

Molekulare Analyse humaner Influenzaviren

Zirkulation von neuen Varianten seit 1995/96

Hintergrund

Die Influenza ist eine in gemäßigten Klimazonen saisonal im Winter auftretende Infektionskrankheit, die je nach Stärke der Krankheitswelle allein in Deutschland in den vergangenen Jahren bis zu 32.000 Todesopfer pro Saison gefordert hat [1]. In Intervallen von etwa 10–40 Jahren kam es zu pandemischen Ausbrüchen, die durch besonders schwere Verläufe gekennzeichnet und weniger saisonal gebunden sind [2].

Influenzaviren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae und werden anhand antigener Unterschiede der im Innern der Viruspartikel befindlichen M- und NP-Proteine in die Typen A, B und C untergliedert. Die Benennung der einzelnen Isolate erfolgt nach dem Schema Typ/Ort/Nummer/Jahr, sofern es sich um ein menschliches Isolat handelt; andernfalls wird das Schema Typ/Spezies/Ort/Nummer/Jahr angewendet. Die jährlich auftretenden Grippeepidemien werden durch die Typen A und B verursacht, während die Influenza-C-Viren den Menschen zwar infizieren, jedoch zu keiner schwerwiegenden Erkrankung führen [2]. Für Influenza-A-Viren gibt es ein großes tierisches Reservoir. Sie werden gemäß den antigenen Eigenschaften ihrer Hämagglutinin- (HA-) und Neuraminidase- (NA-) Oberflächenproteine in Subtypen differenziert, deren Benennung nach dem Schema H(x)N(y) erfolgt. Bei Vögeln wurden 16 HA- sowie 9 NA-Subtypen be-

Tabelle 1

Vorkommen der Virustypen und -subtypen (in Prozent) seit der Saison 1989/90 in Deutschland (modifiziert nach [1])

Saison	Influenza Typ A ^a			Influenza Typ B ^b	
	H1N1	H3N2	H1N2	Yamagata	Victoria
1989/90	–	82	–	18	–
1990/91	15	–	–	85	–
1991/92	31	69	–	–	–
1992/93	–	16	–	84	–
1993/94	–	100	–	–	–
1994/95	2	19	–	79	–
1995/96	42	55	–	3	–
1996/97	6	39	–	55	–
1997/98	7	92	–	1	–
1998/99	–	67	–	33	–
1999/00	1	98,8	–	0,2	–
2000/01	95,2	0,3	–	4,5	–
2001/02	0,1	46,6	0,3	42,4	10,6
2002/03	0,1	85,9	0,1	–	13,9
2003/04	–	99	–	1	–
2004/05	26	54	–	5,4	14,6
2005/06	10	20	–	66,5	3,5
2006/07	13,6	84,9	–	0,8	0,7

^a Prozentualer Anteil der 3 in Deutschland aufgetretenen Subtypen; ^b Prozentualer Anteil der beiden in Deutschland aufgetretenen Viruslinien

schrieben, von denen aber nur wenige andere Spezies wie Mensch, Pferd und Schwein infizieren [3, 4]. Die sogenannte

Spanische Grippe wurde 1918/19 durch ein Virus des Subtyps H₁N₁ verursacht, das bis 1957 zirkulierte. Dieses wurde dann

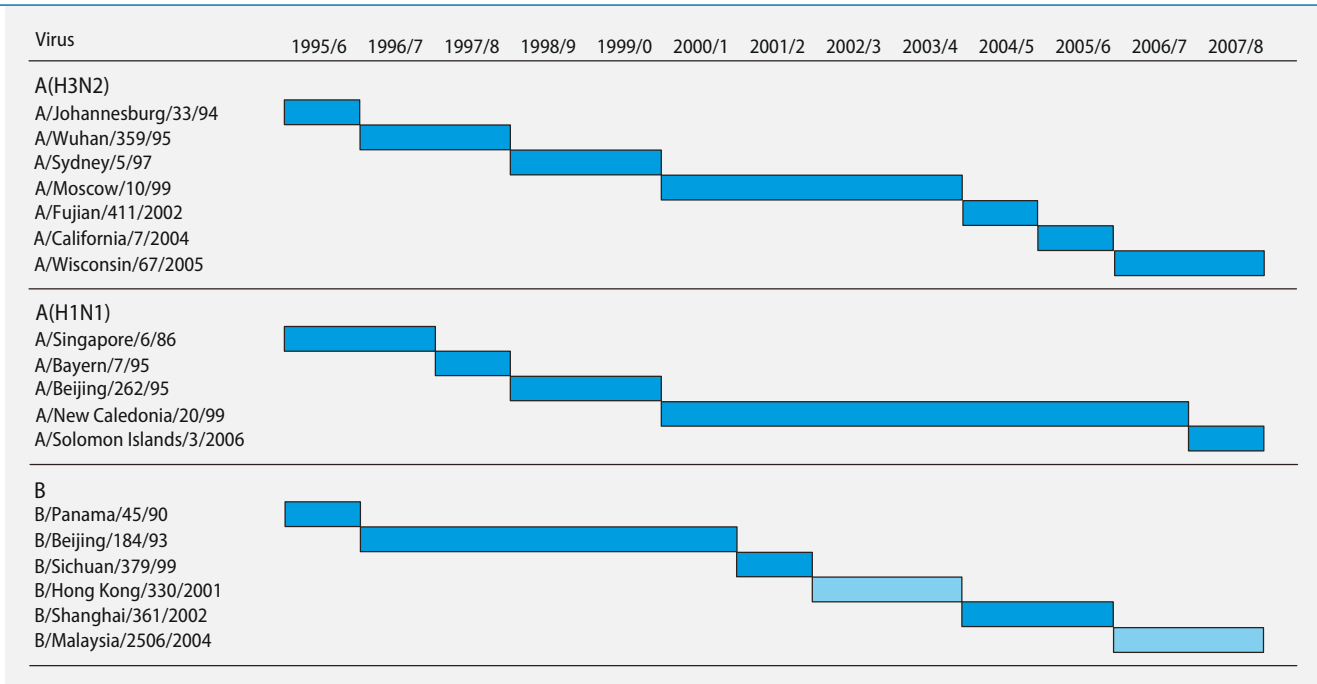


Abb. 1 ▲ Globale Impfstoffempfehlung in den Jahren von 1995–2008 für die Nordhalbkugel durch die WHO (adaptiert nach [5]). Die aufgelisteten Viren wurden als Prototypen für die Herstellung des trivalenten Impfstoffs herangezogen. Bis einschließlich 1998/99 erfolgte die Empfehlung gemeinsam für die Nord- und die Südhalbkugel. Bei den Influenza-B-Viren sind die Prototypen der Victoria-Linie durch hellgraue Balken hervorgehoben.

durch ein Virus des Subtyps H₂N₂ verdrängt (Asiatische Grippe), das 1968 von den noch heute zirkulierenden H₃N₂-Viren abgelöst wurde (Hongkong-Grippe). 1977 war eine Wiederkehr der H₁N₁-Viren zu beobachten, die bis heute gemeinsam mit den Viren des Subtyps H₃N₂ sowie den Influenza-B-Viren kozirkulieren (■ Tabelle 1) [2]. Das Auftreten neuer Subtypen beim Menschen wurde im vergangenen Jahrhundert durch seine Infektion mit einem aviären Virus (1918) bzw. über die Durchmischung der Genome (Reassortment) eines humanen und aviären Virus (1957 und 1968) ausgelöst und führte jeweils zu einer pandemischen Ausbreitung der Viren. Ein Reassortment kann sich ereignen, wenn ein Wirt mit 2 verschiedenen Viren (z. B. 2 unterschiedlichen Subtypen) gleichzeitig infiziert ist und die segmentierten Genome in der Folge neu kombiniert werden. Solche Viren werden als „Reassortanten“ bezeichnet.

