



**Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung
hochpathogener aviärer Influenzavirus-A-Stämme der Subtypen H5 und H7
und davon abgeleiteter Laborstämme
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Influenza-A-Viren verfügen über ein einzelsträngiges, negativ-orientiertes, segmentiertes RNA-Genom. Sie sind der Familie der *Orthomyxoviridae* zugeordnet und werden auf Basis der antigenen Eigenschaften ihrer Glykoproteine Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA) in Subtypen unterteilt. Bislang sind 18 unterschiedliche HA (H1-18) und 11 unterschiedliche NA (N1-11) Subtypen bekannt, die in verschiedenen Kombinationen (Bezeichnung HxNy, z. B. H5N1) auftreten können. Mit Ausnahme der Subtypen H17N10 und H18N11 lassen sich alle Influenza-A-Viren in Vögeln nachweisen, so dass diese Tiere als natürliches Reservoir angesehen werden [1, 2]. In der Regel verlaufen Infektionen bei Vögeln ohne schwerwiegende Symptomatik. Einzelne Virussubtypen können jedoch eine generalisierte Infektion mit hoher Letalität insbesondere bei Nutzgeflügel verursachen. Viren mit diesen Eigenschaften werden als hochpathogene aviäre Influenza-A-Viren (HPAIV) oder als Geflügelpest bezeichnet. Bislang handelte es sich bei HPAIV ausschließlich um Viren der Subtypen H5 oder H7, die an der Spaltstelle des HA multiple basische Aminosäuren aufweisen. Basische Aminosäuren im Spaltbereich ermöglichen die Spaltung des HA-Vorläuferproteins durch ubiquitäre zelluläre Proteasen und erlauben somit die systemische Ausbreitung der Viren im Körper [3, 4]. HPAIV können sich in einem Geflügelbestand rasch ausbreiten und verursachen so große wirtschaftliche Schäden. Die Übertragung findet durch virushaltige Aerosole sowie den direkten Kontakt von mukosalen Membranen mit infektiösen Sekreten statt. Infektionen des Menschen mit hochpathogenen aviären Influenza-A-Viren treten nur sporadisch auf, wobei einige Subtypen, insbesondere einige H5N1-Stämme, schwerwiegende Erkrankung verursachen können.

Die Richtlinie 2005/94/EG des Rates vom 20. Dezember 2005 gibt Empfehlungen zur Bekämpfung der aviären Influenza. In Anhang I Nr. 2 der Richtlinie findet sich zudem eine Definition für den Begriff „hochpathogene aviäre Influenza (HPAI)“:

- a. Viren der aviären Influenza der Subtypen H5 oder H7 mit einer Genomsequenz, wie sie auch bei anderen hochpathogenen Geflügelpestviren festgestellt wird, die für multiple basische Aminosäuren im Spaltbereich des Hämagglutininmoleküls kodiert, d.h. das Hämagglutininmolekül kann von einer ubiquitären Wirtszellprotease gespalten werden oder
- b. Viren der aviären Influenza mit einem intravenösen Pathogenitätsindex von über 1,2 bei 6 Wochen alten Hühnern.

Diese Definition wird auch von der *World Organisation of Animal Health* (OIE) verwendet. Im Gegensatz dazu werden aviäre Viren, die die oben genannten Kriterien nicht erfüllen, als niedrigpathogene Influenza-A-Viren oder als *low pathogenic avian influenza viruses* (LPAIV) bezeichnet. Die Begriffe niedrig- bzw. hochpathogen beziehen sich dabei ausschließlich auf die Pathogenität der Viren im Vogel. So ist z. B. das neuartige aviäre Virus H7N9 trotz seiner hohen Pathogenität für den Menschen eindeutig den niedrigpathogenen aviären Viren zuzu-

ordnen, da es keine erkennbare Erkrankung im Geflügel hervorruft und auch nicht über die HPAIV-typischen multiplen basischen Aminosäuren im Spaltbereich des HA verfügt [5].

Stellungnahme der ZKBS

Für den Umgang mit hochpathogenen aviären Influenza-A-Viren (HPAIV) werden Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3 empfohlen. Die ZKBS bewertet die Kriterien des Anhangs I Nr. 2 der Richtlinie 2005/94/EG als relevant für die Einordnung eines Influenzavirusstammes als HPAIV.

