



Empfehlung der ZKBS
zur Einstufung von gentechnischen Arbeiten mit
hochpathogenen aviären Influenza A-Viren (HPAIV), die das Potenzial einer
effizienten Luftübertragbarkeit zwischen Säugetieren besitzen

Anlass

Hochpathogene aviäre Influenzaviren (HPAIV) sind Influenza A-Viren der Subtypen H5 und H7, die multiple basische Aminosäuren an der Spaltstelle des Hämagglutinins (HA) besitzen und einen intravenösen Pathogenitätsindex von mindestens 1,2 bei 6 Wochen alten Hühnern aufweisen [1]. HPAIV treten meist bei Geflügelbeständen auf und verursachen dort durch ihre hohe Letalität einen großen wirtschaftlichen Schaden. Seit 1997 kam es jedoch auch zu über 600 laborbestätigten humanen Infektionen mit H5N1 mit einer Letalität von ca. 60 %. Bisherige Ausbrüche von H7N7 beim Menschen waren mit einer deutlich geringeren Letalität assoziiert (ca. 0,2 %) [2]. Humane Infektionen mit HPAIV treten zumeist infolge einer Übertragung des Virus von infiziertem Geflügel auf den Menschen auf. Daneben gibt es auch vereinzelte Fälle, die auf eine Mensch-zu-Mensch-Übertragung zurückgehen; dauerhafte humane Infektionsketten sind jedoch nicht bekannt. HPAIV der Subtypen H5 und H7 sind gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV der **Risikogruppe 3** zugeordnet.

Im September 2011 wurden auf der 4. Tagung der *European Scientific Working Group on Influenza* Experimente vorgestellt, bei welchen ein H5N1-Virus durch gentechnische Modifikationen in Kombination mit serieller Passagierung im Frettchen so verändert wurde, dass es auf dem Luftweg zwischen den Tieren übertragbar war [3]. Das Frettchen wird als bestes Tiermodell für die Vorhersage der Transmissibilität von Influenzaviren beim Menschen angesehen. Die Presse sowie die Fachöffentlichkeit reagierten auf diese Veröffentlichung mit einer breiten Diskussion über Nutzen und Risiko der Experimente. Es wurden Befürchtungen geäußert, dass die gentechnisch veränderten Viren missbräuchlich verwendet werden oder unbeabsichtigt aus dem Labor entweichen könnten. Andererseits wurde angeführt, dass die Experimente essentiell für die Bewertung des pandemischen Potenzials zirkulierender HPAIV sowie zur Entwicklung von Impfstoffen seien. Mit Rücksicht auf die öffentliche Diskussion wurde im Januar 2012 von einer international besetzten Gruppe von Influenzavirologen ein 60tägiges Moratorium zur Aussetzung der Experimente zur Transmission von HPAIV beschlossen [4]. Im Mai bzw. Juni 2012 wurden die der Diskussion zugrundeliegenden experimentellen Daten von den Arbeitsgruppen um Ron Fouchier, Erasmus Medical Center, Rotterdam, und Yoshihiro Kawaoka, University of Wisconsin-Madison, USA, vollständig veröffentlicht [5,6]. Kürzlich wurde nun ein Ende des Moratoriums verbunden mit einer Wiederaufnahme der Arbeiten angekündigt [7]. Damit stellt sich die Frage, wie gentechnische Arbeiten mit HPAIV künftig zu bewerten sind. In den Niederlanden wurden Sicherheitsmaßnahmen entsprechend *biosafety level 3+* (z. B. Verwendung von Mikrobiologischen Sicherheitswerkbänken der Klasse III bzw. Isolatoren der Klasse III zusätzlich zu den Sicherheitsmaßnahmen der Stufe 3) von der *Commission on Genetic Modification* (COGEM) als ausreichend für diese Arbeiten angesehen. In Kanada wurde von der *Public Health Agency of Canada* die Sicherheitsstufe 4 für Arbeiten mit H5N1-Viren, die das Potenzial einer effizienten Mensch-zu-Mensch-Übertragung besitzen, festgelegt.