Influenza-B-Viren sind weitaus weniger divergent als Influenza-A-Viren und werden daher nicht in Subtypen unterteilt. Seit 20 Jahren ist jedoch eine stabile Kozirkulation zweier Linien zu verzeichnen, die in ihren antigenen Eigenschaften stark differieren. Nach ihren ersten promi-

Tabelle 2

Beispiele für die antigene Charakterisierung von Influenza-A-(H₃N₂-)Impfstämmen im Hämagglutinationshemmtest mit verschiedenen Frettchen-Immunsereen. Die Ergebnisse des Hämagglutinationshemmtests sind als reziproke Titer dargestellt (der Titer ist die höchste Verdünnung, bei der noch eine Reaktion zwischen Virus und Serum nachweisbar ist). Eine Titerdifferenz von mehreren Stufen belegt einen starken Antigendrift. So reagiert z. B. der Stamm A/Sydney/5/97 sehr gut mit dem homologen Immunsereum, allerdings deutlich schlechter mit den Immunsereen gegen frühere Referenzstämme (alle Daten wurden den WHO-Berichten entnommen)

Stamm	Immunsereum		
	A/Wuhan/359/95	A/Nanchang/933/95	A/Sydney/5/97
A/Wuhan/359/95	640	320	40
A/Nanchang/933/95	640	640	80
A/Sydney/5/97	80	160	1280
	A/Panama/2007/99	A/Wyoming/3/2003	A/California/7/2004
A/Panama/2007/99	2560	320	80
A/Wyoming/3/2003	640	5120	2560
A/California/7/2004	80	1280	2560

nenten Vertretern werden sie als Victoria- und Yamagata-Linie bezeichnet [5]. Typ-A- und -B-Influenzaviren unterliegen einem starken Selektionsdruck, der ihre hohe Variabilität begründet (Antigen-

drift). Dieser Antigendrift, der bei Viren des Subtyps A(H₃N₂) besonders ausgeprägt ist, macht eine jährliche Anpassung der Impfstoffkomposition erforderlich (■ Abb. 1).

Bundesgesundheitsbl - Gesundheitsforsch - Gesundheitsschutz 2008 · 51:1050–1060
DOI 10.1007/s00103-008-0634-2
© Springer Medizin Verlag 2008

B. Biere · B. Schweiger

Molekulare Analyse humaner Influenzaviren. Zirkulation von neuen Varianten seit 1995/96

Zusammenfassung

Die Evolution der Influenzaviren wird in zunehmendem Umfang außer mittels klassischer Methoden über molekulare Verfahren verfolgt. Im Vordergrund steht dabei die Analyse der beiden Hüllantigene Hämagglutinin (HA) und Neuraminidase (NA), die das Antigenprofil der Viren bestimmen. Die Influenza-A(H3N2)-Viren weisen eine besonders hohe Variabilität auf, sodass in der Regel mindestens 2 Virusvarianten kozirkulieren. Gemeinsam mit den Influenza-B-Viren verursachten sie etwa 90% der in Deutschland in den vergangenen 12 Saisons aufgetretenen Influenzavirus-Infektionen, während die A-(H1N1)-Viren nur eine untergeordnete Rolle spielten. In den Saisons 2001/02 und 2002/03 traten unerwartet reassortierte

Viren des Subtyps A(H1N2) auf, die aber nur vereinzelt isoliert wurden und keine epidemiologische Bedeutung erlangten. In der Saison 2001/02 wurden zudem nach 10-jähriger Abwesenheit erstmalig wieder Influenza-B-Viren der Victoria-Linie in Deutschland und in anderen Ländern der Nordhalbkugel nachgewiesen. Auch hier kam es zu Reassortment-Ereignissen mit den kozirkulierenden Yamagata-like-Influenza-B-Viren, die sich am Auftreten von Viren mit einem Victoria-like HA und einem Yamagata-like NA zeigten.

Schlüsselwörter

Influenza-A-Virus · Influenza-B-Virus · Evolution · Reassortment

Molecular analyses of human influenza viruses. Circulation of new variants since 1995/96

Abstract

The evolution of influenza viruses is increasingly pursued by molecular analyses that complement classical methods. The analyses focus on the two surface proteins hemagglutinin (HA) and neuraminidase (NA) which determine the viral antigenic profile. Influenza A(H3N2) viruses are exceptionally variable, so that usually at least two virus variants cocirculate at the same time. Together with influenza B viruses they caused approximately 90% of influenza virus infections in Germany during the last 12 seasons, while influenza A(H1N1) viruses only played a subordinate part. Unexpectedly, reassorted viruses of subtype A(H1N2) appeared during the seasons 2001/02 and 2002/03,

but were isolated only rarely and gained no epidemiological significance. Furthermore, during the season 2001/02 influenza B viruses of the Victoria-lineage reappeared in Germany and other countries of the northern hemisphere after 10 years of absence. These viruses reassorted with the cocirculating Yamagata-like influenza B viruses, as could be seen by the appearance of viruses with a Victoria-like HA and a Yamagata-like NA.

Keywords

Influenza A virus · influenza B virus · evolution · reassortment

Die globale Influenzüberwachung erfolgt durch die Weltgesundheitsorganisation (WHO) in Zusammenarbeit mit Nationalen Referenzzentren (NRZ) sowie nationalen Surveillance-Systemen. Ziel ist die schnelle Erfassung und Charakterisierung neu auftretender Driftvarianten und Subtypen und die Beschreibung ihrer antigenen Eigenschaften. In den nationalen Laboren werden die isolierten Viren zunächst (sub-)typisiert und hinsichtlich ihres antigenen Profils charakterisiert (■ **Tabelle 2**). Ein Teil der NRZ führt darüber hinaus auch molekulare Analysen durch, die auf der phylogenetischen Untersuchung der viralen HA- und NA-Sequenzen basieren. Für die internationale Surveillance senden die nationalen Laboren ausgewählte Virusstämme an die WHO, bei der die Viren weitergehend analysiert werden. Weltweit gibt es 4 regionale WHO-Zentren, die mit den NRZ kooperieren. Alle Länder Europas arbeiten eng mit dem „WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Influenza“ (WHO-CC) in London zusammen. Weitere WHO-Regionalzentren befinden sich in Atlanta (USA), Tokio (Japan) und Melbourne (Australien). Die vergleichenden antigenen und genetischen Analysen der weltweit isolierten Influenzaviren zeigen, ob und in welchem Umfang Viren mit veränderten Eigenschaften auftreten. Signifikante Differenzen zu vorherigen Impfstämmen sowie die Anzahl und die Verbreitung dieser Viren sind ausschlaggebend für die Änderung der Impfstoffempfehlung, die zudem seit 1999 für die Nord- und Südhalbkugel getrennt ausgesprochen wird.

In Deutschland wird die Influenza-Surveillance durch das am Robert Koch-Institut (RKI) angesiedelte NRZ für Influenza sowie die Arbeitsgemeinschaft Influenza (AGI) geleistet. 1992 wurde durch die AGI ein Sentinelsystem zur Erfassung akuter Atemwegserkrankungen etabliert [6], das seit einigen Jahren vom RKI koordiniert wird (<http://influenza.rki.de>). Das NRZ arbeitet bundesweit mit Sentinelpraxen zusammen und gewährleistet damit eine flächendeckende virologische Überwachung. Zu den Aufgaben des NRZ zählt nicht nur der rasche Virusnachweis, sondern auch eine umfassende Analyse der zirkulierenden Influenzaviren mit klas-

