ZKBS
Zentrale Kommission
für die Biologische Sicherheit

Az. 45241.0245 November 2022

Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung von *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhi ZH9 (Ty2 *aroC*⁻ *ssaV*⁻) als Spender- oder Empfängerorganismus gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV

Allgemeines

Salmonella enterica ssp. *enterica* Serovar Typhi (*S.* Typhi) ist ein fakultativ intrazelluläres, humanpathogenes Bakterium der Familie *Enterobacteriaceae*. Es ist weltweit verbreitet und verursacht v. a. in Regionen mit unzureichenden sanitären bzw. hygienischen Bedingungen (wie z. B. in Südostasien, Afrika, Zentral- und Südamerika) die systemische Infektionskrankheit Typhus, an der jährlich über 10 Millionen Menschen erkranken und über 100.000 Menschen sterben [1]. In der Organismenliste der ZKBS wird *S*. Typhi der **Risikogruppe 3**** zugeordnet [2].

In dieser Stellungnahme soll der attenuierte Stamm *S*. Typhi ZH9 eingestuft werden, der auf seine Eignung als Lebendimpfstoff, auch bezeichnet als M01ZH09, untersucht wird.

Zur Entwicklung von ZH9 wurde als Ausgangsstamm *S*. Typhi Ty2 gewählt, der im Vergleich zu anderen *S*. Typhi-Wildtypstämmen bereits eine Attenuierung aufweist. Diese ist zurückzuführen auf eine Mutation im Gen des alternativen Sigma-Faktors RpoS, wodurch die Bakterien weniger stressresistent sind [3]. Durch das Einfügen von zwei weiteren Mutationen in Ty2, einer 600 bp-Deletion in *aroC* und einer 1893 bp-Deletion in *ssaV*, wurde der Stamm *S*. Typhi ZH9 generiert [4]. Das Genprodukt von *aroC* ist an der Biosynthese von aromatischen Aminosäuren beteiligt, sodass dessen Mutation eine Auxotrophie für Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan verursacht. Durch die Deletion in *ssaV*, das für ein Strukturprotein des Typ-III-Sekretionssystems (T3SS) der Salmonella-Pathogenitätsinsel 2 (SPI-2) kodiert, wird zudem die systemische Ausbreitung des Bakteriums verhindert [4].

In humanen Studien mit *S*. Typhi-Derivaten, die eine Deletion in *aroC*, aber nicht in *ssaV* trugen, waren diese zwar attenuiert, verursachten jedoch eine symptomlose Bakteriämie [4, 5]. Mutationen des T3SS der SPI-2 im human- und tierpathogenen *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium, einem mit *S*. Typhi nah verwandten Bakterium, führten zu einer verringerten Replikation innerhalb von Makrophagen und zu einer verringerten Virulenz in Mäusen [4, 6, 7].

Zur Verträglichkeit und Wirksamkeit von *S.* Typhi ZH9 liegen die Ergebnisse von sechs klinischen Studien der Phasen I und II in verschiedenen Bevölkerungsgruppen, einschließlich Kindern, mit insgesamt 371 Probanden vor [4, 8–12]. Nach einer einmaligen oralen

BVL_FO_05_4100_402_V1.7

Verabreichung von Dosen zwischen 1×10^7 bis $1{,}7 \times 10^{10}$ koloniebildenden Einheiten (KBE) wurde der Impfstamm insgesamt als gut verträglich und sicher beschrieben. Es traten keine Bakteriämien oder andere schwerwiegende Nebenwirkungen (*serious adverse event*, SAE) auf. Am häufigsten wurden als unerwünschte Ereignisse (*adverse event*, AE) sowohl in den Impf- als auch in den Placebo-Gruppen gastrointestinale Nebenwirkungen, Kopfschmerzen und Fieber beobachtet. Diese wurden zumeist als leicht (Grad 1), gelegentlich als mittelschwer (Grad 2) und in wenigen Fällen als schwer (Grad 3) beurteilt [4, 8–12]. Zu den als Grad 3 eingestuften AEs der Impfgruppe gehörten Fieber, aufgetreten bei einem Probanden, dessen Bluttest vor der Impfung eine erhöhte Anzahl weißer Blutkörperchen aufwies [11], Appetitlosigkeit [12], Schüttelfrost und ein epileptischer Anfall, der zwei Stunden nach der Impfung auftrat, wobei der betreffende Proband vor der Impfung Drogen (Methylendioxymethamphetamin, Alkohol und Marihuana) konsumiert hatte [10].

