

**Empfehlung der ZKBS zur Risikobewertung
des Influenza-A-Virus
A/bat/Egypt/381 OP/2017 (H9N2)
als Spender- und Empfängerorganismus
gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV**

Allgemeines

Alphainfluenzavirus influenzae (Influenza-A-Viren, FLUAV) des Subtyps H9N2 wurden erstmals 1966 in Nordamerika in Geflügelfarmen aus Truthühnern isoliert [1] und sind weltweit in Geflügelfarmen und bei Wildvögeln verbreitet [2, 3]. Die Viren weisen ein breites Wirtsspektrum auf und infizieren neben Geflügel auch verschiedene Säugetierspezies [4–7]. Der Subtyp H9N2 umfasst eine Vielzahl von Stämmen, welche durch Reassortierung mit anderen zirkulierenden aviären FLUAV entstanden sind [8]. Eine Übertragung der Viren kann über die Luft, Staub, Futter oder Wasser erfolgen [4].

Die Infektion verläuft bei Vögeln in der Regel asymptomatisch. Selten zeigen in Farmen gehaltene, infizierte Tiere eine veränderte Gefiederpflege oder eine erhöhte Salivation [4]. Eine Infektion erhöht jedoch die Wahrscheinlichkeit einer bakteriellen Sekundärinfektion, welche mit einer Letalität von 10 % einhergeht [4].

Für einzelne Stämme des Subtyps H9N2 wurde eine Transmission auf in Farmen gehaltene Schweine und Nerze beobachtet, die unterschiedliche Symptome zeigten. Während eine Infektion von Schweinen mit dem Stamm A/duck/Hong Kong/Y280/1997 mit einem respiratorischen Syndrom assoziiert war [5], ging die Infektion von Nerzen mit dem Stamm Dk/HK/Y280/97 bzw. A/chicken/Hebei/4/2008 mit einer milden Symptomatik, wie Gewichtsverlust und Lethargie, einher [6]. Eine Infektion von Mäusen, z. B. mit dem Stamm A/Chicken/Shandong/244/02 oder A/Chicken/Beijing/243/05, verläuft im Allgemeinen asymptomatisch [9].

Einzelne Stämme des Subtyps H9N2 bzw. deren Derivate (z. B. A/Duck/Hong Kong/Y280/97 und A/Quail/Hong Kong/G1/97) sind zudem in der Lage, Menschen zu infizieren [10, 11]. Hierbei kam es zu einer Anpassung der Viren an α 2,6-verlinkte Sialinsäure-Rezeptoren der oberen Atemwege [10, 11]. Besonders häufig sind davon Personen betroffen, welche engen Kontakt zu Geflügel haben [4]. So konnten in Studien aus China bei 2,3 – 4,6 % der Mitarbeitenden von Geflügelfarmen Antikörper gegen H9 nachgewiesen werden [4]. Eine Übertragung von Mensch zu Mensch kann nicht ausgeschlossen werden [10]. Die Infektion beim Menschen geht jedoch in der Regel mit einer milden grippeähnlichen Symptomatik einher [4].

Gemäß der Empfehlung der ZKBS zur „Risikobewertung von Influenzaviren als Spender- oder Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV“ (Az.: 6790-05-02-29, Aktualisiert November 2015) werden FLUAV des Subtyps H9N2 der **Risikogruppe 2** zugeordnet.

Der Stamm A/bat/Egypt/381 OP/2017 wurde 2017 aus oralen und rektalen Abstrichen des Nilflughunds (*Rousettus aegyptiacus*) isoliert [12]. Die Tiere zeigten keine Krankheitssymptome. Eine phylogenetische Analyse der acht Genomsegmente zeigte, dass der Stamm am nächsten mit aviären FLUAV des Subtyps H9N2 verwandt ist [12]. Untersuchungen zur Seroprävalenz weisen darauf hin, dass aviäre Influenza-A-Viren vom Subtyp H9N2 prinzipiell in der Lage sind, auch andere afrikanische Fruchtfledermausarten zu infizieren [13]. Im Falle von A/bat/Egypt/381 OP/2017 scheint jedoch eine Anpassung an den Nilflughund vorzuliegen, da dieser bislang nicht mit anderen H9N2-Stämmen experimentell infiziert werden konnte [13]. Das isolierte Virus hat eine Affinität zu $\alpha 2,3$ -verlinkten Sialinsäure-Rezeptoren und repliziert in embryonierten Hühnereiern, nicht jedoch in experimentell infizierten Hühnern [12]. Im Gegensatz dazu konnte in frisch geschlüpften Truthühnern, welche oronasal infiziert wurden, eine bis zu elf Tage lang anhaltende Replikation nachgewiesen werden [14]. In weiterführenden Experimenten wurde zudem gezeigt, dass A/bat/Egypt/381 OP/2017 im Gegensatz zu anderen H9N2-Stämmen in der Lage ist, effektiv und anhaltend im Frettchen zu replizieren [14, 15]. Hierfür wurden die Tiere initial mit $10^{4,8}$ *tissue culture infectious dose 50* (TCID₅₀) intranasal infiziert. Ein Nachweis der viralen Genome erfolgte per quantitativer RT-PCR aus Proben von rektalen Abstrichen bzw. Nasenspülungen. Dabei konnten virale Genome bis zu zehn Tage nach Infektion nachgewiesen werden. Die maximale Virusvermehrung mit 10^8 mL⁻¹ viralen Genomen wurde zwei Tagen *p. i.* erreicht. Des Weiteren wies der Stamm eine hohe Transmissionsrate bei Frettchen auf [14]. Bereits innerhalb eines Tages konnten bei allen nicht-infizierten Frettchen, welche durch Kohabitation im selben Käfigsystem in Kontakt mit am Tag zuvor infizierten Tieren kamen, virale Genome nachgewiesen werden. Nach der Transmission wurde, wie bei den infizierten Tieren, eine anhaltende Replikation beobachtet.

