auch in der Umgebung des Freisetzungsortes, auf dem periodisch Pferde gehalten werden, verbreitet ist.

Trotz der weltweiten Verbreitung von *R. equi* und dem gehäuften Auftreten auf Pferdefarmen ist die Gesamtzahl der bisher nachgewiesenen Erkrankungen von immunkompetenten Menschen mit ca. 34 (Stand März 2012) gering, wobei nur etwa ein Drittel der Erkrankten Kontakt zu Pferden oder Schweinen hatte. Infektionen sind mit Kombinationen von Antibiotika wie u. a. Erythromycin, Rifampin oder Ciprofloxacin gut behandelbar.

Nach Angaben der Antragstellerin gab es vor Ort bisher nie Anzeichen einer durch *R. equi* verursachten Infektion bzw. Erkrankung von Menschen. Demnach besteht also auch bei einem hohen Durchseuchungsgrad nur ein geringer Infektionsdruck auf den Menschen, selbst bei Farmen mit zahlreichen Infektionen bei Fohlen, wie es beim Gestüt Lewitz der Fall ist. Vögel gelten als nicht-suszeptibel für eine Infektion mit *R. equi* und Erkrankungen bei Schweinen werden ausschließlich durch Isolate mit VapB-Plasmid oder ohne Virulenzplasmid ausgelöst.

Immunsupprimierte Menschen sind gegenüber einer Reihe natürlicherweise vorkommender *R. equi*-Stämme empfindlich (siehe dazu Kapitel I.1.1. „Beschreibung des nicht gentechnisch veränderten Empfängerorganismus“). *R. equi*-Infektionen bei immunsupprimierten Menschen sind - ebenso wie viele andere Infektionen von Immunsupprimierten mit an sich für Gesunde

harmlosen Bakterien - opportunistischer Natur. Die Datenlage lässt darauf schließen, dass der Impfstamm infolge der gentechnischen Veränderung im Vergleich zum Wildtypstamm kein erhöhtes pathogenes Potential aufweist. Vielmehr lässt die reduzierte Fähigkeit von *R. equi* RG2837, sich *in vitro* in humanen Makrophagen zu etablieren, darauf schließen, dass der Impfstamm im Vergleich zum Elternstamm RE1 ein vermindertes pathogenes Potential für den Menschen aufweist. Die Möglichkeit, dass sich immunsupprimierte Menschen mit *R. equi* RG2837 infizieren könnten, wäre nur dann denkbar, wenn sich sehr große Mengen der gentechnisch veränderten Bakterien in der Umgebung des Freisetzungsortes etablieren können, und wäre zudem nicht spezifisch auf die gentechnische Veränderung zurückzuführen. Bei dem beantragten Freisetzungsvorhaben handelt es sich ohnehin um einen räumlich und zeitlich begrenzten Versuch, in dem der Impfstamm insgesamt 120 Fohlen über einen Zeitraum von drei Jahren verabreicht werden soll. Der Etablierung großer Mengen der gentechnisch veränderten Bakterien außerhalb des Stallgebäudes wird durch spezifische Einschließungsmaßnahmen entgegengewirkt, die von der Antragstellerin vorgesehen wurden bzw. ergänzend in den Nebenbestimmungen unter Punkt II. festgelegt wurden. Ein eventueller Austrag geringer Mengen des Impfstamms, z. B. durch Vögel oder Kleinsäuger, stellt kein erhöhtes Risiko für Mensch, Tier und Umwelt im Vergleich zur weiten Verbreitung pathogener *R. equi*-Wildtypstämme dar.

Der Impfstamm ist sowohl gegenüber einem getesteten Desinfektionsmittel (Halamid®) als auch gegenüber einer Reihe von Antibiotika empfindlich. Genomanalysen des Impfstamms ergaben, dass keine Antibiotikaresistenzgene aus den bei der Konstruktion von *R. equi* RG2837 verwendeten Plasmid-Vektoren übertragen wurden. Somit wirken dieselben Antibiotika, mit denen durch den Elternstamm verursachte Infektionen nachweislich gut behandelbar sind, auch beim Impfstamm.