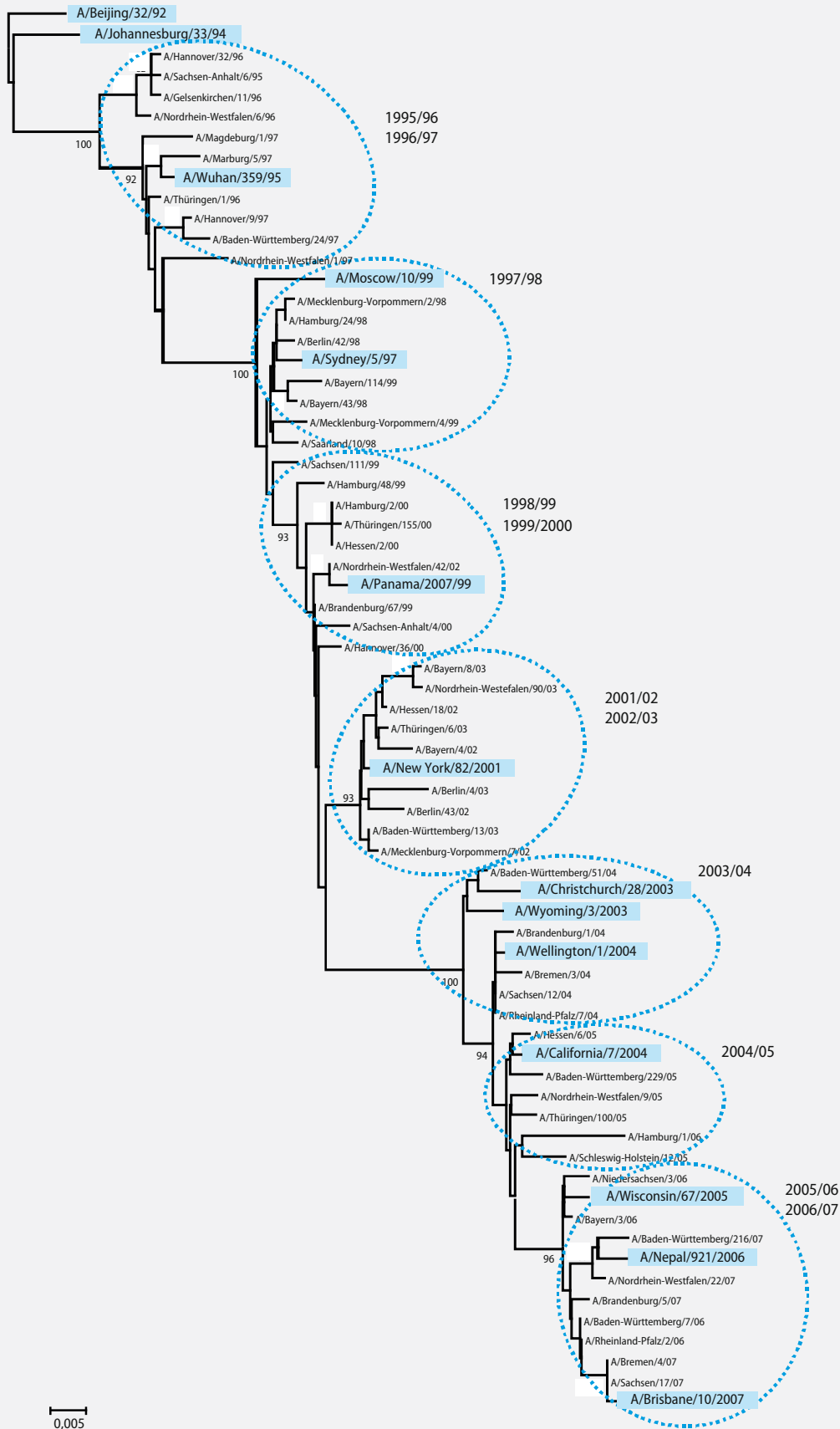


Abb.2 ▲ Phylogenetische Analyse des HA-Gens von H3N2-Viren. Die Sequenzen ausgewählter Viren (5 pro Saison) wurden mit denen der Referenzstämme (grau unterlegt) verglichen (1000 Replikate, HA₁-Region, 837nt).

Tabelle 3

Vergleich der Aminosäuresequenzen im HA-Gen (HA1) verschiedener Influenza-A- (H3N2-)Impf- und Referenzstämme. Aminosäuresubstitutionen sind wie folgt angegeben: G142S bedeutet z. B., dass an Position 142 ein Glycin durch ein Serin ersetzt wurde. Bei der Nummerierung wurde das Signalpeptid am N-Terminus nicht berücksichtigt

Virusstämme	Differenzen in HA1-Sequenz
A/Wuhan/359/95 ↔ A/Sydney/5/97	L3I, K62E, T121N, G124S, D133N, G142S, V144I, K156Q, E158K, V196A, N276K
A/Sydney/5/97 ↔ A/Moscow/10/99	I3L, Y137S, S142R, K160R, I194L
A/Moscow/10/99 ↔ A/Panama/2007/99	P21S, R57Q, L144N, R160K, D172E, H183L, T192I, I226V
A/Panama/2007/99 ↔ A/New York/55/2001	S21P, G49S, A106V, N144D, L183H, S186G, L194I, R229G
A/New York/55/2001 ↔ A/Fujian/411/2002	L25I, R50G, H75Q, E83K, V106A, N126D, A131T, D144N, H155T, Q156H, V202I, W222R, G225D
A/Wyoming/3/2003 ↔ A/Wellington/01/2004	A128T, Y159F, V186G, S189N, Y219S, I226V, S227P
A/Wellington/1/2004 ↔ A/California/07/2004	A138S, K145N, D188N, A196T, V226I
A/California/07/2004 ↔ A/Wisconsin/67/2005	N6I, N122D, Y195H, V223I, D225N
A/Wisconsin/67/2005 ↔ A/Nepal/921/2006	G50E, D122N, T128A, R142G, H156Q, L157S, K173E, G186V, H195Y, I223V

sischen virologischen sowie molekularen Methoden. So werden die antigenen Eigenschaften der Viren mithilfe spezifischer Immunsereen untersucht, die gegen Referenzstämme generiert wurden. Zudem wurden Teilbereiche der HA- (ca. 1000 bp) und NA-Gene (ca. 1400 bp) sequenziert. Im Folgenden werden ausgewählte Ergebnisse der Charakterisierungen vorgestellt. Sie zeigen die Variabilität und Evolution der in den letzten Jahren in Deutschland zirkulierenden Viren.

In Deutschland zirkulierende Influenzaviren

Influenza A (H3N2)

Während der Saison 1995/96 zirkulierten in Deutschland Viren, die dem damaligen Impfstamm A/Johannesburg/33/94 in ihrem Antigenprofil stark ähnelten [7]. In anderen Ländern konnten zu diesem Zeitpunkt hingegen bereits Wuhan/359/95-like-Viren nachgewiesen werden. Eine phylogenetische Analyse zeigt, dass sich die Wuhan-like-H3N2-Viren in der nachfolgenden Saison 1996/97 auch in Deutschland durchsetzten (Abb. 2). Im darauf folgenden Jahr (1997/98) wies die Mehrzahl der molekular charakterisierten Viren Aminosäuresubstitutionen auf, die für den neuen Referenzstamm A/Sydney/5/97 typisch waren (Tabelle 3). Die Stämme A/Wuhan/359/95 und A/Sydney/5/97 unterschieden sich durch 11 Amino-

säuresubstitutionen im HA₁-Protein und waren auch in ihrem Antigenprofil sehr different. Während in der darauf folgenden Saison 1998/1999 die zirkulierenden Viren eine hohe Ähnlichkeit zu den Viren der vorherigen Saison zeigten (Abb. 1), ähnelten die Viren der Saison 1999/2000 jedoch der Driftvariante A/Moscow/10/99, deren charakteristische Aminosäureaustausche auch bereits bei Viren der Saison 1998/99 aufgetreten waren. Von den 5 moscowtypischen Aminosäuresubstitutionen (Tabelle 3) waren 3 bei allen sowie 2 bei einer hohen Zahl der untersuchten Isolate nachweisbar. Die Einbindung des alternativ empfohlenen Impfstammes A/Panama/2007/99 in phylogenetische Analysen ergab, dass die 1999/2000 zirkulierenden H3N2-Viren genetisch eine engere Verwandtschaft zu A/Panama/2007/99 als zu A/Moscow/10/99 aufwiesen (Abb. 2). Die Stämme A/Moscow/10/99 und A/Panama/2007/99 unterschieden sich durch 8 Aminosäuresubstitutionen (Tabelle 3).

