

Antivirale Therapie und Resistenz von Influenzaviren

Die Influenza-typische Symptomatik (*influenza-like illness*, kurz ILI) ist durch plötzlichen Erkrankungsbeginn mit Fieber ($\geq 38,5$ °C), trockenem Reizhusten, Halsschmerzen, Muskel- und/oder Kopfschmerzen gekennzeichnet. Weitere Symptome können allgemeine Schwäche, Schweißausbrüche, Rhinorrhö, aber auch Übelkeit/Erbrechen und Durchfall sein. Zu beachten ist jedoch, dass bei Weitem nicht alle Influenza-Infizierten mit typischer Symptomatik erkranken. Die Krankheitsdauer liegt in der Regel bei 5–7 Tagen, die in Abhängigkeit von Komplikationen und Risikofaktoren jedoch auch deutlich länger sein kann¹.

Eine spezifische antivirale Therapie sollte bei Verdacht auf einen schweren Verlauf einer Influenza-Erkrankung oder wenn ein erhöhtes Risiko für einen schweren Verlauf besteht erwogen werden. Diese sollte innerhalb von 48 Stunden nach Symptombeginn begonnen werden. Bei Patienten, die nicht zu den Risikogruppen gehören sowie bei unkompliziertem Verlauf erfolgt die Behandlung symptomatisch, bei Zeichen einer bakteriellen Superinfektion sind Antibiotika indiziert¹.

Verfügbare Virustatika zur Behandlung von Influenzainfektionen

Derzeit sind zur Therapie und Prophylaxe von Influenzainfektionen in Deutschland verschreibungspflichtige Medikamente aus zwei Wirkstoffklassen zugelassen. Der M2-Ionenkanalinhibitor Amantadin gehört zur Gruppe der Adamantane und blockiert die Freisetzung viraler RNA in das Cytoplasma der Wirtszelle. Dieser Effekt wird bei therapeutischer Dosierung des Wirkstoffes nur bei Influenza A- jedoch nicht bei Influenza B-Viren erzielt. Amantadin wird zur Therapie der Influenzainfektion derzeit kaum eingesetzt.

Die Wirkstoffe Oseltamivir (Tamiflu®) und Zanamivir (Relenza®) aus der Gruppe der Neuraminidaseinhibitoren wurden 2002 von der Europäischen Arzneimittelagentur EMA zur Behandlung von Influenzainfektionen zugelassen. Sie hemmen selektiv die Neuraminidase von Influenza A- und B-Viren, wodurch die Freisetzung neuer Viren aus infizierten Zellen verhindert wird.

Oseltamivir ist als Oseltamivirphosphat in Form von Kapseln und als Pulver zur Herstellung einer Suspension zum Einnehmen erhältlich. Es wird im Darm und in der Leber von Esterasen zum aktiven Metaboliten Oseltamivircarboxylat biotransformiert. Zu den häufigsten möglichen unerwünschten Wirkungen gehören Übelkeit, Erbrechen und Kopfschmerzen.

Zanamivir zeigt eine schlechte orale Bioverfügbarkeit und wird deshalb gemischt mit Lactose als trockenes Pulver inhaliert. Zu den häufigsten möglichen Nebenwirkungen zählen Kopfschmerzen, Durchfälle, Übelkeit, Erbrechen.

Für Deutschland ist eine Behandlung mit Oseltamivir bei Patienten ab einem Jahr und mit Zanamivir ab fünf Jahren von der EMA zugelassen. Eine antivirale Therapie bei Neugeborenen und jungen Säuglingen (< 3 Monate) sollte nach den Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für pädiatrische Infektiologie (DGPI) bei schwerem klinischen Krankheitsbild unter sorgfältiger Abwägung der Risiken erwogen werden².

Die Sicherheit und Pharmakokinetik von intravenös (i.v.) verabreichten Oseltamivir und Zanamivir wird derzeit im Rahmen klinischer Studien getestet³.

Virustatika in klinischen Studien

Die seit 2010 in Japan und Korea zugelassenen Neuraminidaseinhibitoren Peramivir und Laninamivir befinden sich derzeit in den USA in der klinischen Studienphase 3⁴.