Ein weiteres Indiz für die Attenuierung von *S*. Typhi ZH9 ist seine verringerte Biodistribution und Ausscheidung im Vergleich zum Wildtyp. In Patienten mit Typhus werden *S*. Typhi-Bakterien häufig im Blut und in den Fäzes nachgewiesen, teilweise auch im Urin. Berichten zufolge scheiden 10 % der unbehandelten infizierten Personen *S*. Typhi bis zu drei Monate über Fäzes aus [13, 14]. In klinischen Studien mit ZH9 kam es jedoch zu keinen Bakteriämien, d. h. es wurden keine *S*. Typhi ZH9-Bakterien in Blutproben detektiert. Ausscheidungen des Impfstamms über Fäzes wurden größtenteils in den ersten Tagen bis zu sieben Tage nach der Verabreichung nachgewiesen [4, 8–12]. In wenigen Fällen, vor allem nach der Verabreichung von hohen Dosen, trat eine Ausscheidung von ZH9 auch nach sieben Tagen, jedoch höchstens bis zum Tag 17 auf [10]. In keinen der Urinproben wurde *S*. Typhi ZH9 detektiert [4, 9–11].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV wird *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Serovar Typhi ZH9 (Ty2 *aroC*$^-$ *ssaV*$^-$) als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 1** zugeordnet.

Begründung

S. Typhi ZH9 ist ein attenuierter, potentieller Impfstamm, der sich in mehreren klinischen Studien mit über 350 Probanden als gut verträglich erwiesen hat.

Literatur

1. **Stanaway JD, Reiner RC, Blacker BF, Goldberg EM, Khalil IA, Troeger CE, Andrews JR, Bhutta ZA, Crump JA, Im J, Marks F, Mintz E, Park SE, Zaidi AKM, Abebe Z, Abejie AN, Adedeji IA, Ali BA, Amare AT, Atalay HT, Avokpaho EFGA, Bacha U, Barac A, Bedi N, Berhane A, Browne AJ, Chirinos JL, Chitheer A, Dolecek C, El Sayed Zaki M, Eshrati B, Foreman KJ, Gemechu A, Gupta R, Hailu GB, Henok A, Hibstu DT, Hoang CL, Ilesanmi OS, Iyer VJ, Kahsay A, Kasaeian A, Kassa TD, Khan EA, Khang Y-H, Magdy Abd El Razek H, Melku M, Mengistu DT, Mohammad KA, Mohammed S, Mokdad AH, Nachega JB, Naheed A, Nguyen CT, Nguyen HLT, Nguyen LH, Nguyen NB, Nguyen TH, Nirayo YL, Pangestu T, Patton GC, Qorbani M, Rai RK, Rana SM, Ranabhat CL, Roba KT, Roberts NLS, Rubino S, Safiri S, Sartorius B, Sawhney M, Shiferaw MS, Smith DL, Sykes BL, Tran BX, Tran TT, Ukwaja KN, Vu GT, Vu LG, Weldegebreal F, Yenit MK, Murray CJL, Hay SI** (2019). The global

burden of typhoid and paratyphoid fevers: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet Infect Dis* **19**(4):369–81.