Während der Saison 2000/01 wurden in Deutschland keine H3N2-Viren isoliert. H3N2-Viren der Saison 2001/02 reagierten noch sehr gut mit dem Antiserum gegen den Referenzstamm A/Panama/2007/99 [8], waren jedoch genetisch enger verwandt mit dem Stamm A/New York/55/2001 (alternativer Referenzstamm: A/New York/82/2001), der sich durch 8 Aminosäuresubstitutionen von den Panama-like-Viren unterschied (Tabelle 3). Auf-

grund der großen Ähnlichkeit der antigenen Profile der in vielen Ländern zirkulierenden H3N2-Viren mit denen des Panama-Impfstammes wurde dieser im Impfstoff für die Saison 2002/03 belassen (Abb. 1).

Subtyp-H3N2-Viren, die sich im antigenen Profil signifikant von den 2001/02 zirkulierenden Viren unterschieden, wurden erstmals 2002 auf der Südhalbkugel und 2002/03 auch in nördlichen Breitengraden identifiziert. Diese Viren ähnelten sowohl hinsichtlich ihres antigenen als auch ihres genetischen Profils dem Stamm A/Fujian/411/2002. Aufgrund seiner schlechten Replikationseigenschaften wurde jedoch der Stamm A/Wyoming/3/2003 als Impfstamm sowie als Referenzstamm in den virologischen und molekularen Analysen eingesetzt. Die Fujian-like-Viren unterschieden sich durch 13 Aminosäuresubstitutionen vom Stamm A/New York/55/2001 (Tabelle 3). Alle in Deutschland während der Saison 2003/04 isolierten Viren waren hinsichtlich ihrer antigenen Eigenschaften kaum zu unterscheiden und wiesen eine sehr große Ähnlichkeit mit A/Wyoming/3/2003 auf [9]. Die phylogenetische Analyse zeigte hingegen, dass 2 verschiedene Gruppen von H3N2-Viren in Deutschland zirkulierten, die durch die Referenzstämme A/Christchurch/28/2003 und A/Wellington/1/2004 repräsentiert wurden (Abb. 2). Fujian-like-Viren dominierten 2003/04 in allen Ländern und wurden somit von der WHO für die kommende Sai-

son als H₃N₂-Komponente im Impfstoff empfohlen (■ **Abb. 1**).

Die Analyse der in der folgenden Saison 2004/05 auf der Nordhalbkugel – und auch in Deutschland – isolierten H₃N₂-Viren ergab, dass eine Reihe dieser Stämme nur noch eine geringe Verwandtschaft mit dem Wyoming-Impfstamm aufwies und besser mit dem Immenserum gegen den Stamm A/California/7/2004 reagierte. Die molekulare Charakterisierung zeigte, dass diese Viren zwar genetisch noch eng mit den Viren der Saison 2003/04 verwandt waren, aber eine separate Gruppe bildeten, die durch den Stamm A/California/7/2004 repräsentiert wurde. Auch in der Saison 2005/06 reagierte die Mehrzahl der Viren sehr gut mit dem Antiserum gegen A/California/7/2004. Allerdings zeigte die phylogenetische Untersuchung, dass die Viren sich in 2 Gruppen gliederten: Der größere Anteil der Isolate (75 %) wurde durch den Referenzstamm A/Wisconsin/67/2005 repräsentiert, dem sie auch in ihrem Antigenprofil ähnlicher waren als dem Stamm A/California/7/2004. Es wurde daher als H₃N₂-Impfstoffkomponente für die folgende Saison empfohlen. Die kleinere Gruppe (25 %) zeigte eine größere Verwandtschaft zu A/California/7/2004.

Die Saison 2006/07 wurde von Viren des Subtyps H₃N₂ dominiert, die überwiegend gut mit dem Immenserum gegen A/Wisconsin/67/2005 reagierten. Auf molekularer Ebene zeigte sich aber bereits ein eindeutiger genetischer Drift, der sich in der Zirkulation 3 verschiedener Gruppen offenbarte. Etwa die Hälfte der Viren bildete eine Gruppe, die durch den Referenzstamm A/Nepal/921/2006 repräsentiert wurde. Eine zweite Gruppe wird durch den Referenzstamm A/Brisbane/10/2007 vertreten, während für die dritte Gruppe bislang kein internationaler Referenzstamm benannt worden ist. Da die Viren jedoch in ihren antigenen Eigenschaften sehr ähnlich waren, wurde der Stamm A/Wisconsin/67/2005 als Impfstoffkomponente belassen.

Die molekularen Untersuchungen der Jahre 1995–2007 haben gezeigt, dass sich die in einer Saison in Deutschland zirkulierenden Viren jeweils von den Viren der Vorsaison unterschieden. Dabei verläuft die molekulare Evolution von HA- und

NA-Genen unabhängig voneinander. Mutationen traten oft in Antigenomänen auf und wurden von Triplets kodiert, die als „codons under positive selection“ beschrieben wurden [10]. Auch gibt es Hinweise darauf, dass es zu Reassortment-Ereignissen zwischen den zirkulierenden Moscow- und Panama-like-Viren gekommen ist. Ein Reassortment zwischen New York- und Fujian-like-Viren charakterisierte die Viren der Christchurch-Linie, bei denen ein Fujian-like-HA-Gen mit NA und inneren Segmenten von New York-like-Viren beschrieben wurde. Ein Reassortment war weiterhin charakteristisch für die Viren der Saison 2004/05, die ein HA-Gen der California-Linie, aber ein NA der Wellington-Linie aufwiesen [11]. H₃N₂-Reassortanten wurden ebenfalls in Japan, Australien und Kanada nachgewiesen [12, 13, 14].

Die Analysen zeigen weiterhin, dass die H₃N₂-Stämme chronologische Gruppen oder „Cluster“ bilden, die durch die Impf- und Referenzstämme repräsentiert werden. Im Durchschnitt blieben diese einzelnen Cluster ca. 3,3 Jahre dominant [15, 16]. Betrachtet man die vergangenen zehn Jahre, so fallen 2 Saisons auf, in denen sich die zirkulierenden Viren durch ein deutlich verändertes Antigenprofil auszeichneten. Die Sydney- und Fujian-like-Viren in den Jahren 1997/98 bzw. 2003/04 wiesen im Vergleich zu ihren Vorgängerviren eine deutlich erhöhte Zahl an Aminosäuresubstitutionen auf, die 4 der 5 beschriebenen Antigenomänen (A-E) der HA₁-Region betrafen. Bei den übrigen Stämmen mit divergierendem Antigenprofil waren die Aminosäuresubstitutionen vor allem in den Antigenomänen A (Aminosäuren 133, 137, 140–146) und B (Aminosäuren 155–160, 185–197) zu finden [17, 18].

Influenza A (H1N1)

Die Viren des Subtyps H₁N₁ spielten in den letzten Jahren insgesamt eine deutlich kleinere Rolle als die H₃N₂-Viren. Ihr Anteil an der Gesamtzahl der zirkulierenden Influenzaviren war überwiegend gering (■ **Tabelle 1**). Zudem erwiesen sie sich als genetisch stabiler, was den Austausch der Impfstoffkomponente nur alle paar Jahre erforderlich machte (■ **Abb. 1**).