Risikobewertung HPAIV-abgeleiteter Laborstämme

Influenzaviren zeigen eine ausgeprägte genetische Variabilität, die auf einer hohen Mutationsfrequenz und der Fähigkeit zur genetischen Reassortierung beruht. Mutationen des Genoms können bei höheren Passagenzahlen, Wechsel des Wirtsorganismus oder der Zelllinie auftreten und von Änderungen der Pathogenität begleitet werden [6, 7]. Auch Reassortanten können gegenüber ihren Parentalstämmen ein verändertes pathogenes Potenzial aufweisen [8, 9]. Für die hohe Pathogenität aviärer Influenzaviren in Vögeln ist das Vorhandensein multipler basischer Aminosäuren an der Spaltstelle des HA von herausragender Bedeutung. So wurde gezeigt, dass sich die Pathogenität eines HPAIV deutlich reduziert, wenn die basischen Aminosäuren im Spaltbereich deletiert werden und somit eine Spaltstelle entsteht, wie sie für niedrigpathogene aviäre Influenza-A-Viren charakteristisch ist [10]. Allerdings konnte auch demonstriert werden, dass neben der Spaltstelle weitere Faktoren zur hohen Pathogenität von HPAIV beitragen [11]. So konnten in mehreren Studien rekombinante oder reassortante Viren mit multiplen basischen Aminosäuren in der Spaltstelle erzeugt werden, die sich aber nur zu einem Teil als hochpathogen für Hühner erwiesen [8, 12, 13]. Daher ist für die Einordnung eines aviären Influenzavirus als HPAIV sowohl das Vorhandensein von multiplen basischen Aminosäuren an der Spaltstelle des Hämagglutinins als auch die Pathogenität entscheidend. Die Einordnung eines aviären Influenzavirus als LPAIV ist andererseits nicht automatisch gleichbedeutend mit der Einstufung des Virus in die **Risikogruppe 2**. So ist seit Auftauchen des neuartigen aviären Influenza-A-Virus H7N9 ein Virus des Subtyps H7 bekannt, welches den LPAIV zugeordnet wird, jedoch im Menschen eine schwerwiegende Erkrankung verursachen kann und daher der **Risikogruppe 3** zugeordnet wurde [14]. Daher sind aviäre Viren nicht allein bezüglich ihres Gefährdungspotenzials für Geflügel zu bewerten, sondern müssen auch auf ihr Gefährdungspotenzial für den Menschen und ggf. andere Säugetiere überprüft werden. Letzteres gilt insbesondere dann, wenn Laborstämme (siehe Hinweis I) verwendet werden, die sich von einem hochpathogenen aviären Virus ableiten.

Die Bewertung von HPAIV und davon abgeleiteter Laborstämme durch die ZKBS erfolgt daher anhand unten gelisteter Kriterien:

1. Isolate einer generalisierten aviären Influenza oder ungeprüfte HPAIV-Stämme gemäß der Definition des Anhang I Nr. 2 der Richtlinie 2005/94/EG vom 20. Dezember 2005 werden als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i.V.m. den Kriterien im Anhang I GenTSV der **Risikogruppe 3** zugeordnet.
2. Laborstämme (siehe Hinweis I), die sich von den unter Nr. 1 genannten aviären Influenzaviren ableiten, können durch die ZKBS der **Risikogruppe 2** zugeordnet werden, wenn eine geringe Pathogenität für Geflügel gezeigt wurde (erfüllt eines der unter a. - d. gelisteten Kriterien) und das Gefährdungspotenzial für den Menschen höchstens als gering zu bewerten ist (siehe Kriterien e. - f.):
 - a. Es handelt sich um Viren der aviären Influenza mit einem intravenösen Pathogenitätsindex von unter 1,2 bei 6 Wochen alten Hühnern, bei einer Infektionsdosis von 10^6 plaque forming units (pfu).