Im Gegensatz zu vorangegangenen Infektionsversuchen an Frettchen mit anderen H9N2-Stämmen, welche einen milden Krankheitsverlauf verursachten [16], verloren 13 % der mit A/bat/Egypt/381 OP/2017 infizierten Tiere Gewicht und 93 % der Tiere bekamen hohes Fieber [14]. Keines der infizierten Tiere verstarb jedoch an der Infektion [14]. Das Virus replizierte vorwiegend in den *Conchae nasalis*, virale Genome konnten aber auch in der Trachea, in den *Lobi pulmonalis* und im Kolon nachgewiesen werden.

Außerdem konnten humane *ex vivo*-Lungenkulturen mit dem Stamm A/bat/Egypt/381 OP/2017 infiziert werden [14]. Dabei replizierte der Stamm effizienter als der saisonale humane FLUAV-Stamm A/Panama/2007/1999 (Subtyp H3N2) [14]. Zudem konnte bei, aus humanen Serumproben isolierten, Antikörpern, welche gegen die saisonalen H1N1- und H3N2-Stämme gerichtet sind, keine Kreuzreaktivität für das N2 des A/bat/Egypt/381 OP/2017 nachgewiesen werden [14].

Aviäre Influenza-A-Viren sind durch mehrere Adaptationen in der Lage, sich an die Replikation im Menschen anzupassen und eine Übertragung von Mensch zu Mensch zu ermöglichen [17]. Einer der wesentlichen Schritte zur erfolgreichen Adaptation der FLUAV an den Menschen ist die Evasion des humanen antiviralen *myxovirus resistance protein 1* (MxA), einem Hauptmediator der Interferon-vermittelten Immunabwehr. Die Anpassung wird durch spezifische Mutationen im Nukleoprotein ermöglicht [17]. Im Gegensatz zu den bisher bekannten H9N2-Stämmen ist A/bat/Egypt/381 OP/2017 in der Lage, in Mäusen, welche das humane MxA exprimieren, die antivirale Aktivität von MxA über einen noch unbekanntes Mechanismus zu umgehen [14].

Empfehlung

Nach § 5 Absatz 1 GenTSV i. V. m. den Kriterien in Anlage 1 GenTSV wird *Alphainfluenzavirus influenzae* Stamm A/bat/Egypt/381 OP/2017 als Spender- und Empfängerorganismus für gentechnische Arbeiten vorsorglich der **Risikogruppe 3** zugeordnet.

Begründung

Der FLUAV-Stamm A/bat/Egypt/381 OP/2017 unterscheidet sich in mehreren Aspekten wesentlich von anderen H9N2-Stämmen, die bei Säugetieren aufgetreten sind. Zum einen weist der aus einem Flughund isolierte Stamm eine hohe Transmissibilität (100 %) zwischen Frettchen auf. Zum anderen repliziert der Stamm in explantiertem humanem Lungengewebe effizienter als human-adaptierte Influenza-A-Viren. Daher kann, auch wenn der Stamm eine Affinität für α 2,3-verlinkte Sialinsäure-Rezeptoren aufweist, eine Transmission auf den Menschen und eine Replikation in humanen Geweben nicht ausgeschlossen werden. Darüber hinaus lässt sich aus Infektionsversuchen an Mäusen, welche das humane MxA exprimieren, schließen, dass der Stamm in der Lage ist, die humane Interferon-vermittelte Immunabwehr zu umgehen. Beim Menschen ist zudem keine präexistierende Immunität zu erwarten, so dass, gemäß der Stellungnahme der ZKBS zur „Risikobewertung von Influenzaviren als Spender- oder Empfängerorganismen für gentechnische Arbeiten gemäß § 5 Absatz 1 GenTSV“ (Az.: 6790-05-02-29, Aktualisiert November 2015), ein erhöhtes Pandemierisiko zunächst nicht ausgeschlossen werden kann.