Die an der Studie teilnehmenden Fohlen sollen im Alter von rund einer Woche zusammen mit ihren Mutterstuten vom Hauptstandort des Gestüts in einen 12 km entfernten Stall gebracht werden. Hier soll den Tieren im Rahmen eines Doppelblindversuches entweder der Impfstoff oder ein Placebo verabreicht werden. Das Stallgebäude befindet sich auf einem vollständig eingezäunten Gelände mit einer Größe von 110 m Länge x 180 m Breite. Gemäß Nebenbestimmung II.14. ist der Zaun mit einer Beschilderung zu versehen, aus der hervorgeht, dass das Betreten des Geländes durch Unbefugte nicht gestattet ist.

Neben dem für die Freisetzung beantragten Stallgebäude befinden sich auf dem umzäunten Gelände drei weitere Ställe, die während der Versuchsperiode nicht genutzt werden sollen. Der für die Freisetzung beantragte Stall selbst hat eine Größe von knapp 1800 qm und gliedert sich in mehrere an der Seite befindliche Einzelboxen, die während der Studie nur in Notfällen benutzt werden sollen, sowie einen Hauptraum, der durch eine Betonwand unterteilt

ist. Der Stall besitzt einen Betonboden und ist an drei Seiten mit festen Wänden sowie an der vierten Seite mit einem Gatter versehen.

Die Fohlen sollen frühestens sechs Wochen nach der letzten Impfung auf das Hauptgestüt zurückgebracht werden. Bis dahin sind die Pferde ausschließlich in dem für die Freisetzung beantragten Stallgebäude zu halten, das sie zwischenzeitlich nicht verlassen dürfen. Bevor die Fohlen vom Freisetzungsort wieder auf das Hauptgestüt überführt werden, soll mittels rektaler Abstriche geprüft werden, ob sich der Impfstamm im Darm der Fohlen etabliert hat. Dazu soll randomisiert ein *pool* von zehn *R. equi*-Kolonien, die aus dem jeweiligen Abstrich isoliert wurden, mittels PCR auf Anwesenheit des Impfstamms überprüft werden. Gemäß Nebenbestimmung II.8. dürfen nur solche Fohlen wieder auf das Hauptgestüt überführt werden, die im Rahmen dieser Überprüfung den Impfstamm nachweislich nicht ausscheiden.

Die Antragstellerin sieht vor, dass das gesamte Personal, das Zugang zum Versuchsstandort hat, mittels einer Produktbroschüre schriftlich über die Art des Impfstamms unterrichtet werden soll. In diesem Zusammenhang soll das Personal angewiesen werden, bei Erkrankungen einen Arzt aufzusuchen und diesen unter Vorlage einer Kopie der Produktbroschüre auf einen möglichen Kontakt mit dem Impfstamm hinzuweisen. Alle die menschliche Gesundheit betreffenden Ereignisse, die auf den Impfstamm zurückgeführt werden könnten, sollen umgehend den zuständigen Behörden gemeldet werden. Da für das an der Freisetzung beteiligte Personal die Möglichkeit besteht, dass es mit sehr großen Mengen des Impfstammes in Kontakt kommt, hat der Betreiber gemäß der Nebenbestimmung II.13. sicherzustellen, dass das Personal im Rahmen einer Unterweisung auch über die mögliche gesundheitliche Gefährdung zu informieren ist, die generell durch das Bakterium *R. equi* verursacht wird und sich somit auch aus dem Umgang mit sehr großen Mengen des gentechnisch veränderten Impfstammes ergeben könnte. Mitarbeiter mit bekanntem immunsupprimierten Status und Mitarbeiter, die sich einer immunsupprimierenden Therapie unterziehen müssen bzw. bereits unterziehen, sollten sich nicht direkt an dem Versuch beteiligen, um einen Kontakt mit sehr großen Mengen des gentechnisch veränderten Impfstammes vorsorglich zu vermeiden.

