

Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung von
***Vibrio cholerae* C6706 Δ CTX Φ**
als Spender- oder Empfängerorganismus
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Allgemeines

Vibrio cholerae ist ein weltweit verbreitetes Gram-negatives Bakterium der Familie der *Vibrionaceae*. Als Erreger der Cholera wird es gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV der Risikogruppe 2 zugeordnet. Die Übertragung des Erregers erfolgt hauptsächlich fäkal-oral über verschmutztes Trinkwasser, in seltenen Fällen auch direkt über infizierte Personen. Die Pathogenität von *V. cholerae* beruht hauptsächlich auf der Expression des Cholera-toxins, eines Enterotoxins, das aus den zwei Untereinheiten A und B zusammengesetzt ist. Die Untereinheit B vermittelt dabei die Bindung des Toxins an seinen zellulären Rezeptor Gangliosid GM1 [1], während Untereinheit A die G-Protein-Untereinheit Gs ribosyliert, so dass diese konstitutiv aktiv vorliegt. Dies führt zu einer Aktivierung der membranständigen Adenylatzyklase und dadurch zur vermehrten Bildung von cAMP in der Darmschleimhaut und zu starkem Flüssigkeitsverlust aufgrund der Sekretion von Chloridionen und Wasser über den Darm [2]. Die für die Toxin-Untereinheiten kodierenden Gene *ctxA* und *ctxB* liegen in einem Prophagen vor, der ein- oder mehrfach im Genom von *V. cholerae* enthalten sein kann. Der *V. cholerae*-Stamm CVD103-HgR von *V. cholerae* (Handelsnamen Orochol[®], Vaxchora[®]) wurde bzw. wird als Lebendvakzine genutzt. Im Genom dieses Stammes sind sowohl das *ctxA*-Gen als auch das Hämolysegen *hlyA* inaktiviert und es wird kein Shiga-ähnliches Toxin sezerniert [3].

In der vorliegenden Stellungnahme wird hingegen der Stamm *V. cholerae* C6706 Δ CTX Φ bewertet. Der Stamm basiert auf dem klinischen Isolat *V. cholerae* C6706, das zum Biotyp El Tor, Serotyp O1 gehört, hämolytisch ist und ein intaktes *hlyA*-Gen besitzt [4]. Aus dem Genom von *V. cholerae* C6706 wurden der vollständige Cholera-toxin-Prophage CTX Φ und benachbarte Regionen entfernt, so dass neben den Genen *ctxAB* selbst auch die Gene *rtxABCDE* für das Toxin MARTX (*multifunctional autoprocesing repeats-in-toxin*) und die Sequenzen deletiert wurden, die für die chromosomale Integration von CTX Φ erforderlich sind.

Informationen zur Pathogenität von *V. cholerae* C6706 Δ CTX Φ selbst liegen nicht vor. Es wurde jedoch bereits die Pathogenität folgender weiterer *ctxA*-Mutanten für den Menschen untersucht: *V. cholerae* CVD101 ist ein Derivat des pathogenen Wildtypisolats *V. cholerae* Ogawa 395, bei dem *ctxA* deletiert wurde. Die orale Verabreichung von 10⁴ colony forming units (cfu) von *V. cholerae* CVD101 an immunkompetente junge Erwachsene führte bei vier von sechs Testpersonen zu leichtem Durchfall. Daher gilt dieser Stamm als nicht ausreichend attenuiert, um als Lebendimpfstoff verabreicht zu werden [5]. Die orale Verabreichung von 10⁷ cfu des *V. cholerae*-Stamms Bengal-3, der von einem klinischen Isolat des Serotyps O139 von *V. cholerae* abgeleitet ist und dem die Gene *ctxAB* sowie die Gene für das *zonula occludens toxin* und das *accessory cholera toxin* fehlen, rief bei gesunden Erwachsenen ebenfalls Durchfall hervor [6]. Grund für die niedrige Pathogenität von *ctxA*-Mutanten ist wahrscheinlich, dass *V. cholerae* neben CTX noch über eine Reihe von weiteren

Virulenzfaktoren wie z. B. Hämolysin, den *toxin-coregulated pilus*, Kolonisierungsfaktoren, Zytolysine, das Shiga-ähnliche Toxin bzw. polare Geißeln verfügen und für die vollständige Attenuierung der Verlust mehrerer dieser Virulenzfaktoren erforderlich ist [5; 6]. Über den Ausgangsstamm *V. cholerae* C6706 ist bekannt, dass er aktives Hämolysin sezerniert [7].