Die A-(H₁N₁-)Viren, die in der Saison 1995/96 zirkulierten, wiesen noch eine gute antigene Übereinstimmung mit dem Impfstamm A/Singapore/6/1986 auf [7]. Während der nächsten beiden Saisons wurden in Deutschland nur vereinzelt H₁N₁-Infektionen nachgewiesen. Untersuchungen der WHO-Labore zeigten, dass die Viren der Saison 1996/97 besser mit dem Immenserum gegen den Stamm A/Bayern/7/95 reagierten als mit dem Serum gegen A/Singapore/6/1986. Daher wurde dieser Stamm nach 7 Jahren als Impfstamm durch A/Bayern/7/95 ersetzt. In der folgenden Saison waren jedoch internationale Tendenzen zur Verdrängung der älteren Varianten erkennbar, sodass die A-(H₁N₁-)Komponente erneut geändert wurde (A/Beijing/262/95). Die Viren der beiden Saisons 1996/97 und 1997/98 waren genetisch noch als Bayern-like-Viren einzuordnen, bildeten aber bereits eine separate Gruppe (■ **Abb. 3**).

Nachdem in der Saison 1998/99 keinerlei A-(H₁N₁-)Zirkulation beobachtet werden konnte, wurden auch in der Saison 1999/2000 nur sehr wenige Viren dieses Subtyps isoliert. Es zeigte sich aber, dass die H₁N₁-Viren nur eine geringe Reaktivität mit dem Immenserum gegen den Stamm A/Beijing/262/95 aufwiesen. Vielmehr hatte sich eine Gruppe von Viren entwickelt, die durch den Stamm A/New Caledonia/20/99 repräsentiert wurde. Dieser Stamm wurde daher als Impfstoffkomponente für die folgende Saison empfohlen.

In den Saisons 2000/01 bis 2003/04 zeigten die A(H₁N₁)-Viren eine gute antigene Übereinstimmung mit A/New Caledonia/20/99. Die Saison 2000/01 wurde von den A-(H₁N₁-)Viren dominiert, während in den darauf folgenden Jahren nur sehr wenige oder gar keine Viren diesem Subtyp angehörten [8, 9, 19, 20]. Erst in der Saison 2004/05 stellten sie wieder einen signifikanten Anteil der isolierten Viren. Auch diese Viren ähnelten in ihrem antigenen Profil dem Stamm A/New Caledonia/20/99. In den Saisons 2005/06 und 2006/07 reagierten die Viren jedoch zunehmend besser mit Antiseren gegen jüngere Referenzstämme, was sich auf genetischer Ebene bereits in der Saison 2004/05 angedeutet hatte. Für den Impfstoff wurde demzufolge für die folgende

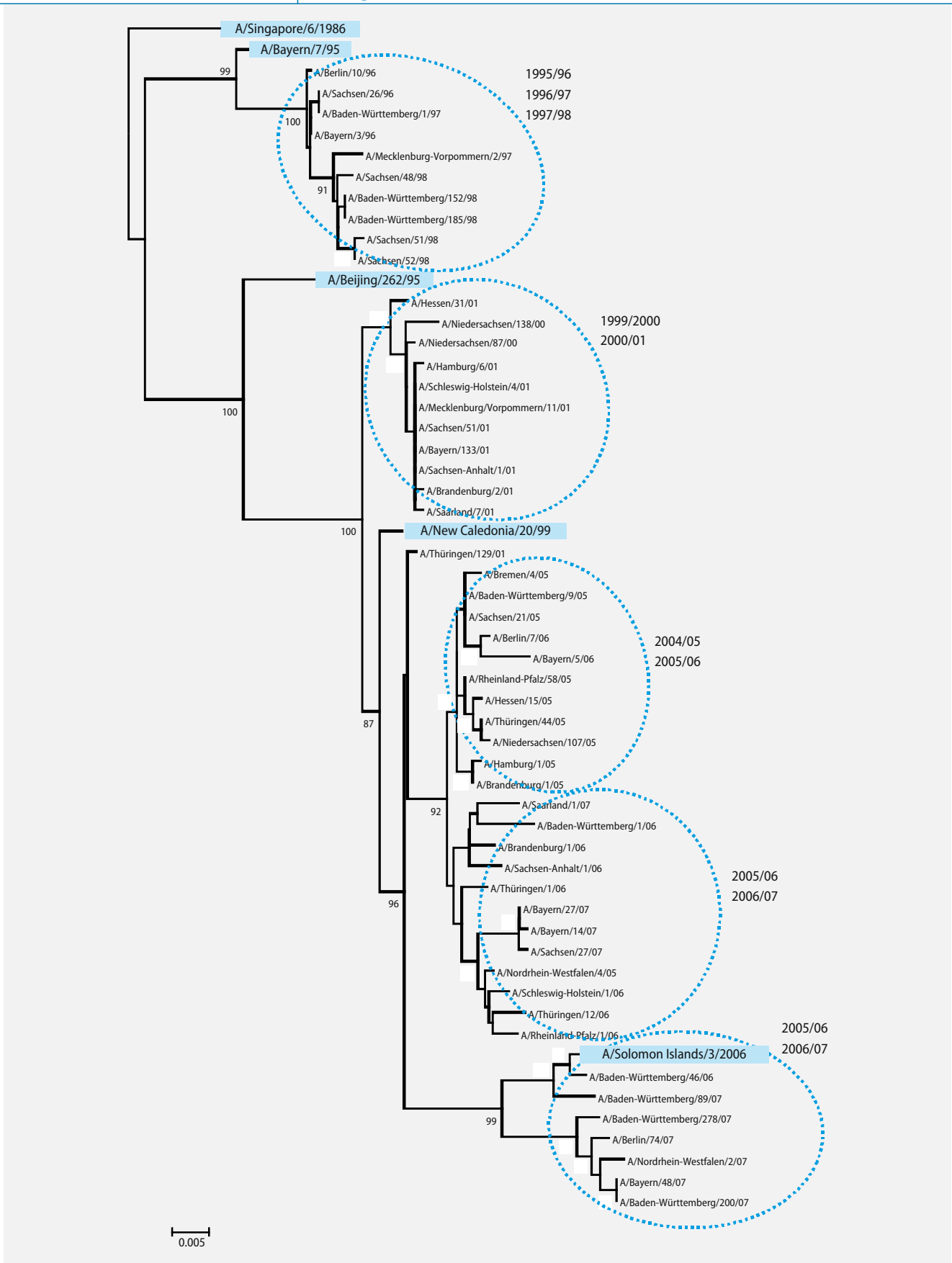


Abb.3 ▲ Phylogenetische Analyse des HA-Gens von H1N1-Viren. Die Sequenzen ausgewählter Viren (5 pro Saison) wurden mit denen der Referenzstämme (grau unterlegt) verglichen (1000 Replikate, HA₁-Region, 909nt)

Saison 2007/08 eine neue A-(H₁N₁-)Impfstoffkomponente (A/Solomon Islands/3/2006) empfohlen.

Influenza A(H1N2)

Während der Saison 2001/02 wurden in Deutschland Viren des Subtyps A(H₁N₂) identifiziert, deren pandemisches Potenzial zunächst unklar war. Das antigene Profil dieser Viren war dem des H₁N₁-Impfstamms A/New Caledonia/20/99 sehr ähnlich, allerdings zeigte sich auf molekularer Ebene erwartungsgemäß ein komplexeres Bild. Das HA-Segment erwies sich als das einzige, das von einem H₁N₁-Virus stammte. Alle übrigen Segmente wiesen die höchste Homologie zu H₃N₂-Varianten der Saison 1999/2000 auf: Das NA- und M-Segment entsprach in der Sequenz einem Panama-like-Virus, während die übrigen Segmente (PA, PB₁, PB₂, NP, NS) eine Moscow-like-Sequenz hatten. So konnten wir zeigen, dass kein Reassortment zwischen einem humanen und einem animalen (z. B. aviären) Virus stattgefunden hatte. Vielmehr handelte es sich um ein Virus rein humanen Ursprungs. Entsprechend war keine pandemische Ausbreitung dieser Viren zu befürchten.