Weiterhin sieht der Antragsteller vor, dass der Stall nur durch befugtes Personal betreten werden darf, wobei der Haupteingang des Stalls (eine Tür, die sich in einer der drei Gebäudeseiten mit festen Wänden befindet) zu benutzen ist. Das Personal, das den Stall betritt, muss die Kleidung wechseln und dort ständig bereit stehende Stiefel tragen. Vor dem Verlassen der Versuchstiere muss eine Desinfektionsmatte begangen werden. Es ist vorgesehen, ein Protokollbuch zu führen, in dem alle Eingangs- und Ausgangsbewegungen von Personen und von Pferden aufgezeichnet werden. Der Stall darf über die mit einem Gatter versehene Seite des Gebäudes nur dann betreten oder verlassen werden, wenn das Stroh ausgetauscht werden muss oder die Tiere an- bzw. abtransportiert werden.

Gemäß Nebenbestimmung II.7. ist die Antragstellerin dazu verpflichtet, das Stallgebäude und dessen unmittelbare Umgebung täglich zu kontrollieren, solange am Versuch teilnehmende Pferde am Ort der Freisetzung (Stallgebäude) gehalten werden. Dabei ist auch auf Auffälligkeiten bei Wechselwirkungen zwischen dem GVO und den Versuchspferden und ggf. anderen Organismen, die mit den gentechnisch veränderten Bakterien in Kontakt kommen können, zu achten. Erforderlichenfalls sind risikominimierende Maßnahmen zu ergreifen.

Die Antragstellerin sieht vor, erkrankte Tiere ggf. mit Antibiotika zu behandeln. Im unwahrscheinlichen Fall einer Infektion von Menschen sollen auch diese mit geeigneten Antibiotika behandelt werden. Sollte ein behandeltes Tier während der Studie verenden, so soll von der Universität Hannover (oder einem anderen zugelassenen Labor) eine Autopsie vorgenommen und die Überreste als kontaminierte Abfallstoffe behandelt werden.

Die Antragstellerin sieht vor, gebrauchtes Impfgerät und leere Ampullen durch Verbrennung oder Eintauchen in ein geeignetes Desinfektionsmittel zu entsorgen.

Gemäß Nebenbestimmung II.9. ist der vor dem Stall befindliche Betonboden regelmäßig auf den Austrag von Mist und Kot aus dem Stall zu kontrollieren. Ggf. ist der Austrag zu entfernen und zu entsorgen und der Boden an der entsprechenden Stelle zu desinfizieren.

Nachdem die jeweils anwesende Fohlengruppe den Stall verlassen hat, sollen Stroh, Einstreu und Mist mechanisch in geschlossene Behälter überführt, abtransportiert und durch ein zugelassenes Spezialunternehmen verbrannt werden. Nebenbestimmung II.11. verfügt in diesem Zusammenhang, dass die Behälter für den Fall, dass sie nicht mit verbrannt werden, nach Verwendung zu desinfizieren sind. Bei Bedarf kann das Stroh nach Angaben der Antragstellerin auch zwischenzeitlich ausgewechselt werden. Diesbezüglich sieht Nebenbestimmung II.10. vor, dass der in den Spitzenzeiten der Ausscheidung (an den ersten zwei Tagen nach erfolgter Impfung) produzierte Kot bzw. Mist zwischenzeitlich zu entfernen und Stroh und Einstreu auszutauschen sind. Kontaminiertes Stroh, Einstreu und Mist sind wie zuvor angegeben zu entsorgen.

Zudem ist in jedem Jahr eine weitere Reinigung vorgesehen, nachdem alle Studienpferde den Freisetzungsort verlassen haben. Dazu sollen nach der vollständigen Beseitigung von Stroh, Einstreu und Mist der Stall, der gesamte Betonboden in und vor dem Stall sowie sämtliche verwendeten Gerätschaften zunächst mit Wasser gereinigt und anschließend mit Halamid® (Chloramin-T) in Standardkonzentration desinfiziert werden. Hierauf Bezug nehmend sieht Nebenbestimmung II.12. vor, dass auf eine flächendeckende Desinfektion mit Halamid® zu achten ist. Überdies hat die Antragstellerin sicherzustellen, dass auch das verwendete Reinigungswasser vor Entsorgung desinfiziert wird.