2. **ZKBS**. Organismen-Datenbank https://zag.bvl.bund.de/organismen/index.jsf;jsessionid=lBw3IbuIAgYccnScUvpPUNIi3PxkOS5-yjSiajA8.subs208?dswid=2794&dsrid=15. Besucht am 07.10.2022.
3. **Burda WN, Brenneman KE, Gonzales A, Curtiss R** (2018). Conversion of RpoS- Attenuated *Salmonella enterica* Serovar Typhi Vaccine Strains to RpoS+ Improves Their Resistance to Host Defense Barriers. *mSphere* **3**(1).
4. **Hindle Z, Chatfield SN, Phillimore J, Bentley M, Johnson J, Cosgrove CA, Ghaem-Maghami M, Sexton A, Khan M, Brennan FR, Everest P, Wu T, Pickard D, Holden DW, Dougan G, Griffin GE, House D, Santangelo JD, Khan SA, Shea JE, Feldman RG, Lewis DJM** (2002). Characterization of *Salmonella enterica* derivatives harboring defined *aroC* and *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system (ssaV) mutations by immunization of healthy volunteers. *Infect Immun* **70**(7):3457–67.
5. **Bumann D, Hueck C, Aebischer T, Meyer TF** (2000). Recombinant live *Salmonella* spp. for human vaccination against heterologous pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* **27**(4):357–64.
6. **Cirillo DM, Valdivia RH, Monack DM, Falkow S** (1998). Macrophage-dependent induction of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system and its role in intracellular survival. *Mol Microbiol* **30**(1):175–88.
7. **Shea JE, Beuzon CR, Gleeson C, Mundy R, Holden DW** (1999). Influence of the *Salmonella* typhimurium pathogenicity island 2 type III secretion system on bacterial growth in the mouse. *Infect Immun* **67**(1):213–9.
8. **Kirkpatrick BD, Tenney KM, Larsson CJ, O'Neill JP, Ventrone C, Bentley M, Upton A, Hindle Z, Fidler C, Kutzko D, Holdridge R, Lapointe C, Hamlet S, Chatfield SN** (2005). The novel oral typhoid vaccine M01ZH09 is well tolerated and highly immunogenic in 2 vaccine presentations. *J Infect Dis* **192**(3):360–6.
9. **Kirkpatrick BD, McKenzie R, O'Neill JP, Larsson CJ, Bourgeois AL, Shimko J, Bentley M, Makin J, Chatfield S, Hindle Z, Fidler C, Robinson BE, Ventrone CH, Bansal N, Carpenter CM, Kutzko D, Hamlet S, Lapointe C, Taylor DN** (2006). Evaluation of *Salmonella enterica* serovar Typhi (Ty2 *aroC-ssaV-*) M01ZH09, with a defined mutation in the *Salmonella* pathogenicity island 2, as a live, oral typhoid vaccine in human volunteers. *Vaccine* **24**(2):116–23.
10. **Lyon CE, Sadigh KS, Carmolli MP, Harro C, Sheldon E, Lindow JC, Larsson CJ, Martinez T, Feller A, Ventrone CH, Sack DA, DeNearing B, Fingar A, Pierce K, Dill EA, Schwartz HI, Beardsworth EE, Kilonzo B, May JP, Lam W, Upton A, Budhram R, Kirkpatrick BD** (2010). In a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial, the single oral dose typhoid vaccine, M01ZH09, is safe and immunogenic at doses up to 1.7 x 10(10) colony-forming units. *Vaccine* **28**(20):3602–8.
11. **Tran TH, Nguyen TD, Nguyen TT, van Ninh TT, Tran NBC, van Nguyen MH, Tran TTN, Cao TT, van Pham M, Nguyen TCB, Tran TDH, van Pham T, To SD, Campbell JI, Stockwell E, Schultsz C, Simmons CP, Glover C, Lam W, Marques F, May JP, Upton A, Budhram R, Dougan G, Farrar J, van Nguyen VC, Dolecek C** (2010). A randomised trial evaluating the safety and immunogenicity of the novel single oral dose typhoid vaccine M01ZH09 in healthy Vietnamese children. *PLoS One* **5**(7):e11778.
12. **Darton TC, Jones C, Blohmke CJ, Waddington CS, Zhou L, Peters A, Haworth K, Sie R, Green CA, Jeppesen CA, Moore M, Thompson BAV, John T, Kingsley RA, Yu L-M, Voysey M, Hindle Z, Lockhart S, Sztein MB, Dougan G, Angus B, Levine MM, Pollard AJ** (2016). Using a Human Challenge Model of Infection to Measure Vaccine Efficacy: A Randomised, Controlled Trial Comparing the Typhoid Vaccines M01ZH09 with Placebo and Ty21a. *PLoS Negl Trop Dis* **10**(8):e0004926.
13. **Gilman R, Terminel M, Levine M, Hernandez-Mendoza P, Hornick R** (1975). Relative efficacy of blood, urine, rectal swab, bone-marrow, and rose-spot cultures for recovery of *Salmonella* typhi in typhoid fever. *The Lancet* **305**(7918):1211–3.
14. **Parry CM, Hien TT, Dougan G, White NJ, Farrar JJ** (2002). Typhoid fever. *N Engl J Med* **347**(22):1770–82.