

OHJE MUUNTOGEEENISTEN VIRUSTEN SULJETUN KÄYTÖN LUOKITUKSESTA JA ERISTYSTOIMISTA

Sisällys

HUOMIOITAVAA.....	3
KÄYTÖN LUOKITUS PERUSTUU RISKINARVIOINTIIN.....	3
YLEISIÄ TYÖSKENTELYPERIAATTEITA.....	5
MUUNTOGEEENISTEN VIRUSTEN JA VIRUSVEKTORIEN KÄYTTÖ ELÄINTILOISSA	6
MUUNTOGEEENISTEN VIRUSTEN JA VIRUSVEKTORIEN KÄYTTÖ CORE- YKSIKÖSSÄ	7
VIRUSRYHMÄKOHTAISET OHJEET.....	7
AAV (Adeno-associated) -virukset	7
Yleistä.....	7
Villityypin viruksen biologinen luokitus	8
GM-viruksen käytön luokitus.....	8
Tarvittavat toimenpiteet	9
Adenovirukset (Adenoviridae).....	9
Yleistä.....	9
Villityypin viruksen biologinen luokitus	9
GM-viruksen käytön luokitus.....	9
Tarvittavat toimenpiteet	10
Bakulovirukset.....	10
Yleistä.....	10
Villityypin viruksen käytön luokitus	11
GM-viruksen käytön luokitus.....	11
Tarvittavat toimenpiteet	12
Herpesryhmän virukset	12
Yleistä.....	12
Villityypin viruksen biologinen luokitus	12
GM-viruksen käytön luokitus.....	12
Tarvittavat toimenpiteet	12
Influenssavirukset	13
Yleistä.....	13
Villityypin viruksen luokitus.....	13
GM-viruksen käytön luokitus.....	13

Tarvittavat toimenpiteet	13
Koronavirukset	14
Yleistä.....	14
Villityypin viruksen luokitus.....	14
GM-viruksen käytön luokitus.....	14
Tarvittavat toimenpiteet	14
Lentivirukset (HIV, FIV, SIV).....	15
Yleistä.....	15
Villityypin viruksen biologinen luokitus	15
GM-viruksen käytön luokitus.....	15
Tarvittavat toimenpiteet	15
Käytön luokitus eri tilanteissa	16
Tarvittavat toimenpiteet	17
GM-viruksen käytön luokitus.....	17
Tarvittavat toimenpiteet	17
Papillomavirukset (Papillomaviridae)	18
Yleistä.....	18
Villityypin viruksen biologinen luokitus	18
GM-viruksen käytön luokitus.....	18
Tarvittavat toimenpiteet	18
Pikornavirukset.....	19
Yleistä.....	19
Villityypin viruksen luokitus.....	19
GM-viruksen käytön luokitus.....	19
Tarvittavat toimenpiteet	19
Retrovirukset (muut kuin lentivirukset)	19
Yleistä.....	19
Villityypin retroviruksen biologinen luokitus.....	20
GM-viruksen käytön luokitus.....	20
Tarvittavat toimenpiteet	21
Sendai-virus	22
Yleistä.....	22
Villityypin viruksen biologinen luokitus	23
GM-viruksen käytön luokitus.....	23
Tarvittavat toimenpiteet	23
Vacciniavirukset	24
Yleistä.....	24
Villityypin viruksen biologinen luokitus	24
GM-virusten käytön luokitus	24
Tarvittavat toimenpiteet	24
Zoonoosivirukset.....	25
Yleistä.....	25
Villityypin virusten luokitus	25
GM-virusten käytön luokitus	25
Tarvittavat toimenpiteet	26

HUOMIOITAVAA

Tämä ohje koskee ainoastaan sellaista muuntogeenisten (GM-) eläinvirusten ja eläinvirusvektoreiden käyttöä, joka kuuluu geenitekniikkalain (377/1995) soveltamisalaan. [Valtioneuvoston asetuksessa \(928/2004\) geenitekniikasta](#) on kuvattu, millä menetelmillä ja tekniikoilla aikaansaadut organismit ovat geenitekniikkalain tarkoittamia muuntogeenisiä organismeja. Ohje ei siis koske luonnollisten virusten käyttöä eikä primaarisolujen testausta tai luokitusta.