Die Zirkulation von H₁N₂-Viren in den Jahren 2001/02 und 2002/03 war nicht das erste Ereignis dieser Art. Seit der Wiederkehr der H₁N₁-Viren im Jahr 1977 kam es immer wieder zu sporadischen Nachweisen, die jedoch keine epidemiologische Bedeutung erlangten. So zirkulierten zwischen 1978 und 1980 in einigen Ländern Viren dieses Subtyps, die das HA-, NA-, M- und NS-Segment von H₁N₁-Viren sowie das NP-Segment eines H₃N₂-Virus enthielten [21, 22]. Bereits 1988/89 kam es erneut zu einer Zirkulation von H₁N₂-Viren, die jedoch auf China beschränkt blieb. Auch hier stammte lediglich das HA-Segment von einem H₁N₁-Virus, während die übrigen Segmente ein H₃N₂-Virus repräsentierten [23]. Im Jahr 2001/02 zirkulierten die H₁N₂-Viren in 41 Ländern und damit erstmalig global. Dennoch blieben die Nachweise sporadisch, und nur in Ägypten und Israel kam es zu kleineren Ausbrüchen. Die größte Prävalenz wurde in Großbritannien festgestellt. Die für Deutschland beschriebene Her-

kunft der 8 Segmente von aktuellen Virusvarianten wurde auch weltweit beschrieben [24, 25]. Vermutlich wurde die Entstehung dieser Reassortante durch die hohe H₁N₁-Aktivität sowie durch Aminosäuresubstitutionen im HA-Gen begünstigt [24]. H₁N₂-Viren wurden in den vergangenen Jahren weltweit nur sporadisch und in Deutschland nicht mehr nachgewiesen.

Influenza B

Influenza-B-Viren, die während der Saison 1996/97 zirkulierten, repräsentierten alle auf das Isolat B/Yamagata/16/88 zurückgehende Yamagata-Linie. Die Viren waren hinsichtlich ihrer antigenen Eigenschaften dem für diese Saison empfohlenen Impfstamm B/Harbin/7/94 sehr ähnlich, zeigten jedoch in den molekularen Analysen 9 Aminosäureaustausche. Sie erwiesen sich später als charakteristisch für den Impfstamm B/Yamanashi/166/98, der aber erst für die Saison 1999/2000 empfohlen wurde. In der Saison 1997/98 spielten Influenza-B-Viren keine Rolle, sondern wurden erst 1998/99 wieder in größerer Zahl isoliert. Diese Viren ließen sich anhand der molekularen Daten in 2 Gruppen unterteilen: Nur etwa 20 % der Viren waren eng mit B/Yamanashi/166/98 verwandt, während der größere Teil einen eindeutigen genetischen Drift zeigte (■ **Abb. 4**). 1999/2000 spielten Influenza-B-Viren erneut keine Rolle, sondern ließen sich erst 2000/01 wieder in größerer Zahl nachweisen. Alle Isolate entsprachen der Driftvariante aus 1998/99 und wurden nun durch den Stamm B/Sichuan/379/99 repräsentiert, der daher als Impfstoffkomponente für die Saison 2001/02 empfohlen wurde.

In der folgenden Saison 2001/02 tauchten zum ersten Mal seit vielen Jahren wieder Vertreter der zweiten Influenza-B-Linie auf, die auf den Stamm B/Victoria/2/87 zurückgeht (Victoria-Linie) und deren Zirkulation in den Jahren zuvor auf die Südhalbkugel beschränkt geblieben war. Sie nahmen einen Anteil von etwa 20 % der isolierten B-Viren ein und ließen sich in 2 genetisch divergente Gruppen untergliedern: Gruppe A umfasste mit etwa 81 % B/Shandong/7/97-like-Viren, Gruppe B wurde durch den Stamm B/Hong

Kong/330/2001 repräsentiert. Die in dieser Saison identifizierten Viren der Yamagata-Linie waren ebenfalls genetisch divergent und in 2 Gruppen einzuordnen. Etwa 30 % der Isolate hatten ein HA-Gen, das eng mit dem des früheren Impfstamms B/Harbin/7/94 verwandt war, während der größere Teil der Viren die höchste Verwandtschaft zum aktuellen Impfstamm B/Sichuan/379/99 zeigte.

Victoria-like-Viren setzten sich in der folgenden Saison 2002/03 durch und verdrängten die Yamagata-like-Viren vollständig. Die isolierten Viren waren enger mit B/Shandong/7/97 als mit dem Impfstamm B/Hong Kong/330/2001 verwandt. In der Saison 2003/04 spielten Influenza-B-Viren wiederum nur eine untergeordnete Rolle, und auch in der Saison 2004/05 gehörten nur 20 % der isolierten Viren diesem Virustyp an. Die Mehrzahl dieser B-Viren waren erneut Vertreter der Victoria-Linie. Sie gehörten der B/Shandong/7/97-Gruppe an, wiesen jedoch schon einen genetischen Drift im Vergleich zu den Victoria-like-Viren von 2002/03 auf. Die Yamagata-like-Viren von 2004/05 repräsentierten ausnahmslos die Harbin-Sublinie. Das Verhältnis zwischen Victoria- zu Yamagata-like-Viren von 73 % vs. 27 % wurde außerhalb Deutschlands nur in wenigen Ländern beobachtet. In den meisten Ländern der Nordhalbkugel war das Verhältnis umgekehrt, sodass für die folgende Saison 2005/06 erneut ein Vertreter der Yamagata-Linie als Impfstoffkomponente empfohlen wurde.

Die Saison 2005/06 war durch eine Zirkulation von Influenza-B-Viren geprägt (■ **Tabelle 1**). Die Viren gehörten überwiegend zur Victoria-Linie und zeigten einen deutlichen genetischen Drift im Vergleich zu den Viren des Vorjahres. Die aktuellen B-Stämme bildeten eine separate Gruppe, deren HA-Gen die engste Verwandtschaft mit dem des Stammes B/Malaysia/2506/2004 aufwies. Da die Vorherrschaft von Victoria-like-Viren im Vergleich zu den Yamagata-like-Viren diesmal nicht nur in Deutschland, sondern auch in anderen europäischen Ländern beobachtet wurde, wurde der Stamm B/Malaysia/2506/2004 als neue Impfstoffkomponente empfohlen.