Literatur

1. **Homme PJ, Easterday BC** (1970). Avian influenza virus infections. I. Characteristics of influenza A-turkey-Wisconsin-1966 virus. *Avian Dis* **14**(1):66–74.
2. **Kawaoka Y, Chambers TM, Sladen WL, Webster RG** (1988). Is the gene pool of influenza viruses in shorebirds and gulls different from that in wild ducks?. *Virology* **163**(1):247–50.
3. **Parvin R, Schinkoethe J, Grund C, Ulrich R, Bönte F, Behr KP, Voss M, Samad MA, Hassan KE, Luttermann C, Beer M, Harder T** (2020). Comparison of pathogenicity of subtype H9 avian influenza wild-type viruses from a wide geographic origin expressing mono-, di-, or tri-basic hemagglutinin cleavage sites. *Vet Res* **51**(1):48.
4. **Sun Y, Liu J** (2015). H9N2 influenza virus in China: a cause of concern. *Protein Cell* **6**(1):18–25.
5. **Cong Y-L, Wang C-F, Yan C-M, Peng J-S, Jiang Z-L, Liu J-H** (2008). Swine infection with H9N2 influenza viruses in China in 2004. *Virus Genes* **36**(3):461–9.
6. **Zhang C, Xuan Y, Shan H, Yang H, Wang J, Wang K, Li G, Qiao J** (2015). Avian influenza virus H9N2 infections in farmed minks. *Virology* **12**:180.
7. **Li X, Shi J, Guo J, Deng G, Zhang Q, Wang J, He X, Wang K, Chen J, Li Y, Fan J, Kong H, Gu C, Guan Y, Suzuki Y, Kawaoka Y, Liu L, Jiang Y, Tian G, Li Y, Bu Z, Chen H** (2014). Genetics, receptor binding property, and transmissibility in mammals of naturally isolated H9N2 Avian Influenza viruses. *PLoS Pathog* **10**(11):e1004508.
8. **Dong G, Luo J, Zhang H, Wang C, Duan M, Deliberto TJ, Nolte DL, Ji G, He H** (2011). Phylogenetic diversity and genotypical complexity of H9N2 influenza A viruses revealed by genomic sequence analysis. *PLoS One* **6**(2):e17212.
9. **Lin Z, Xu C, Liu B, Ji Y, Fu Y, Guo J, Zhu Q** (2014). Analysis of the phylogeny of Chinese H9N2 avian influenza viruses and their pathogenicity in mice. *Arch Virol* **159**(10):2575–86.
10. **Butt KM, Smith GJD, Chen H, Zhang LJ, Leung YHC, Xu KM, Lim W, Webster RG, Yuen KY, Peiris JSM, Guan Y** (2005). Human infection with an avian H9N2 influenza A virus in Hong Kong in 2003. *J Clin Microbiol* **43**(11):5760–7.
11. **Tan M, Zeng X, Xie Y, Li X, Liu J, Yang J, Yang L, Wang D** (2023). Reported human infections of H9N2 avian influenza virus in China in 2021. *Front Public Health* **11**:1255969.

12. **Kandeil A, Gomaa MR, Shehata MM, El Taweel AN, Mahmoud SH, Bagato O, Moatasim Y, Kutkat O, Kayed AS, Dawson P, Qiu X, Bahl J, Webby RJ, Karesh WB, Kayali G, Ali MA** (2019). Isolation and Characterization of a Distinct Influenza A Virus from Egyptian Bats. *J Virol* **93**(2).
13. **Halwe NJ, Gorka M, Hoffmann B, Rissmann M, Breithaupt A, Schwemmle M, Beer M, Kandeil A, Ali MA, Kayali G, Hoffmann D, Balkema-Buschmann A** (2021). Egyptian Fruit Bats (*Rousettus aegyptiacus*) Were Resistant to Experimental Inoculation with Avian-Origin Influenza A Virus of Subtype H9N2, But Are Susceptible to Experimental Infection with Bat-Borne H9N2 Virus. *Viruses* **13**(4).
14. **Halwe N, Hamberger L, Sehl-Ewert J, Mache C, Schön J, Ulrich L, Calvelage S, Fuchs J, Bandawane P, Loganathan M, Abbad A, Carreño JM, Simon V, Kayali G, Tönnies M, Kandeil A, El-Shesheny R, Ali M, Wolff T, Budt M, Hippenstiel S, Hocke A, Krammer F, Schwemmle M, Ciminski K, Hoffmann D, Bermudez-Gonzalez M, Beer M** (submitted 2023). The bat-borne influenza A virus H9N2 exhibits a set of unexpected pre-pandemic features. *Research Square preprint*
15. **Wan H, Sorrell EM, Song H, Hossain MJ, Ramirez-Nieto G, Monne I, Stevens J, Cattoli G, Capua I, Chen L-M, Donis RO, Busch J, Paulson JC, Brockwell C, Webby R, Blanco J, Al-Natour MQ, Perez DR** (2008). Replication and transmission of H9N2 influenza viruses in ferrets: evaluation of pandemic potential. *PLoS One* **3**(8):e2923.
16. **Sun X, Belser JA, Maines TR** (2020). Adaptation of H9N2 Influenza Viruses to Mammalian Hosts: A Review of Molecular Markers. *Viruses* **12**(5).
17. **Götz V, Magar L, Dornfeld D, Giese S, Pohlmann A, Höper D, Kong B-W, Jans DA, Beer M, Haller O, Schwemmle M** (2016). Influenza A viruses escape from MxA restriction at the expense of efficient nuclear vRNP import. *Sci Rep* **6**:23138.