Ohjeeseen on koottu tavanomaisimmin käytössä olevia muuntogeenisiä viruksia koskevia suosituksia yleisellä tasolla. Toiminnanharjoittajalla on aina geenitekniikkalain 9 §:n mukainen selvilläolovelvollisuus käyttämänsä muuntogeenisen organismin ominaisuuksista, ja käytöstä on tehtävä tapauskohtainen riskinarviointi. Vaikka ohje siis antaa perustietoa tiettyjen virusten - ja osittain muidenkin virusten - turvallisesta käytöstä, jokaisen toiminnanharjoittajan on riskinarvioinnin perusteella valittava juuri omaan toimintaansa parhaiten soveltuvat riskinhallintatoimenpiteet käyttämiensä GM-virusten ominaisuuksien perusteella.

Tutustu ohjeen yleiseen osioon ennen siirtymistä viruskohtaisiin ohjeisiin.

KÄYTÖN LUOKITUS PERUSTUU RISKINARVIOINTIIN

Muuntogeenisten virusten käytön luokitus perustuu toiminnanharjoittajan tekemään riskinarviointiin. Riskinarvioinnin periaatteista, luokituksesta sekä eristämistoimenpiteistä säädetään sosiaali- ja terveysministeriön [asetuksessa 1053/2005](#). Riskinarvioinnin lähtökohta on muuntogeenisen viruksen tai virusvektorin taustalla olevan luonnollisen viruksen taudinaiheuttamiskyvyn mukainen biologisten tekijöiden luokitus (BSL, engl. biosafety level). Siitä säädetään Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksessa 748/2020. Riskinarvioinnissa huomioidaan myös geenitekkinen muutos ja muokatun viruksen käyttötapa. Geenitekniikkasäädösten mukaisessa riskinarvioinnissa voidaan näin ollen päätyä biologisten tekijöiden luokituksesta poikkeavaan käytön luokkaan.

Muuntogeeniset virukset voidaan luokitella taudinaiheuttamiskyvyn perusteella seuraavasti:

- Luokkaan 1 kuuluvat GM-virukset, jotka eivät todennäköisesti aiheuta sairautta ihmisille, eläimille tai kasveille.
- Luokkaan 2 kuuluvat GM-virukset, jotka voivat aiheuttaa sairauden ihmisille, eläimille tai kasveille, mutta eivät kuitenkaan todennäköisesti leviä väestössä tai muissa populaatioissa. Käytettävissä on yleensä tehokas ehkäisy- tai torjuntakeino tai hoito.
- Luokkaan 3 kuuluvat GM-virukset, jotka voivat aiheuttaa vakavan sairauden ihmisille, eläimille tai kasveille ja jotka voivat levitä väestössä tai

populaatiossa, mutta käytettävissä on yleensä tehokas ehkäisy- tai torjuntakeino tai hoito.

- Luokkaan 4 kuuluvat GM-virukset, jotka voivat aiheuttaa vakavan sairauden ihmisille, eläimille tai kasveille ja jotka voivat aiheuttaa vakavan vaaran levitessään väestössä tai populaatiossa. Käytössä ei ole tehokasta ehkäisy- tai torjuntakeinoa tai hoitoa.

Geenitekkinen muutos tai viruksen käyttötapa voivat riskinarvioinnissa johtaa yleisestä linjauksesta poikkeavaan luokitukseen. Riskinarvioinnissa on tärkeää tunnistaa tapaukset, joissa käytettävän insertin ominaisuudet voivat lisätä riskiä. Erityisesti on huomioitava muutokset seuraavissa tekijöissä:

- infektoidun solun geenien aktiivisuus (transkriptio)
- viruksen onkogeenisuus
- toksisuus
- isännän immuunivasteiden kehittyminen (interleukiinit, sytokiinit)
- viruksen isäntäspesifisyys
- viruksen patogeenisuus
- viruksen lääkeaineherkkyys

Lisäksi riskinarviointiin ja käytön luokitukseen vaikuttavat muuntogeenisen viruksen aiotun käyttötavan erityispiirteet, kuten säilytys, viljely soluviljelmissä, infektiivisen ja replikaatiokykyisen viruksen määrä virusta tuottaessa ja viruksen infektointi koe-eläimeen. Käytön luokitukseen vaikuttaa myös tehokkaiden rokotteiden tai viruslääkkeiden saatavuus ja väestön rokotuskattavuus.