In der Saison 2006/07 wurden erneut nur sehr wenige Influenza-B-Viren iso-

Originalien und Übersichtsarbeiten

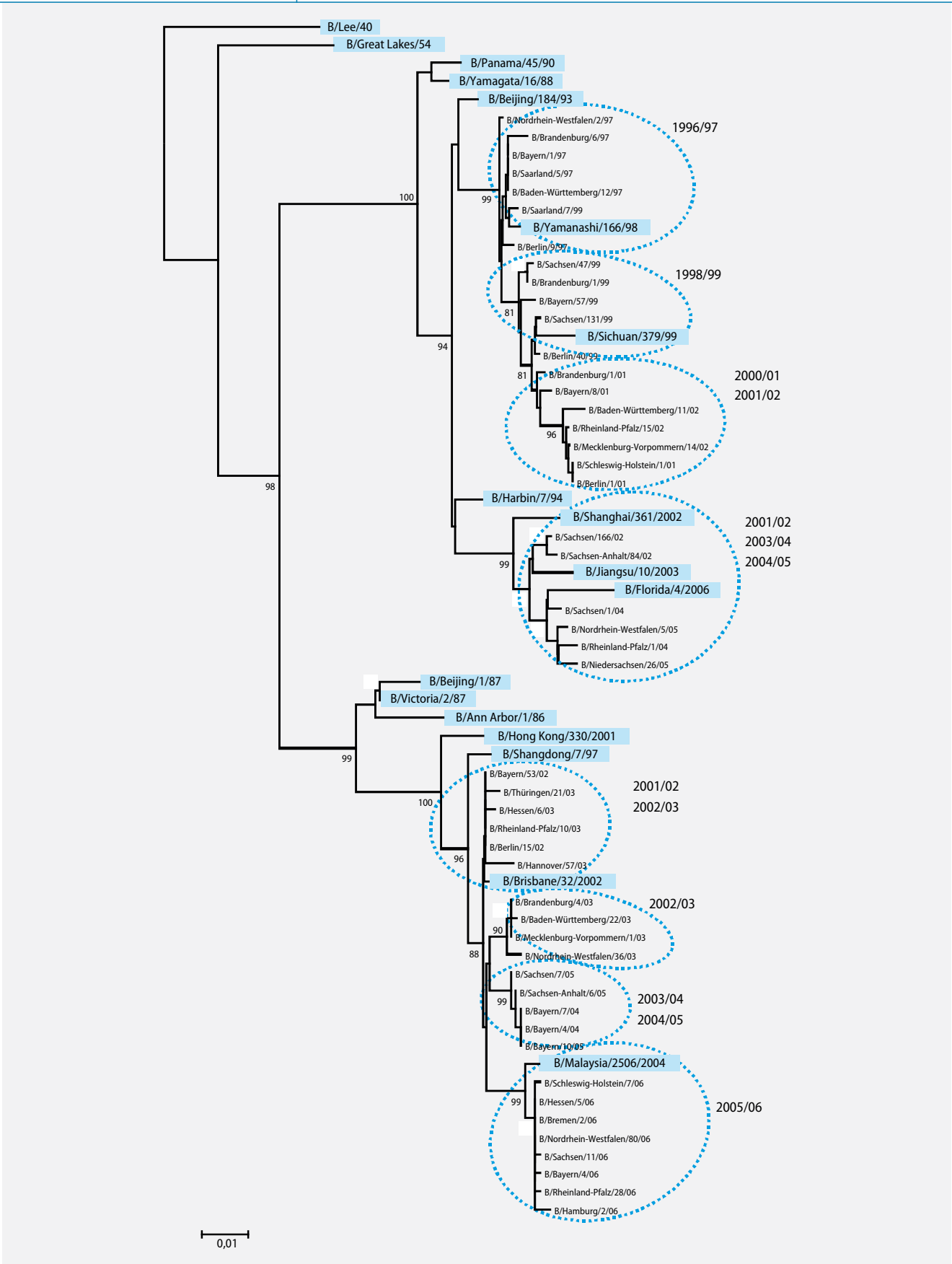


Abb.4 ▲ Phylogenetische Analyse des HA-Gens von Influenza-B-Viren. Die Sequenzen ausgewählter Viren (5 pro Saison) wurden mit denen der Referenzstämmen (grau unterlegt) verglichen (1000 Replikate, HA₁-Region, 990nt)

liert, bei denen Yamagata- und Victoria-like-Vertreter in einem ausgewogenen Verhältnis zueinander standen. Die Viren beider Linien reagierten gut mit den Immunseren gegen die jeweiligen Referenzstämme B/Jiangsu/10/2003 und B/Malaysia/2506/2004. Europaweit dominierten wiederum die Viren der Victoria-Linie, sodass die Impfstoffzusammensetzung bezüglich der B-Komponente nicht geändert wurde.

Im Verlauf der Evolution der Influenza-B-Viren etablierten sich vor knapp 30 Jahren die Victoria- und Yamagata-Linie [26, 27]. Zur Entstehung dieser beiden Linien hat eine Reihe von Insertions- und Deletionsereignissen beigetragen, die vor allem den Bereich der Aminosäureregion 159–168 des HA-Gens betreffen. Deletionen an den Positionen 162 und 164 sind charakteristisch für Vertreter der Yamagata-Linie der frühen 1990er-Jahre, während jüngere Yamagata-like-Viren nur noch eine Deletion an Position 162 aufweisen [28]. Insertionen haben zum Entstehen der Victoria-Linie geführt. Die Evolution der in den letzten Jahren zirkulierenden Influenza-B-Viren war auch durch Reassortment-Ereignisse geprägt, welche durch die Intensivierung der Zirkulation von Viren der Victoria-Linie begünstigt wurden. Schon früher wurde das Auftreten von Reassortanten beschrieben [29, 30], und auch in Deutschland konnte der Austausch von Oberflächenengenen festgestellt werden. In den Saisons 2001/02 sowie 2002/03 trat mehrheitlich bzw. ausschließlich ein reassortiertes B-Virus auf, das neben einem Victoria-like-HA- ein Yamagata-like-NA-Gen trug. Auch innerhalb der beiden B-Viruslinien wurde bereits ein Reassortment nachgewiesen [31].

Schlussfolgerungen

Die Charakterisierung der HA- und NA-Gene der in den letzten 12 Jahren in Deutschland isolierten Influenzaviren hat gezeigt, dass neben der Kozirkulation von Influenzavirustypen und -Subtypen auch eine Kozirkulation verschiedener Virusvarianten nachweisbar war, die maßgeblich zur genetischen Variabilität beitragen. Es waren bei den Oberflächenprotein kodierenden Genen nicht nur ein kontinu-

ierlicher Drift und eine Akkumulation nichtsynonymer Mutationen, sondern auch eine Reihe von Reassortment-Ereignissen zu beobachten. Die international erhobenen Daten unterstreichen, dass das Reassortment eine größere Rolle bei der Entstehung epidemiologisch relevanter Viren spielt als bisher angenommen. Detaillierte Untersuchungen zu den Selektionsmechanismen stehen allerdings noch aus. Es wird vermutet, dass der Selektionsvorteil auf die Veränderung der antigenen Eigenschaften zurückzuführen ist, aber auch funktionelle Mechanismen zwischen HA und NA, die einen selektiven Wachstumsvorteil mit sich bringen, werden diskutiert [29].

Obwohl die molekularen Analysen einen sehr wichtigen Beitrag zur Charakterisierung der zirkulierenden Influenzaviren leisten, bleibt zu betonen, dass genetische Daten für eine Interpretation des Antigenprofils allein nicht ausreichen. Dies gilt selbst dann, wenn Aminosäureaustausche in Antigenomänen identifiziert werden. Art und Lokalisation der Substitution sowie die Interaktion mehrerer Aminosäuresubstitutionen haben einen großen Einfluss auf das antigene Profil [15], das folglich weiterhin separat untersucht werden muss. Phylogenetische Analysen der HA- und NA-Gene sind somit wichtig, um die Evolution der Oberflächenantigene zu verfolgen und eine objektive Beurteilung im Hinblick auf die jährliche Impfstoffempfehlung zu ermöglichen. Die molekulare Analyse aller 8 viralen Gene wird jedoch zukünftig eine größere Bedeutung erlangen und dazu beitragen, die Evolution der Influenzaviren besser zu verstehen.

Korrespondierende Autorin

Dr. Brunhilde Schweiger

Nationales Referenzzentrum für Influenza
FG 12 Virale Infektionen
Robert Koch-Institut
Nordufer 20
13353 Berlin, BRD
E-Mail: schweigerb@rki.de