Der Boden rund um den Stall soll stichprobenartig auf das Vorhandensein von *R. equi* RG2837 überprüft werden. Dazu sollen 1.) am Tag der Impfung, 2.) beim Abtransport der Fohlen und 3.) sechs Wochen nachdem die letzte Fohlengruppe des betreffenden Jahrgangs den Freisetzungsort verlassen hat Proben von ~ 25 g des Oberbodens a) an zwei Stellen am Rand des vor dem Stall befindlichen Betonbodens, b) an zwei Stellen nahe des Gatters des Freisetzungsortes sowie c) an einer Stelle nahe der Rückseite des Stalls genommen werden. Die genommenen Bodenproben sollen auf die Anwesenheit des Impfstamms überprüft werden, indem pro Probennahmestelle bis zu fünf Isolate typisiert werden. Falls der Nachweis auf den Impfstamm für eine der am Ende des jeweiligen Fohlenjahrgangs genommenen Bodenproben positiv ausfällt, ist vorgesehen, die Überprüfung in zweimonatigem Abstand zu wiederholen, bis sie zweimal hintereinander negativ ausfällt. Die Antragstellerin ist gemäß Nebenbestimmung II.4. dazu verpflichtet, die Ergebnisse der vorgesehenen Untersuchungen von Bodenproben auf das Vorkommen der gentechnisch veränderten Bakterien in die der Behörde vorzulegenden Freisetzungsberichte aufzunehmen.

III.1.3.3. Bewertung der Möglichkeit einer Übertragung genetischen Materials von den gentechnisch veränderten Bakterien in die Umwelt oder auf andere Organismen

Da es sich bei dem Impfstamm um eine markerfreie Deletionsmutante handelt, können im Rahmen der Freisetzung keine neuen Gene in die Umwelt eingeführt oder auf andere Organismen übertragen werden. Somit kann der Impfstamm kein anderes genetisches Material als der ubiquitär verbreitete Wildtypstamm in die Umwelt einführen bzw. auf andere Organismen übertragen. Dies gilt sowohl für das Bakterienchromosom als auch für das VapA-Plasmid, das Wildtypstamm und gentechnisch veränderter Stamm gleichermaßen tragen.

Bei dem beantragten Freisetzungsvorhaben handelt es sich um einen räumlich und zeitlich begrenzten Versuch, in dem der gentechnisch veränderte Impfstamm insgesamt 120 Fohlen über einen Zeitraum von drei Jahren verabreicht werden soll. Der Etablierung großer Mengen der gentechnisch veränderten Bakterien außerhalb des Stallgebäudes wird ohnehin durch spezifische Einschließungsmaßnahmen entgegengewirkt, die von der Antragstellerin vorgesehen bzw. ergänzend in den Nebenbestimmungen unter Punkt II. festgelegt wurden. Somit wird auch die Gesamtfrequenz einer Übertragung des genetischen Materials, das gentechnisch veränderter Stamm und Wildtypstamm gleichermaßen tragen, in die Umwelt oder auf andere Organismen durch die beantragte Freisetzung in Anbetracht der weiten Verbreitung des Wildtyp-*R. equi* nicht erkennbar erhöht.

III.1.3.4. Bewertung der genetischen Stabilität der gentechnischen Veränderung

Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass die im Genom des Impfstamms vorgenommenen Deletionen durch einen DNA-Austausch mit anderen Bakterien, die die fehlenden Gene in ihrem Genom tragen, wiederhergestellt werden. Ein solcher Gentransfer hätte zur Folge, dass die gentechnisch veränderten Bakterien wieder uneingeschränkt in Makrophagen überleben und sich dort vermehren könnten, wodurch sie wieder in der Lage wären, bei jungen Fohlen eine Lungenentzündung zu verursachen. Allerdings ist die Wahrscheinlichkeit einer Reparatur der Gendeletionen durch Rekombination sehr unwahrscheinlich, da die Deletionen nicht auf mobilen Elementen, sondern auf dem Bakterienchromosom vorgenommen wurden. Da überdies nahezu das komplette Operon deletiert wurde, müsste sowohl das *ipdA*- als auch das *ipdB*-Gen ersetzt werden, um die Funktion wiederherzustellen. Für den sehr unwahrscheinlichen Fall einer solchen homologen Rekombination zwischen dem gentechnisch veränderten Bakterium und dem Wildtyp *R. equi* ist zu bedenken, dass der entstehende Stamm wieder identisch zum Wildtypstamm wäre, welcher in der Umwelt ohnehin häufig vorkommt.