Peramivir (Rapiacta®, PeramiFlu®) ist ein Cyclopentan-Analogon des Oseltamivir, das in Studien verschiedene antiviral resistente Influenzaviren inhibierte. Aufgrund seiner schlechten oralen Bioverfügbarkeit wurde Peramivir als intramuskulär (i.m.) oder i.v. applizierbarer Wirkstoff entwickelt. Während der Pandemie 2009 war dieser Wirkstoff in den USA zur parenteralen Gabe zur Behandlung von A(H1N1)pdm09-Infektionen als Notfallmedikament zugelassen. Diese Notfallzulassung wurde Ende 2010 zugunsten einer klinischen Studie Phase 3 aufgehoben.

Laninamiviroctanoat (Inavir®) wird als Prodrug inhaliert und in der Lunge in seine aktive Form konvertiert. Es verfügt über eine sehr lange Halbwertszeit und zeigte in klinischen Studien eine gute Wirksamkeit sowohl gegenüber den zirkulierenden Influenza A- und B-Stämmen als auch gegen die meisten Oseltamivir-resistenten Virusstämme⁵.

FludASE ist ein rekombinantes Protein aus der Neuraminidase von *Actinomyces viscosus* und einer humanen Epitheldomäne. Das Wirkprinzip beruht auf der Entfernung der Neuraminsäurerezeptoren der Zelloberflächen des respiratorischen Trakts. Die klinische Studie Phase 2 zum Einfluss auf die Viruslast sowie zur Sicherheit und Verträglichkeit des Wirkstoffs wird derzeit in 50 Zentren in den USA und Mexico durchgeführt.

Favipiravir inhibiert die RNA-Polymerase sowohl von Influenzaviren als auch von verschiedenen anderen RNA-Viren. Es ist als Prodrug oral verfügbar und fungiert nach Ribolysierung und Phosphorylierung als Nukleosid-Analogon. Nachdem die Untersuchungen zur Wirksamkeit gegen Influenza A- und B-Viren abgeschlossen sind, befindet sich der Wirkstoff zurzeit in einer klinischen Studie Phase 2⁶.

Methoden zur Resistenzbestimmung

Resistenzen gegen antivirale Wirkstoffe entstehen durch subtyp- und inhibitorspezifische Punktmutationen in den Genen der therapeutischen Zielproteine Neuraminidase (NA) und M2-Ionenkanal (Tabelle 1). Diese Mutationen können durch sequenzbasierte Techniken (klassische Sequenzierung, Pyrosequenzierung) oder aber durch den Einsatz von z.B. Schmelzpunktanalysen von spezifischen PCR-Amplifikaten nachgewiesen werden⁷⁻⁹.

In den meisten Fällen ist die Ableitung einer *in vitro* Resistenz gegenüber Neuraminidaseinhibitoren anhand des genotypischen Profils unzuverlässig, da zurzeit keine ausreichend gesicherten Daten in größerem Umfang zur Korrelation zwischen einer mit Resistenz assoziierten Mutation und einer tatsächlichen *in vitro* Resistenz (Erhöhung der 50%-inhibitorischen Konzentration; IC₅₀) vorliegen. Für Viren der Subtypen A(H1N1) und A(H1N1)pdm09 jedoch kann der Nachweis der NA-Substitution H275Y (N1 Nummerierung) als „Oseltamivir-resistent“ interpretiert werden. Für alle übrigen Influenza A- und B-Viren gilt die phänotypische Resistenzanalyse als der Goldstandard. Diese kann durch luminometrische oder fluorometrische Neuraminidase-Inhibitions-Assays durchgeführt werden. Diese Methoden ermöglichen die Ermittlung der 50% inhibitorischen Konzentration, das heißt derjenigen Wirkstoffkonzentration, bei der 50% der Neuraminidaseaktivität der Influenzaviren gehemmt ist. In internationaler Übereinstimmung wird im fluorometrischen Test ein cut-off von 100nM zur Identifikation NA-Inhibitor resistenter Influenza A-Viren verwendet. Für Influenza B-Viren gilt eine 10fache Erhöhung der IC₅₀ von NA-Inhibitoren verglichen mit sensitiven Wildtypviren (IC₅₀>200nM) als Resistenznachweis¹⁰. Da neben dem Vorliegen einer Mutation verschiedene Faktoren zu einer Erhöhung der IC₅₀ führen können, sollte eine detektierte *in vitro* Resistenz durch den Nachweis der mit dieser Resistenz assoziierten Mutation bestätigt werden. Die klinische Signifikanz einer nachgewiesenen *in vitro* Resistenz von Influenzaviren ist derzeit noch nicht bekannt.