Die von *V. cholerae* Ogawa 395 abgeleiteten Stämme *V. cholerae* O395-N1, in dessen *ctxA*-Gen der Teil deletiert wurde, der für das aktive Zentrum der A-Untereinheit kodiert [8], und *V. cholerae* O395-NT, bei dem zusätzlich beide Kopien des *ctxB*-Gens mutiert vorliegen, wurden bereits von der ZKBS der Risikogruppe 2 zugeordnet (Az. 6790-05-01-64, Oktober 2003 und 6790-05-01-90, Februar 2010). Der Stamm *V. cholerae* O139 MO10 Bengal-2, der vom Stamm *V. cholerae* O139 abgeleitet ist und dem die Gene *ctxAB* sowie die Gene für das *zonula occludens toxin* und das *accessory cholera toxin* fehlen, wurde von der ZKBS ebenfalls der Risikogruppe 2 zugeordnet (Az. 6790-05-01-78, September 2005). Bei den o. g. Stämmen konnte eine geringe Pathogenität nicht ausgeschlossen werden.

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV wird *V. cholerae* C6706 Δ CTX Φ als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung

Informationen zur Pathogenität von *V. cholerae* C6706 Δ CTX Φ liegen nicht vor. Cholera toxinmutanten von *V. cholerae* sind grundsätzlich nicht vollständig attenuiert, wenn bei ihnen außer *ctxAB* nicht weitere Virulenzfaktorgene wie z. B. für Flagellen und/oder Hämolysin deletiert werden. Eine geringe Pathogenität von *V. cholerae* C6706 Δ CTX Φ kann nicht ausgeschlossen werden.

Literatur

- [1] **Le Vine H, Cuatrecasas P (1981)**. An overview of toxin-receptor interactions. *Pharmacol Ther.* **12(1)**:167-207.
- [2] **Guttman JA, Finlay BB (2008)**. Subcellular alterations that lead to diarrhea during bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.* **16(11)**:535-42.
- [3] **O'Brien A, Chen M, Holmes R, Kaper J, Levine M (1984)**. Environmental and human isolates of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* produce a Shigella dysenteriae 1 (Shiga)-like cytotoxin. *Lancet.* **323(8368)**:77-8.
- [4] **Fan Y, Li Z, Li Z, Li X, Sun H, Li J, Lu X, Liang W, Kan B. (2019)**. Nonhemolysis of epidemic El Tor biotype strains of *Vibrio cholerae* is related to multiple functional deficiencies of hemolysin A. *Gut Pathog.* **11(1)**:38.
- [5] **Levine MM, Kaper JB, Herrington D, Losonsky G, Morris JG, Clements ML, Black RE, Tall B, Hall R (1988)**. Volunteer Studies of deletion mutants of *Vibrio cholerae* O1 prepared by recombinant techniques. *Infect Immun.* **56(1)**:161-7.
- [6] **Coster TS, Killeen KP, Waldor MK, Beattie DT, Spriggs DR, Kenner JR, Trofa A, Sadoff JC, Mekalanos JJ, Taylor DN (1995)**. Safety, immunogenicity, and efficacy of live attenuated *Vibrio cholerae* O139 vaccine prototype. *Lancet.* **345(8955)**:949-52.
- [7] **Fan Y, Li Z, Li Z, Li X, Sun H, Li J, Lu X, Liang X, Kan B (2019)**. Nonhemolysis of epidemic El Tor biotype strains of *Vibrio cholerae* is related to multiple deficiencies of hemolysin A. *Gut Pathog.* **11**:38.
- [8] **Mekalanos JJ, Swartz DJ, Pearson GD, Harford N, Groyne F, de Wilde M (1983)**. Cholera toxin genes: nucleotide sequence, deletion analysis and vaccine development. *Nature.* **306(5943)**:551-7.