Literatur

1. Arbeitsgemeinschaft Influenza (2007) Abschlussbericht der Influenzasaison 2006/07. Eigenverlag, Berlin
2. Hampson AW, Mackenzie JS (2006) The influenza viruses. *Med J Aust* 185(10 Suppl):S39–43
3. Wright PF, et al. (2007) Urinomyxovirus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Virology*, 3rd edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 1691–1740
4. Modrow S, Falke D, Truyen U (2002) *Molekulare Virologie*, 2. Ausgabe. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin
5. Hay AJ, et al. (2001) The evolution of human influenza viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1416):1861–1870
6. Szecsenyi J, et al. (1995) Influenza surveillance: experiences from establishing a sentinel surveillance system in Germany. *J Epidemiol Community Health* 49(Suppl 1):9–13
7. Arbeitsgemeinschaft Influenza (1996) Abschlussbericht der Influenzasaison 1995/96. Berlin
8. Arbeitsgemeinschaft Influenza (2002) Abschlussbericht der Influenzasaison 2001/02. Berlin
9. Arbeitsgemeinschaft Influenza (2004) Abschlussbericht der Influenzasaison 2003/04. Berlin
10. Bush RM, et al. (1999) Positive selection on the H3 hemagglutinin gene of human influenza virus A. *Mol Biol Evol* 16(11):1457–1465
11. Schweiger B, Bruns L, Meixenberger K (2006) Reassortment between human A(H3N2) viruses is an important evolutionary mechanism. *Vaccine* 24(44–46):6683–6690 (Epub 2006 Jun 16)
12. Lindstrom SE, et al. (1998) Phylogenetic analysis of the entire genome of influenza A (H3N2) viruses from Japan: evidence for genetic reassortment of the six internal genes. *J Virol* 72(10):8021–8031
13. Abed Y, et al. (2002) Divergent evolution of hemagglutinin and neuraminidase genes in recent influenza A:H3N2 viruses isolated in Canada. *J Med Virol* 67(4):589–595
14. Barr IG, et al. (2005) An influenza A(H3) reassortant was epidemic in Australia and New Zealand in 2003. *J Med Virol* 76(3):391–397
15. Smith DJ, et al. (2004) Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science* 305(5682):371–376 (Epub 2004 Jun 24)
16. Plotkin JB, Dushoff J, Levin SA (2002) Hemagglutinin sequence clusters and the antigenic evolution of influenza A virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(9):6263–6268 (Epub 2002 Apr 23)
17. Lindstrom S, et al. (1996) Evolutionary characterization of recent human H3N2 influenza A isolates from Japan and China: novel changes in the receptor binding domain. *Arch Virol* 141(7):1349–1355
18. Wiley DC, Wilson IA, Skehel JJ (1981) Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation. *Nature* 289(5796):373–378
19. Arbeitsgemeinschaft Influenza (2001) Abschlussbericht der Influenzasaison 2000/01. Berlin
20. Arbeitsgemeinschaft Influenza (2003) Abschlussbericht der Influenzasaison 2002/03. Berlin
21. Nakajima S, Cox NJ, Kendal AP (1981) Antigenic and genotypic analyses of influenza A(H1N1) viruses from different regions of the world, February 1978 to March 1980. *Infect Immun* 32(1):287–294

22. Young JF, Palese P (1979) Evolution of human influenza A viruses in nature: recombination contributes to genetic variation of H1N1 strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 76(12):6547–6551
23. Guo YJ, Xu XY, Cox NJ (1992) Human influenza A (H1N2) viruses isolated from China. *J Gen Virol* 73(Pt 2):383–387
24. Gregory V, et al. (2002) Emergence of influenza A H1N2 reassortant viruses in the human population during 2001. *Virology* 300(1):1–7
25. Xu X, et al. (2002) Intercontinental circulation of human influenza A(H1N2) reassortant viruses during the 2001–2002 influenza season. *J Infect Dis* 186(10):1490–1493 (Epub 2002 Oct 22)
26. Kanegae Y, et al. (1990) Evolutionary pattern of the hemagglutinin gene of influenza B viruses isolated in Japan: cocirculating lineages in the same epidemic season. *J Virol* 64(6):2860–2865
27. Rota PA, et al. (1990) Cocirculation of two distinct evolutionary lineages of influenza type B virus since 1983. *Virology* 175(1):59–68
28. Nerome R, et al. (1998) Evolutionary characteristics of influenza B virus since its first isolation in 1940: dynamic circulation of deletion and insertion mechanism. *Arch Virol* 143(8):1569–1583
29. McCullers JA, et al. (1999) Reassortment and insertion-deletion are strategies for the evolution of influenza B viruses in nature. *J Virol* 73(9):7343–7348
30. Lindstrom SE, et al. (1999) Comparative analysis of evolutionary mechanisms of the hemagglutinin and three internal protein genes of influenza B virus: multiple cocirculating lineages and frequent reassortment of the NP, M, and NS genes. *J Virol* 73(5):4413–4426
31. Matsuzaki Y, et al. (2004) Genetic diversity of influenza B virus: the frequent reassortment and cocirculation of the genetically distinct reassortant viruses in a community. *J Med Virol* 74(1):132–140

Schwerbehinderte erforschen die durch Zecken übertragene FSME: Integrationsabteilung im Robert Koch-Institut eingerichtet

Das RKI engagiert sich seit Jahren für einen besseren Zugang von schwerbehinderten Arbeitnehmern in Forschung und Wissenschaft. Seit kurzem gibt es im Institut eine Forschergruppe aus Schwerbehinderten, die sich mit der durch Zecken übertragenen Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) befasst und eine der ersten so genannten Integrationsabteilungen in Berlin ist. „Schwerbehinderte Menschen sind im Berufsleben überaus engagiert, kompetent und kreativ“, betont Jörg Hacker, Präsident des RKI. Die Arbeit der schwerbehinderten Wissenschaftler wurde im RKI in einem Vortrag bei der Langen Nacht der Wissenschaften am 14.6.2008 gemeinsam mit dem Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales – Integrationsamt vorgestellt.

Ziel des Integrationsprojektes (nach § 132 Absatz 1, Sozialgesetzbuch IX) ist die Weiterqualifikation der Schwerbehinderten, um ihre Chancen auf dem Arbeitsmarkt zu verbessern. Finanziert werden die Arbeitsplätze für zwei Jahre aus dem vom Bundesministerium für Arbeit und Soziales initiierten Programm „Job 4000“, aus Mitteln der so genannten Ausgleichsabgabe (§ 134 Sozialgesetzbuch IX) und vom RKI.

Die neue FSME-Gruppe besteht aus einem promovierten Wissenschaftler, zwei Wissenschaftlern, die ihre Promotionsarbeit anfertigen, sowie einer Biologielaborantin und ist am nationalen Konsiliarlabor für FSME angesiedelt. Die vor allem in Süddeutschland vorkommende FSME ist eine Hirnhaut- oder Gehirnentzündung. Sie wird von Viren verursacht, die durch Zecken übertragen werden. Die behinderten Wissenschaftler werden die labordiagnostischen Verfahren weiterentwickeln und Zecken sowie Haus- und Wildtiere nach Spuren von FSME-Viren untersuchen. Dies soll vor allem in Gebieten geschehen, in denen es einzelne FSME-Fälle gab, die aber noch nicht als Risikogebiete eingestuft wurden. „Damit könnte sich das Infektionsrisiko besser beurteilen lassen“, erwartet Matthias Niedrig, Leiter des FSME-Konsiliarlabors.

Von 2005 bis 2007 beteiligte sich das RKI an dem vom Paul-Ehrlich-Institut (PEI) koordinierten

Projektverbund „Vieles ist möglich – Tandempartner in der Wissenschaft“. Beim klassischen Tandem-Modell bilden schwerbehinderte Wissenschaftler mit nicht behinderten Forschern oder technischen Assistenten ein sich ergänzendes Team. Das Tandemprojekt wurde im Rahmen der EU-Gemeinschaftsinitiative EQUAL gefördert.

Im Rahmen des EQUAL-Projektes sind auch zwei Filmprodukte entstanden: ein Kinospot und ein halbstündiger Filmbeitrag. Der Spot macht in lebendiger und anschaulicher Weise auf Vorurteile und Vorbehalte aufmerksam. Er war von Ende 2007/Anfang 2008 unter dem Motto „Kluge Köpfe ...“ in vielen Kinos zu sehen. Der längere Filmbeitrag macht mit praktischen Beispielen und authentischen Erfahrungen deutlich, welche Möglichkeiten und Chancen in der Beschäftigung von Menschen mit Behinderungen im Wissenschafts- und Forschungsbereich liegen. Während der Kinospot von Schauspielern gespielt wurde, ist der Filmbeitrag von dokumentarischem Charakter. Zu sehen sind unter anderem Reinhard Kurth, der sich als ehemaliger RKI- und PEI-Präsident für die Etablierung des Tandem-Projekts eingesetzt hatte, sowie zwei Mitarbeiter des RKI-Fachgebiets Angewandte Infektions- und Krankenhaushygiene. Die Filme sind auf DVD verfügbar und kostenlos beim PEI erhältlich (www.pei.de).

Quelle: Robert Koch-Institut (Berlin)
www.rki.de