Tabelle 1: Mutationen der Neuraminidase und des M2-Proteins, die mit antiviraler Resistenz assoziiert sind

Virus Typ/Subtyp	NA-Mutation	Empfindlichkeit gegen	
		Oseltamivir	Zanamivir
A(H3N2)	R292K E119V E119V+I222V N294S Δ244-247 Q136K	resistent resistent resistent schwach resistent resistent sensitiv	schwach resistent sensitiv sensitiv sensitiv sensitiv resistent
A(H1N1)pdm09	H275Y Q136K	resistent sensitiv	sensitiv resistent
A(H5N1)	H275Y N295S	resistent resistent	sensitiv sensitiv
B (Yamagata- und Victoria-Linie)	D198N R152K	resistent resistent	schwach resistent resistent
M2-Ionenkanal	L26F, V27A/D, A30T, S31N, G34E		

Modifiziert nach ¹¹

Überwachung der Resistenzsituation bei Influenzaviren in Deutschland

Im Nationalen Referenzzentrum für Influenza (Robert Koch-Institut) werden die in Deutschland zirkulierenden Influenzaviren auf ihre Resistenzeigenschaften untersucht und die Entstehung und Verbreitung resistenter Viren überwacht und dokumentiert. Die regelmäßig erhobenen Daten werden dem European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) und der World Health Organization (WHO) berichtet und fließen in die internationale Überwachung der Resistenzsituation bei Influenzaviren ein. Zusätzlich werden die Daten zur Resistenz aktuell zirkulierender Viren auf der Homepage der Arbeitsgemeinschaft Influenza¹² publiziert. Die Untersuchung einer repräsentativen Anzahl der zwischen Oktober 1998 und April 2013 in Deutschland zirkulierenden Influenzaviren A- und B-Viren ergab eine mit anderen Ländern vergleichbare Resistenzsituation.

Resistenzen gegen Adamantane

In der Influenzasaison 2004/2005 zeigte sich in Asien, Europa, Australien und den USA eine starke Verbreitung von Influenzaviren des Subtyps A(H3N2), die gegen Adamantane resistent waren. In der nachfolgenden Saison 2005/2006 stieg die Prävalenz dieser Viren auf nahezu 100% an¹³. Aufgrund der starken Verbreitung resistenter A(H3N2)-Viren und ersten Berichten über den Nachweis resistenter saisonaler A(H1N1)-Viren empfahlen im Jahr 2006 die Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Adamantane nicht mehr zur Prophylaxe und Therapie von Influenzainfektionen einzusetzen.

Obwohl Influenzainfektionen in Deutschland nicht oder nur kaum mit Medikamenten aus der Gruppe der Adamantane behandelt werden, zeigte sich auch hier in umfangreichen Studien ein erstes Auftreten Adamantan-resistenter A(H3N2)-Viren in der Saison 2004/2005 sowie eine starke Verbreitung dieser Viren in den nachfolgenden Saisons. Seit der Saison 2008/2009 wurden alle in Deutschland getesteten Influenzaviren des Subtyps A(H3N2) als resistent gegen Adamantane identifiziert. Die Resistenz war auf eine einzige Substitution an Position 31 des M2-Ionenkanals (S31N) zurückzuführen.

Die seit April 2009 zirkulierenden pandemischen A(H1N1)pdm09-Viren tragen aufgrund von Reassortmentereignissen das M2-Ionenkanalprotein aus der Europäischen A(H1N1)-Schweine-

influenzalinie. Viren, die dieser Linie zugehörig sind, tragen die Substitution S31N im M2-Ionenkanal^{14,15}, so dass Viren des Subtyps A(H1N1)pdm09 eine „natürliche“ Resistenz gegen Adamantane zeigen.