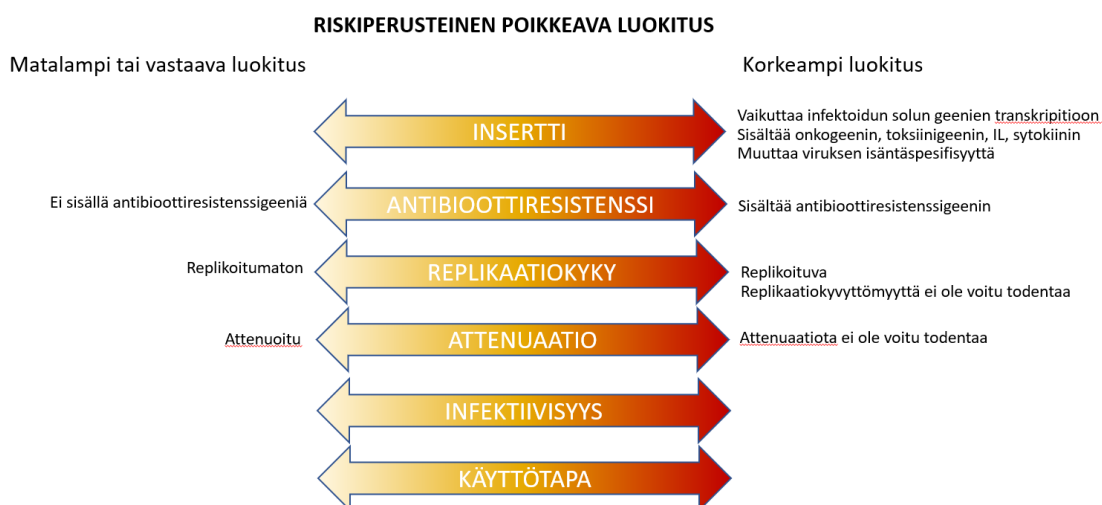
Käytön luokitukseen vaikuttaa olennaisesti viruksen infektiivisyys ja replikaatiokyky, kyky levitä ja aiheuttaa haittavaikutuksia yksilöissä ja väestössä. Infektiivisellä viruksella tarkoitetaan tässä virusta, joka voi tunkeutua soluun. Replikatiivisella viruksella tarkoitetaan sellaista virusta, joka lisääntyy (eli jonka genomi replikoi) solussa ja tuottaa infektiio- ja replikaatiokykyisiä viruspartikkeleita. Replikatiivisena viruksena ei pidetä muokattua virusta tai virusvektoria, joka tuottaa genomirakenteestaan pelkkää nukleiinihappoa tai rekombinanttiproteiinia itse replikoitumatta. Viruksen kaltainen partikkeli (VLP-virus) ei ole muuntogeeninen organismi, koska se ei sisällä virusgenomia, eikä siten ole replikatiivinen.

Muuntogeenisiä viruksia ja erityisesti virusvektoreita käytettäessä joudutaan usein pohtimaan mahdollisuutta, voivatko ne revertoitua tai rekombinoitua takaisin luonnolliseksi virukseksi. Tämän takia on tunnettava viruserän replikaatiokyky ja infektiivisyys.

Kantasoluissa mahdollisesti olevien luonnollisten virusten rekombinaatoriski muuntogeenisen viruksen tai virusvektorin kanssa on huomioitava riskinarvioinnissa. Kantasoluilla työskenneltäessä suositellaan varmistamaan, etteivät solut sisällä samaa viruslajia, jota käytetään muokkauksessa. Esimerkiksi ihmisestä peräisin olevat solut on testattava HIV-negatiivisiksi, jos niitä aiotaan infektoida lentivirusvektorilla. Kun käytetään ihmisen tai kädellisten kantasoluja, on huomioitava myös työsuojeluun liittyvät kysymykset endogeenisten taudinaiheuttajien varalta.

