



**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung der Influenza-A-Virusstämme
SC35 und SC35M (A/Seal/Massachusetts/1/80)
als Spender- oder Empfängerorganismen
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Die Influenzavirusstämme SC35 und SC35M leiten sich von dem Influenza-A-Virus A/Seal/Massachusetts/1/80 (H7N7) ab, welches während einer Epidemie unter Seehunden aus einem dieser Tiere isoliert wurde. Während der Epidemie, die zwischen Dezember 1979 und Oktober 1980 stattfand, starben über 400 Seehunde an der Küste von Neuengland. Die Tiere wiesen Symptome einer schweren Pneumonie mit nekrotischer Bronchitis bzw. Bronchiolitis und einer hämorrhagischen Alveolitis auf [1]. Das isolierte Influenzavirus verursachte bei experimentell infizierten Seehunden jedoch nur eine leichte Erkrankung des Respirationstraktes, was auf eine Beteiligung weiterer Faktoren an der Epidemie hindeutet [1]. A/Seal/Massachusetts/1/80 weist einen breiten Wirtsbereich auf und konnte im Respirationstrakt von experimentell infizierten Schweinen, Katzen, Meerschweinchen und Frettchen sowie im Gehirn von Mäusen replizieren. Allerdings verursachte das Virus keine schwerwiegende Erkrankung in diesen Tieren [2]. Bei mehreren untersuchten Personen, die nachweislich Kontakt zu infizierten Seehunden hatten, wurden weder respiratorische Erkrankungen beobachtet noch neutralisierende Antikörper gegen das Virus detektiert. Lediglich vereinzelte Fälle von teilweise schweren Konjunktividen wurden berichtet, die allerdings vollständig ausheilten [2]. Es wurde vermutet, dass das Virus aviären Ursprunges ist, jedoch replizierte es nur schlecht in experimentell infizierten Hühnern, Enten und Truthähnen [2].

Durch serielle Passagierung des ursprünglichen Isolates auf Hühnerembryozellen (*chicken embryo cells*, CEC) entstand eine Virusvariante mit der Bezeichnung SC35 [3]. SC35 erwies sich als hochpathogen für Hühner und kann in diesen systemische letale Infektionen auslösen. Die Analyse des Hämagglutinins (HA) ergab u. a. eine Insertion von drei Argininen an der Spaltstelle des HA-Vorläuferproteins. Hierdurch entsteht eine Spaltstelle, die durch eine große Anzahl von zellulären Proteasen gespalten werden kann. Dies ermöglicht die systemische Ausbreitung des Virus im Körper und ist ein Merkmal von hochpathogenen aviären Influenza-A-Viren (HPAIV). Für Mäuse ist die Variante SC35 nach intranasaler Applikation hingegen nur gering pathogen [4]. In Frettchen führte die intranasale Applikation von 10^6 plaque forming units (pfu) von SC35 zu einer respiratorischen Erkrankung mit Fieber, wobei alle infizierten Tiere die Erkrankung überlebten [4].

Durch serielle Passagierung von SC35 in Mäusen entstand ein für Mäuse hochvirulenter Stamm mit der Bezeichnung SC35M. Infektionen der Maus mit SC35M verlaufen schon bei geringen Dosen letal (letale Dosis₅₀: 250 - 700 pfu) [4, 8]. Nach intranasaler Infektion verursacht das Virus dort eine schwere, teilweise hämorrhagische, Pneumonie. Weiterhin ist das Virus in der Lage, sich in der Maus systemisch auszubreiten [5]. Auf molekularer Ebene unterscheiden sich SC35 und SC35M im Wesentlichen durch einige wenige Punktmutationen in den Genen für den trimeren Polymerasekomplex (PB2, PB1 und PA) und für das Nukleoprotein NP [4, 6]. Das Virus verfügt somit weiterhin über ein HA-Gen mit multiplen basischen Aminosäuren im Spaltbereich. Für die hohe Pathogenität in der Maus

scheinen mehrere Mutationen verantwortlich zu sein. Zusammenfassend führen diese zu einer erhöhten Aktivität der viralen Polymerase, was als ursächlich für die hohe Virulenz des Virus in der Maus angesehen wird [5, 6]. Während SC35M- und SC35-Viren sich auf Hühnerembryozellen gleich effizient vermehren, replizieren SC35M-Viren auf Säugerzellen deutlich effizienter [6, 7].

SC35M wurde ursprünglich auch als hochpathogen für Hühner beschrieben. Allerdings konnte dieser Phänotyp nicht mit über reverse Genetik hergestellten SC35M-Viren bestätigt werden [7]. Es wurde vermutet, dass der ursprünglich aus der Passagierung gewonnene SC35M-Stock Quasispezies oder noch Fraktionen von SC35 enthielt.

Untersuchungen zur Pathogenität des Virus für andere Säugetiere sind lediglich für die Ratte bekannt. Hier erwies sich das Virus nach intrazerebraler Applikation als nur wenig pathogen [4]. Weiterhin deuten neueste Untersuchungen daraufhin, dass das Virus eine hohe Sensitivität gegenüber dem antiviral-wirkenden MxA-Protein des Menschen aufweist, welches einen bedeutenden Faktor des angeborenen Immunsystems darstellt. Transgene Mäuse, welche die humanen Proteine MxA und MxB exprimieren, weisen eine deutlich erhöhte Resistenz gegenüber SC35M-Infektionen im Vergleich zu Tieren ohne Mx-Proteine auf [8].