Resistenzen gegen Neuraminidaseinhibitoren

Resistenzen gegen die Neuraminidaseinhibitoren Oseltamivir und Zanamivir traten seit deren Zulassung nur sporadisch und überwiegend in klinischen Studien bei immunsupprimierten Patienten auf. Besonders häufig wurde eine verminderte Empfindlichkeit gegen Oseltamivir beobachtet, die durch den Austausch von Histidin gegen Tyrosin an Position 275 (H275Y) der Neuraminidase von A(H1N1)-Viren verursacht wird. Bis November 2007 lag die Prävalenz von resistenten A(H1N1)-Viren in unbehandelten Erwachsenen bei <1%. Unter dem Selektionsdruck der Therapie wurden bei Erwachsenen in 0,4% und bei Kindern in bis zu 18% der Fälle Viren detektiert, die unempfindlich gegenüber Oseltamivir waren. Im Vergleich zu sensitiven Viren wiesen diese resistenten Viren jedoch eine reduzierte virale Fitness, gekennzeichnet durch schlechtere Replikationsraten, und geringere Übertragbarkeit auf.

Unerwartet war daher die im Winter 2007/2008 beobachtete verstärkte Zirkulation Oseltamivir-resistenter A(H1N1)-Viren in therapie-naiven Patienten auf der Nordhalbkugel. Die Prävalenz dieser Viren stieg im Verlauf der Saison stark an, so dass im Durchschnitt jedes vierte während der Saison 2007/2008 in Europa zirkulierende A(H1N1)-Virus eine Resistenz gegen Oseltamivir aufwies. Die Resistenz gegenüber Oseltamivir war durch die Substitution H275Y der viralen Neuraminidase bedingt. Die Selektion dieser Resistenzen war nicht mit einer Oseltamivir-Therapie assoziiert und konnte auch nicht durch Reassortmentereignisse erklärt werden. Die Patienten waren untereinander epidemiologisch nicht verlinkt und auch die Symptomatik war der einer Infektion mit sensitiven A(H1N1)-Influenzaviren vergleichbar^{16,17}. Es wurde gezeigt, dass Oseltamivir-resistente A(H1N1)-Viren während einer Infektion bis zu 8 Tage ausgeschieden werden, durch Haushaltskontakte übertragen werden können und sich das Resistenzprofil im Infektionsverlauf nicht verändert¹⁸. Im darauffolgenden Sommer 2008 stieg die Prävalenz resistenter A(H1N1)-Viren auf der Südhalbkugel bis auf 80% und in der nachfolgenden Saison 2008/2009 zeigte nahezu jedes zirkulierende Virus vom Subtyp A(H1N1) die mit starker Oseltamivir-Resistenz assoziierte Mutation H275Y.

Die seit April 2009 zirkulierenden pandemischen A(H1N1)pdm09-Viren tragen aufgrund von Reassortment-Ereignissen eine Neuraminidase aviär-porcinen Ursprungs, die sich durch Empfindlichkeit gegen Neuraminidasehemmer auszeichnet¹⁹. Die Analyse von 1570 A(H1N1)pdm09-Proben, die zwischen April 2009 und April 2010 in Deutschland gewonnen wurden, zeigte in acht Fällen Viren, die gegen Oseltamivir resistent waren. Diese resistenten Viren trugen die Substitution H275Y in der Neuraminidase und zeigten in phänotypischen Assays im Vergleich zum sensitiven Wildtypvirus eine bis zu 1.000-fache Erhöhung der IC₅₀ für Oseltamivir. Resistenzen gegen Zanamivir wurden nicht beobachtet. Sechs der acht resistenten A(H1N1)pdm09-Viren stammten von Patienten, die über einen längeren Zeitraum mit Oseltamivir behandelt wurden und zusätzlich zur Influenzainfektion immunsupprimiert waren oder an einer anderen Grunderkrankung litten²⁰. Die Entstehung der Resistenzvarianten während der Influenzaerkrankung durch Oseltamivir-Therapie bedingten Selektionsdruck konnte in zwei dieser Fälle nachgewiesen werden²¹.