- b. Es handelt sich um Viren der aviären Influenza mit einem intravenösen Pathogenitätsindex von über 1,2 bei 6 Wochen alten Hühnern, Infektionsdosis 10^6 pfu, bei denen aber keine Übertragung bei 10 experimentell infizierten Hühnern auf 6 Sentinelhühner festgestellt wird. Die infizierten Hühner werden 24 Stunden nach der Infektion den Sentinelhühnern zugeführt. Die Haltung erfolgt bei gemeinsamer Futterquelle und Tränke und maximal 15 m^2 Stallfläche. Nach Auftreten von Krankheitssymptomen der infizierten Tiere werden die Sentineltiere 10 Tage kontrolliert. Gemessen wird die symptomatische Infektion der Sentinelhühner.
- c. Es handelt sich um Viren der aviären Influenza, die nach nasaler oder intratrachealer Infektion von 6 Wochen alten Hühnern, Infektionsdosis 10^6 pfu, keine systemische Infektion zeigen.
- d. Es handelt sich um Viren der aviären Influenza, die nach nasaler oder intratrachealer Infektion von 6 Wochen alten Hühnern, Infektionsdosis 10^6 pfu, eine systemische Infektion hervorrufen, bei denen aber keine Übertragung von 10 experimentell infizierten Hühnern auf 6 Sentinelhühner festgestellt wird. Die infizierten Hühner werden 24 Stunden nach der Infektion den Sentinelhühnern zugeführt. Die Haltung erfolgt bei gemeinsamer Futterquelle und Tränke und maximal 15 m^2 Stallfläche. Nach Auftreten von Krankheitssymptomen der infizierten Tiere werden die Sentineltiere 10 Tage kontrolliert. Gemessen wird die symptomatische Infektion der Sentinelhühner.

Handelt es sich bei einem HPAIV-abgeleiteten Laborstamm um einen Virustyp, welcher nachweislich schwere Erkrankungen beim Menschen verursachen kann oder um ein Virus, welches an ein Säugetier adaptiert wurde, müssen für eine Einstufung in die **Risikogruppe 2** zusätzlich folgende Kriterien erfüllt sein.

- e. Handelt es sich um einen Laborstamm, welcher sich von einem Virustyp ableitet, der bereits nachweislich schwere Erkrankungen im Menschen ausgelöst hat, müssen für den abgeleiteten Laborstamm klare Hinweise auf eine Attenuierung im Menschen erbracht werden. Dies kann durch die Testung in einem geeigneten Säugermodell erfolgen. In Einzelfällen, insbesondere wenn Sequenzdaten eine starke Attenuierung als höchst wahrscheinlich erscheinen lassen (z. B. Deletion des NS1-Gens) kann ggf. auf den Nachweis der Attenuierung im Tiermodell verzichtet werden. Für Laborstämme, die sich von humanpathogenen H5N1-Viren ableiten, wird zusätzlich die Veränderung der HA-kodierenden Sequenz empfohlen (siehe Hinweis II).
- f. Handelt es sich um einen Laborstamm, welcher sich von einem Virustyp ableitet, der bisher nicht mit schweren Erkrankungen im Menschen assoziiert ist, dieser jedoch durch Passagierung an ein Säugetier adaptiert wurde, muss überprüft werden, ob die Adaptation zu einer Erhöhung des Gefährdungspotenzials für den Menschen führt. Für die Beurteilung des Gefährdungspotenzials sind die Pathogenität sowie die Transmissibilität im Säuger ein wichtiges Kriterium, wobei die Unterschiede des verwendeten Tiermodells zur menschlichen Physiologie zu berücksichtigen sind. Weiterhin können Ergebnisse aus relevanten *in-vitro*-Versuchen (z. B. Bindungsaffinitätstest für α -2,6-verknüpfte Sialinsäuren, Sensitivität gegenüber antiviralen zellulären Effektoren) und die Historie des Virus (Ursprung, Passagierung und ggf. bisherige Verwendung) in der Bewertung berücksichtigt werden.

Verwendung von HPAIV-abgeleiteten Laborstämmen

Wurde ein HPAIV-abgeleiteter Laborstamm der **Risikogruppe 2** zugeordnet, werden für den Umgang Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 2 empfohlen. Werden herabgestufte Stämme jedoch als Spenderorganismen für weitere gentechnische Arbeiten verwendet, ist zu berücksichtigen, dass ein abgeleiteter Laborstamm ggf. Virulenzmerkmale eines HPAIV (z. B. ein HA mit multiplen basischen Aminosäuren im Spaltbereich) tragen kann. Daher ist insbeson-

dere bei der Übertragung von Nukleinsäureabschnitten von einem HPAIV-abgeleiteten Laborstamm auf andere Influenza-A-Viren zu überprüfen, ob die zu übertragenden Abschnitte in ihrer Sequenz identisch mit denen des Ursprungs-HPAIV sind. Werden identische Nukleinsäureabschnitte übertragen, ist das Gefährdungspotenzial des ursprünglichen HPAIV in die Risikobewertung miteinzubeziehen. Daher wird empfohlen, dass HPAIV-abgeleitete Laborstämme bei Anmeldung bzw. Anzeige einer gentechnischen Arbeit unter Angabe der Stammbezeichnung aufgeführt werden. Die bloße Nennung des Subtyps ist in diesem Fall für eine Bewertung der gentechnischen Arbeit nicht ausreichend.