Bewertung

1. Die Variante SC35 wird als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV der **Risikogruppe 3** zugeordnet.

Begründung: Die Variante SC35 verursacht bei Vögeln eine generalisierte Influenza A, daher handelt es sich hierbei um ein hochpathogenes aviäres Influenza-A-Virus (HPAIV). Diese sind der **Risikogruppe 3** zuzuordnen.

2. Die mithilfe reverser Genetik hergestellte rekombinante Variante SC35M wird gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien im Anhang I GenTSV der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Begründung: Die an die Maus adaptierte Variante SC35M leitet sich von dem HPAIV SC35 ab. Mittels reverser Genetik hergestellte SC35M-Viren erwiesen sich jedoch in mehreren Versuchen als nur niedrigpathogen für Hühner. In Mäusen verursacht das Virus eine schwere, systemische Infektion. Es ist jedoch wenig wahrscheinlich, dass das Gefährdungspotenzial für den Menschen über dem eines Organismus der Risikogruppe 2 liegt. Schwerwiegende Infektionen des Menschen mit Viren des Subtyps H7N7 sind äußerst selten. Auch das ursprüngliche Virus A/Seal/Massachusetts/1/80 verursachte bei einigen Personen, die Kontakt zu infizierten Seehunden hatten, lediglich ein Konjunktivitis. Die hohe Pathogenität des Virus für die Maus, welche durch die seriellen Passagierung entstand, scheint ein nicht unübliches Phänomen für dieses Tiermodell zu sein und wurde auch bei anderen, für den Menschen gering pathogene Influenza-A-Viren wie A/Puerto Rico/8/34 (PR8) beschrieben [9]. Weiterhin handelt es sich bei SC35M um einen weit gebräuchlichen Laborstamm, welcher seit mehreren Jahren Verwendung in gentechnischen Laboren findet. Berichte über akzidentelle Infektionen mit Erkrankungen sind nicht bekannt. Darüber hinaus weisen neuere Daten darauf hin, dass das Virus im Vergleich zu human-adaptierten Viren eine höhere Sensitivität gegenüber dem antiviralen MxA-Protein aufweist, welches Teil der menschlichen angeborenen Immunantwort ist. Aus diesen Gründen wird nur von einem geringen Gefährdungspotenzial für den Menschen ausgegangen. Das mittels reverser Genetik hergestellte Virus wird daher der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

3. Die aus der ursprünglichen Passagierung gewonnenen, nicht mittels reverser Genetik hergestellten SC35M-Viren 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.

Begründung: Die Virusvariante SC35M wurde ursprünglich als hochpathogen für Hühner beschrieben. Dieser Phänotyp konnte aber mit mittels reverser Genetik hergestellten SC35M nicht bestätigt werden. Es ist nicht auszuschließen, dass Virusstocks, die direkt aus der Mauspassagierung stammen, noch Fraktionen von SC35 oder von anderen für das Huhn hochpathogenen Quasispezies enthalten. Daher ist das Virus vorsorglich wie SC35 zu bewerten und daher der **Risikogruppe 3** zuzuordnen.

Hinweis

Gentechnische Arbeiten, bei denen SC35M-Viren mit Veränderungen am viralen Genom hergestellt werden, sind durch die ZKBS im Einzelfall zu bewerten.

Literatur

1. **Geraci JR, St Aubin DJ, Barker IK, Webster RG, Hinshaw VS, Bean WJ, Ruhnke HL, Prescott JH, Early G, Baker AS, Madoff S, Schooley RT** (1982). Mass mortality of harbor seals: pneumonia associated with influenza A virus. *Science*. **215**(4536):1129-31.
2. **Webster RG, Hinshaw VS, Bean WJ, Van Wyke KL, Geraci JR, St Aubin DJ, Petursson G** (1981). Characterization of an influenza A virus from seals. *Virology*. **113**(2):712-24.
3. **Li SQ, Orlich M, Rott R** (1990). Generation of seal influenza virus variants pathogenic for chickens, because of hemagglutinin cleavage site changes. *J Virol*. **64**(7):3297-303.
4. **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.
5. **Gabriel G, Klingel K, Planz O, Bier K, Herwig A, Sauter M, Klenk HD** (2009). Spread of infection and lymphocyte depletion in mice depends on polymerase of influenza virus. *Am J Pathol*. **175**(3):1178-86. doi: 10.2353/ajpath.2009.090339. Epub 2009 Aug 21.
6. **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 U S A*. **102**(50):18590-95.
7. **Kochs G, Koerner I, Thiel L, Kothlow S, Kaspers B, Ruggli N, Summerfield A, Pavlovic J, Stech J, Staeheli P** (2007). Properties of H7N7 influenza A virus strain SC35 lacking interferon antagonist NS1 in mice and chickens. *J Gen Virol*. **88**(Pt 5):1403-09.
8. **Deeg C** (2012). Diplomarbeit: Antiviral activity of the human Mx locus in a transgenic mouse model. Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
9. **Bouvier NM, Lowen AC** (2010). Animal Models for Influenza Virus Pathogenesis and Transmission. *Viruses*. **2**(8):1530-1563.