In der Saison 2012/2013 wurden ca. 600 Resistenzprofile gegen Neuraminidaseinhibitoren erstellt. Dabei wurden bei acht Patienten A(H1N1)pdm09-Viren identifiziert, die sich aufgrund der Neuraminidase-Mutation H275Y unempfindlich gegen Oseltamivir aber weiterhin sensitiv gegen Zanamivir zeigten. Die Entstehung der resistenten Virusvarianten durch den Selektionsdruck der Therapie mit Oseltamivir konnte anhand von Follow-Up Proben von sieben Patienten nachgewiesen werden. Ein resistentes Virusisolat stammte von einem Patienten, der nicht therapiert wurde. Eine Übertragung bereits resistenter A(H1N1)pdm09 ist in diesem Fall nicht auszuschließen. Influenza B-Viren und Viren des

Subtyps A(H3N2), die eine verminderte Empfindlichkeit gegen Oseltamivir oder Zanamivir zeigten, wurden nicht detektiert²².

Ausblick

Aufgrund der Resistenzprofile der seit der Saison 2009/2010 in Deutschland zirkulierenden Influenzaviren (A(H1N1)pdm09, A(H3N2), Influenza B), beziehungsweise der Wirkungsspektren der verfügbaren Medikamente, stehen derzeit zur Behandlung von Influenzainfektionen nur Wirkstoffe aus der Gruppe der Neuraminidaseinhibitoren zur Verfügung (in Deutschland Oseltamivir und Zanamivir). Auch wenn die erhobenen Daten zurzeit keine Hinweise auf eine Zirkulation von Influenzaviren mit verminderter Empfindlichkeit gegen Oseltamivir und Zanamivir geben, unterstreicht das in der Vergangenheit beobachtete plötzliche Auftreten und die schnelle Verbreitung Oseltamivir- bzw. Adamantan-resistenter Influenzaviren unabhängig von einem therapeutischen Selektionsdruck die dringende Notwendigkeit, neue Wirkstoffe zu entwickeln und die engmaschige Überwachung der Resistenzprofile zirkulierender Influenzaviren im internationalen Kontext fortzuführen.

Literatur

- 1) Influenza RKI-Ratgeber für Ärzte (Saisonale Influenza, Influenza A(H1N1) 2009, Aviäre Influenza) verfügbar unter: <http://www.rki.de>
- 2) Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Infektiologie, verfügbar unter: http://www.aerztekammerberlin.de/40presse/15_meldungen/00688_Schweinegrippe/00688_Aktualisierte_Empfehlungen_DGPI_zur_Therapie_und_Prophylaxe_bei_Kindern_und_Jugendlichen_20_August_2009.pdf
- 3) Ison MG. Antivirals and resistance: influenza virus. *Curr Opin Virol.* 2011 Dec;1(6):563-73
- 4) Palmer R. Drugs: Lines of defence. *Nature.* 2011 Dec 7;480(7376):S9-10
- 5) Ison MG. Antivirals and resistance: influenza virus. *Curr Opin Virol.* 2011 Dec;1(6):563-73.
- 6) Baranovich T, Wong SS, Armstrong J, Marjuki H, Webby RJ, Webster RG, Govorkova EA. T-705 (favipiravir) induces lethal mutagenesis in influenza A H1N1 viruses in vitro. *J Virol.* 2013 Apr;87(7):3741-51.
- 7) Duwe S, Schweiger B. A new and rapid genotypic assay for the detection of neuraminidase inhibitor resistant influenza A viruses of subtype H1N1, H3N2, and H5N1. *J Virol Methods.* 2008;153(2):134-141.
- 8) Duwe SC, Wedde M, Birkner P, Schweiger B. Genotypic and phenotypic resistance of pandemic A/H1N1 influenza viruses circulating in Germany. *Antiviral Res.* 2011;89(1):115-118
- 9) Redlberger-Fritz M, Aberle SW, Strassl R, Popow-Kraupp T. Rapid identification of neuraminidase inhibitor resistance mutations in seasonal influenza virus A(H1N1), A(H1N1)2009, and A(H3N2) subtypes by melting point analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2012 Jul;31(7):1593-601
- 10) European Influenza Surveillance Network, <https://tessy.ecdc.europa.eu>
- 11) WHO Global Influenza Surveillance Network Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. World Health Organization 2011, 20, Avenue Appia, 1211 Geneva 27, Switzerland
GISN@who.int
- 12) Arbeitsgemeinschaft Influenza, AGI, Wochen- und Saisonberichte verfügbar unter: <http://influenza.rki.de>
- 13) Hayden F. Developing new antiviral agents for influenza treatment: what does the future hold? *Clin Infect Dis.* 2009 Jan 1;48 Suppl 1:S3-13. Review.
- 14) Schmidtke M, Zell R, Bauer K, Krumbholz A, Schrader C, Suess J, Wutzler P. Amantadine resistance among porcine H1N1, H1N2, and H3N2 influenza A viruses isolated in Germany between 1981 and 2001. *Intervirology.* 2006;49(5):286-93.
- 15) Krumbholz A, Schmidtke M, Bergmann S, Motzke S, Bauer K, Stech J, Dürrwald R, Wutzler P, Zell R. High prevalence of amantadine resistance among circulating European porcine influenza A viruses. *J Gen Virol.* 2009 Apr;90(Pt 4):900-8.