Hinweise

- I. Unter einem Laborstamm wird ein Virusstamm verstanden, der durch mehrere Passagen, in Ausnahmefällen auch durch gentechnische Veränderungen, an die Virusvermehrung im Hühnerei, in üblichen Zelllinien oder einem Modellorganismus adaptiert wurde. Unter Adaptation wird nicht der kurzzeitige Wechsel des Wirtsorganismus für ein Experiment verstanden.
- II. Aufgrund der besonderen Bedeutung sowohl für Geflügelbestände als auch für den Menschen, können Laborstämme, die sich von humanpathogenen Viren des Subtyps H5N1 ableiten, nicht der Risikogruppe 2 zugeordnet werden, solange sie ein Wildtyp-identisches HA tragen.
- III. Grundsätzlich wird empfohlen, gentechnische Arbeiten mit Influenzavirus-A-Stämmen der Subtypen H5 oder H7 im Einzelfall durch die ZKBS prüfen zu lassen.

Literatur

1. **Munster VJ and Fouchier RA** (2009). Avian influenza virus: of virus and bird ecology. *Vaccine*. **27**(45):6340-6344.
2. **Wu Y, Wu Y, Tefsen B, Shi Y, Gao GF** (2014). Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*. **22**(4):183-91. doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010.
3. **Bosch FX, Orlich M, Klenk HD, Rott R** (1979). The structure of the hemagglutinin, a determinant for the pathogenicity of influenza viruses. *Virology*. **95**(1):197-207.
4. **Steinhauer DA** (1999). Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology*. **258**(1):1-20.
5. **Gao R et al.** (2013). Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med*. **368**(20):1888-97. doi: 10.1056/NEJMoa1304459.
6. **Scheiblaue H, Kendal AP, Rott R** (1995). Pathogenicity of influenza A/Seal/Mass/1/80 virus mutants for mammalian species. *Arch Virol*. **140**(2): 341-348.
7. **Gabriel G, Dauber B, Wolff T, Planz O, Klenk HD, Stech J** (2005). The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci USA*. **102**(51):18590-5.
8. **Rott R, Orlich M, Scholtissek C** (1979). Correlation of pathogenicity and gene constellation of influenza A viruses. III. Non-pathogenic recombinants derived from highly pathogenic parent strains. *J Gen Virol*. **44**(2): 471-477.
9. **Li C, Hatta M, Nidom CA, Muramoto Y, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y** (2010). Reassortment between avian H5N1 and human H3N2 influenza viruses creates hybrid viruses with substantial virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **107**(10):4687-92. doi: 10.1073/pnas.0912807107.
10. **Horimoto T, Kawaoka Y** (1994). Reverse genetics provides direct evidence for a correlation of hemagglutinin cleavability and virulence of an avian influenza A virus. *J Virol*. **68**(5):3120-8.

11. **Bogs J, Veits J, Gohrbandt S, Hundt J, Stech O, Breithaupt A, Teifke JP, Mettenleiter TC, Stech J** (2010). Highly pathogenic H5N1 influenza viruses carry virulence determinants beyond the polybasic hemagglutinin cleavage site. *PLoS One.* 5(7):e11826. doi: 10.1371/journal.pone.0011826.
12. **Stech O, Veits J, Weber S, Deckers D, Schröder D, Vahlenkamp TW, Breithaupt A, Teifke J, Mettenleiter TC, Stech J** (2009). Acquisition of a polybasic hemagglutinin cleavage site by a low-pathogenic avian influenza virus is not sufficient for immediate transformation into a highly pathogenic strain. *J Virol.* 83(11):5864-8. doi: 10.1128/JVI.02649-08.
13. **Gohrbandt S, Veits J, Hundt J, Bogs J, Breithaupt A, Teifke JP, Weber S, Mettenleiter TC, Stech J** (2011). Amino acids adjacent to the haemagglutinin cleavage site are relevant for virulence of avian influenza viruses of subtype H5. *J Gen Virol.* 92(Pt 1):51-9. doi: 10.1099/vir.0.023887-0.
14. **Stellungnahme der ZKBS** (2013). Aktualisierung der Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung des neuartigen aviären Influenza A-Virus H7N9 als Spender- oder Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTS, Az: 45242.0103. http://www.bvl.bund.de/DE/06_Gentechnik/03_Antragsteller/06_Institutionen_fuer_biologische_Sicherheit/01_ZKBS/01_Allg_Stellungnahmen/09_Viren/zkbs_viren_node.html