In Deutschland gibt die ZKBS gemäß § 5 GenTG gegenüber der Bundesregierung oder den zuständigen Behörden der Bundesländer Stellungnahmen zu sicherheitsrelevanten Fragen der

Gentechnik ab, insbesondere zur Sicherheitseinstufung gentechnischer Arbeiten und zu den erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen in gentechnischen Anlagen. Gemäß des in § 7 Abs. 1a GenTG formulierten Vorsorgeprinzips sind dabei gentechnische Arbeiten der höheren Sicherheitsstufe zuzuordnen, wenn Zweifel darüber bestehen, welche Sicherheitsstufe für die vorgeschlagene gentechnische Arbeit angemessen ist. Ferner stuft die ZKBS Mikroorganismen (Wildtyp) gemäß § 5 Abs. 1 GenTSV als Spender- oder Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten in Risikogruppen ein. Gemäß § 5 Abs. 6 GenTSV veröffentlicht das Bundesministerium für Ernährung, Landwirtschaft und Verbraucherschutz regelmäßig nach Anhörung der ZKBS eine Liste mit Legaleinstufungen von Mikroorganismen. Bei den bislang publizierten Studien zu potenziell luftübertragbaren HPAIV handelt es sich um gentechnische Arbeiten [5,6]. Die ZKBS sieht sich durch konkrete Anfragen von Landesbehörden veranlasst, eine Allgemeine Stellungnahme zur Einstufung von HPAIV, die das Potenzial einer effizienten Luftübertragbarkeit zwischen Säugetieren besitzen, abzugeben. Ferner wird eine Risikobewertung der Arbeiten mit Frettchen-adaptierten HPAIV durch die ZKBS von der Gesellschaft für Virologie ausdrücklich befürwortet [8].

Wissenschaftlicher Hintergrund

Ziel der Arbeiten von Ron Fouchier und Yoshihiro Kawaoka war es, aufzuklären, wie groß das evolutionäre Potenzial von HPAIV für eine effiziente aerogene Übertragung ist. Es wurde untersucht, wie viele und welche Mutationen nötig sind, um HPAIV luftübertragbar im Frettchenmodell zu machen. Beide Forschergruppen verfolgten dazu unterschiedliche experimentelle Ansätze.

Die Gruppe um Ron Fouchier führte zunächst mithilfe reverser Genetik zwei Mutationen in das HA eines H5N1-Isolats ein (Q222L/G224S, Nummerierung gemäß Aminosäureposition im maturierten HA), für die ein Zusammenhang mit einem *switch* in der Rezeptorspezifität vom aviären (α 2,3-verknüpfte Sialinsäure) zum humanen Typ (α 2,6-verknüpfte Sialinsäure) bereits bekannt ist [5]. Zusätzlich wurde in der PB2-Untereinheit der viralen Polymerase die ebenfalls bereits bekannte Mutation E627K eingeführt, welche mit einer höheren Replikationseffizienz in Säugetieren assoziiert ist. Erst nach zehnmaliger Passagierung im Frettchen unter selektiven Bedingungen für eine aerogene Übertragung war das so veränderte H5N1 jedoch auf dem Luftweg von Frettchen zu Frettchen übertragbar. Bei den so generierten luftübertragbaren Viren wurden zwei weitere Mutationen im HA festgestellt - H103Y in der Trimerisierungsdomäne und T156A, die zum Verlust einer Glykosylierungsstelle führt. Frettchen, die auf dem Luftweg mit dem rekombinanten H5N1 infiziert wurden, zeigten Lethargie, Appetitsverlust und ein zerzaustes Fell, verstarben jedoch nicht an der Infektion.