- 16) Ciancio BC, Meerhoff TJ, Kramarz P, Bonmarin I, Borgen K, Boucher CA, Buchholz U, Buda S, Dijkstra F, Dudman S, Duwe S, Hauge SH, Hungnes O, Meijer A, Mossong J, Paget WJ, Phin N, van der Sande M, Schweiger B, Nicoll A. Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses detected in Europe during season 2007-8 had epidemiologic and clinical characteristics similar to co-circulating susceptible A(H1N1) viruses. *Euro Surveill.* 2009;14(46). pii: 19412.
- 17) Buchholz U, Brockmann S, Duwe S, Schweiger B, an der Heiden M, Reinhardt B, Buda S. Household transmissibility and other characteristics of seasonal oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) viruses, Germany, 2007-8. *Euro Surveill.* 2010;15(6). pii: 19483
- 18) Duwe S, Heider A, Braun C, Schweiger B, Buchholz U. Person-to-person transmission of oseltamivir-resistant influenza A/H1N1 viruses in two households; Germany 2007/08. *J Clin Virol.* 2009;46(3):295-297.
- 19) Bauer K, Dürrwald R, Schlegel M, Pfarr K, Topf D, Wiesener N, Dahse HM, Wutzler P, Schmidtke M. Neuraminidase inhibitor susceptibility of swine influenzaA viruses isolated in Germany between 1981 and 2008. *Med Microbiol Immunol.* 2012 Feb;201(1):61-72
- 20) Duwe SC, Wedde M, Birkner P, Schweiger B. Genotypic and phenotypic resistance of pandemic A/H1N1 influenza viruses circulating in Germany. *Antiviral Res.* 2011 Jan;89(1):115-8.
- 21) Shayegi N, Schweiger B, Duwe S, Pöhlmann C, Bornhäuser M, Ehninger G, Schetelig J. Antiviral treatment of influenza A (H1N1-09) guided by molecular resistance testing in aplasia after allo-SCT. *Bone Marrow Transplant.* 2011;46(11):1492-1494
- 22) Silke Buda, Karla Köpke, Kerstin Prahm, Brunhilde Schweiger, Marianne Wedde, Susanne Duwe, Udo Buchholz, Matthias an der Heiden, Walter Haas. Bericht zur Epidemiologie der Influenza in Deutschland Saison 2012/13. Hrsg.: Robert Koch-Institut, Berlin 2013, ISBN 978-3-89606-252-9.

08.10.2013

Dr. rer. nat. Susanne Duwe, Robert Koch-Institut, Fachgebiet Influenza und andere Respiratorische Viren, Nationales Referenzzentrum für Influenza, Seestraße 10, 13353 Berlin, Email: DuweS@rki.de