In den Experimenten von Yoshihiro Kawaoka wurden zunächst willkürliche Mutationen in den globulären Kopf des HA eines H5N1-Isolats eingeführt und anschließend auf Adsorption an α 2,6-verknüpfte Sialinsäure gescreent [6]. Es wurden zwei Mutationen identifiziert (N220K/Q222L), die einen *switch* in der Rezeptorspezifität vom aviären zum humanen Typ bewirken. Anschließend wurde mithilfe reverser Genetik ein reassortantes Virus mit dem rekombinanten H5N1 HA und den übrigen sieben Genomsegmenten von H1N1v (PB2 enthält zwei Mutationen zur Adaptation an die Replikation in Säugetieren) hergestellt. Durch Passagierung im Frettchen unter selektiven Bedingungen für eine aerogene Übertragung akquirierte das reassortante Virus zwei weitere Mutationen im HA - N154D, die ebenfalls zum Verlust der Glykosylierungsstelle führt und T314I, welche die Stabilität von HA beeinflusst. Das so veränderte Virus wurde zwischen Frettchen effizient auf dem Luftweg übertragen. Die infizierten Frettchen zeigten eine Gewichtsabnahme von < 10 % und Läsionen in der Lunge, verstarben jedoch nicht an der Infektion.

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV werden HPAIV der Subtypen H5 und H7, die ein erhöhtes Potenzial für eine effiziente Luftübertragbarkeit zwischen Säugetieren besitzen, als Spender- und Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten der **Risikogruppe 4** zugeordnet.

Gentechnische Arbeiten, bei denen unter Verwendung von HPAIV (**Risikogruppe 3**) als Spender- oder Empfängerorganismen Viren mit einer effizienten Luftübertragbarkeit zwischen

Säugetieren erzeugt werden, sowie der Umgang mit den so erzeugten Viren sind gemäß § 7 Abs. 1, Abs. 3 Nr.4 und Abs. 4 Nr. 4 GenTSV i. V. m. § 7 Abs. 1a GenTG der **Sicherheitsstufe 4** zuzuordnen. Solche gentechnischen Arbeiten können beispielsweise die gezielte Einführung von Mutationen in das Genom von HPAIV, die zu einer effizienten Luftübertragbarkeit zwischen Säugetieren führen, oder die Einführung eines Teils dieser Mutationen in Kombination mit einer Adaptation der rekombinanten Viren an geeignete Tiermodelle (z. B. Frettchen oder Meerschweinchen) durch serielle Passagierung mit Selektionsdruck auf effiziente Luftübertragbarkeit beinhalten.

Begründung

Die oben beschriebenen Experimente von Ron Fouchier und Yoshihiro Kawaoka zielten darauf ab, ein zwischen Frettchen luftübertragbares HPAIV herzustellen. Das Frettchen ist das beste bislang bekannte Tiermodell für die Vorhersage der Transmissibilität von Influenzaviren beim Menschen. Somit muss vorsorglich davon ausgegangen werden, dass die gentechnisch veränderten Viren effizient auf dem Luftweg von Mensch zu Mensch übertragbar sind. Für HPAIV der Subtypen H5 und H7 gibt es keine präexistierende Immunität, da sie nicht in der Bevölkerung zirkulieren [5]. Ein rekombinantes HPAIV mit dem Potenzial einer effizienten Mensch-zu-Mensch-Übertragung würde somit auf eine immunologisch naive Bevölkerung treffen. Die durchschnittliche Letalität bei humanen H5N1-Infektionen liegt bei ca. 60 %. Auch wenn in den bislang durchgeführten Studien die Luftübertragbarkeit im Frettchenmodell mit einer Abschwächung der Pathogenität assoziiert war [5], kann nicht beurteilt werden, ob (i) dies auch für andere HPAIV zutrifft und (ii) diese Viren auch beim Menschen weniger pathogen wären. Somit ist eine hohe Pathogenität der gentechnisch veränderten Viren für den Menschen nicht auszuschließen. Ob eine Impfung mit einem präpandemischen Impfstoff gegen H5N1 auch einen Immunschutz gegen die rekombinanten Viren verleiht und ob die antiviralen Therapeutika gegen Influenzaviren auch gegen die rekombinanten Viren wirksam sind, ist nicht bekannt. Es wurde zwar gezeigt, dass Seren von Menschen oder Frettchen, die mit einem präpandemischen H5N1-Impfstoff immunisiert worden waren, mit Reassortanten reagierten, bei welchen das HA und ggf. auch PB2 von H5N1 stammte und die oben beschriebenen Mutationen aufwies (darüber hinaus ggf. Einführung einer monobasischen Spaltstelle im HA) und die übrigen Genomsegmente vom Laborstamm A/Puerto Rico/8/34 stammten [5,6]. Zudem waren die rekombinanten HPAIV in ersten *in vitro*-Tests sensitiv gegenüber Oseltamivir [5,6]. Eine Prophylaxe oder Therapie mit medizinisch belegter Wirksamkeit ist jedoch nicht vorhanden.

Hinweis

Auch für Arbeiten mit Wildtyp-HPAIV, die eine effiziente Luftübertragbarkeit zwischen Säugetieren zum Ziel haben, jedoch keine gentechnischen Arbeitsschritte enthalten, erachtet die ZKBS aus den oben genannten wissenschaftlichen Gründen die Einhaltung von Sicherheitsmaßnahmen der Schutzstufe 4 gemäß BioStoffV als notwendig.

Literatur

1. Stellungnahme der ZKBS zur Risikobewertung hochpathogener aviärer Influenzavirus-A-Stämme der Subtypen H5 und H7 und davon abgeleiteter Laborstämme gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV. (Az.: 6790-05-02-34) März 2007
2. Wong, S.S.Y., and Yuen, K. (2006). Avian influenza virus infections in humans. *CHEST* **129**:156-168.
3. Herfst, S., Schrauwen, E.J., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V.J., Linster, M., Sorrell, E.M., Bestebroer, T.M., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D., and Fouchier, R.A. Why is HPAI H5N1 not transmissible via aerosol? An extensive mutational and phenotypic analysis of mutant and reassortant H5N1. *4th ESWI Influenza Conference, Malta 2011*.
4. Fouchier, R.A., García-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W.S., Bouvier, N.M., Brown, I.H., Capua, I., Chen, H., Compans, R.W., Couch, R.B., Cox, N.J., Doherty, P.C., Donis, R.O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mettenleiter, T.C., Osterhaus, A.D., Palese, P., Peiris, J.S., Perez, D.R., Richt, J.A., Schultz-

- Cherry, S., Steel, J., Subbarao, K., Swayne, D.E., Takimoto, T., Tashiro, M., Taubenberger, J.K., Thomas, P.G., Tripp, R.A., Tumpey, T.M., Webby, R.J., and Webster, R.G. (2012). Pause on avian flu transmission research. *Science* **335**:400-401.
5. Herfst, S., Schrauwen, E.J., Linster, M., Chutinimitkul, S., de Wit, E., Munster, V.J., Sorrell, E.M., Bestebroer, T.M., Burke, D.F., Smith, D.J., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D., and Fouchier, R.A. (2012). Airborne transmission of influenza A/H5N1 virus between ferrets. *Science* **336**:1534-1541.
 6. Imai, M., Watanabe, T., Hatta, M., Das, S.C., Ozawa, M., Shinya, K., Zhong, G., Hanson, A., Katsura, H., Watanabe, S., Li, C., Kawakami, E., Yamada, S., Kiso, M., Suzuki, Y., Maher, E.A., Neumann, G., and Kawaoka, Y. (2012). Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature* **486**:420-428.
 7. Fouchier, R.A., García-Sastre, A., Kawaoka, Y., Barclay, W.S., Bouvier, N.M., Brown, I.H., Capua, I., Chen, H., Compans, R.W., Couch, R.B., Cox, N.J., Doherty, P.C., Donis, R.O., Feldmann, H., Guan, Y., Katz, J., Klenk, H.D., Kobinger, G., Liu, J., Liu, X., Lowen, A., Mettenleiter, T.C., Osterhaus, A.D., Palese, P., Peiris, J.S., Perez, D.R., Richt, J.A., Schultz-Cherry, S., Steel, J., Subbarao, K., Swayne, D.E., Takimoto, T., Tashiro, M., Taubenberger, J.K., Thomas, P.G., Tripp, R.A., Tumpey, T.M., Webby, R.J., and Webster, R.G. (2013). Transmission studies resume for avian flu. *Nature* [Epub ahead of print].
 8. Gesellschaft für Virologie (GfV) unterstützt grundsätzlich die Wiederaufnahme der Experimente zur Erforschung der Übertragbarkeit von H5N1-Viren auf dem Luftweg unter strengen Sicherheitsvorkehrungen. <http://www.g-f-v.org/>