Viruksen käyttäytymistä voidaan havainnoida esimerkiksi tarkastelemalla viruksen aiheuttamia muutoksia eli sytopaattisia vaikutuksia solukossa (CPE; engl. cytopathic effect) immunofluoresenssimenetelmällä tai kvantitatiivisella geenimonistuksella

(PCR). PCR-testauksessa on muistettava, että positiivinen tulos ei ole osoitus viruksen replikaatiokyvystä tai -kyvyttömyydestä. Toiminnanharjoittajan on riskinarvioinnissa perusteltava käyttämänsä menetelmä, jolla esitettyyn käytön luokkaan on päädytty.



Kuva 1: Esimerkkejä riskinarvioinnissa käsiteltävistä tekijöistä, jotka voivat muuttaa viruksen lähtökohtaista käytön luokitusta.

YLEISIÄ TYÖSKENTELYPERIAATTEITA

Muuntogeenisen viruksen tai virusvektorin suljetussa käytössä noudatetaan sen käytön luokkaa vastaavan eristystason mukaisia suojatoimenpiteitä. Eristystasoja koskevat vaatimukset on kuvattu asetuksen 1053/2005 liitteessä. Kaikissa käytön luokissa on lisäksi noudatettava hyvän laboratoriotyöskentelyn periaatteita.

Työntekijöiden turvallisuuden varmistamiseksi on huomioitava myös [valtionneuvoston asetus \(933/2017\)](#) työntekijöiden suojelemiseksi biologisista tekijöistä aiheutuville vaaroille. Asetus kattaa sekä luonnolliset että muuntogeeniset biologiset tekijät, joten sitä on noudatettava GM-virustyöskentelyssä geenitekniikkasäädösten lisäksi. Työsuojelusta saa lisää tietoa Työsuojeluhallinnon ja Työterveyslaitoksen verkkosivuilta.

Eristämistoimenpiteitä valittaessa on kiinnitettävä erityistä huomiota siihen, voiko muuntogeeninen virus levitä aerosolien välityksellä. Jos leviäminen on mahdollista, työvaiheet, joissa voi muodostua aerosoleja, on syytä minimoida. Esimerkiksi kudosten homogenisoinnissa, sentrifugoinnissa ja mikroskopoinnissa on pyrittävä estämään roiskeiden ja pisaroiden leviäminen, huolehdittava työntekijän ja ympäristön suojaamisesta niiltä ja valittava kyseiselle virukselle soveltuvat dekontaminaatiomenetelmät työympäristön puhdistamiseen. Laminaarien hepa-suodattimet on vaihdettava säännöllisin väliajoin.

Työskentelyssä on huomioitava myös riski muuntogeenisten virusten leviämisestä suljetun käytön tilojen ulkopuolella oleviin tuotanto-, harrastus- ja lemmikkieläimiin tai luonnoneläimiin. Työntekijöiden olisi hyvä välttää säännöllisiä lähikontakteja sellaisiin eläimiin, joita käytetyt virukset erityisesti voisivat infektoida. Jos tämä ei ole

mahdollista, eristämistoimenpiteillä on varmistettava, ettei GM-virus pääse leviämään suljetun käytön tiloista työntekijöiden välityksellä.

Jos kyseisen viruksen aiheuttamaa tautia vastaan on saatavilla tehokas rokote, olisi harkittava sen tarjoamista työntekijöille, tarvittaessa myös kansallisen rokotusohjelman ulkopuolelta. Saatavilla olevista rokotteista löytyy lisätietoa seuraavista lähteistä, joista viime mainitun listaus on kattavin:

- 1) WHO/Immunization, Vaccines and Biologicals
<https://www.who.int/teams/immunization-vaccines-and-biologicals>
- 2) WHO/Strategic Advisory Group of Experts on Immunization (SAGE).
<https://www.who.int/groups/strategic-advisory-group-of-experts-on-immunization>
- 3) CDC/Vaccines & Immunizations
<https://www.cdc.gov/vaccines/index.html>
- 4) EMA/Availability of veterinary vaccines
<https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory-overview/research-development-veterinary-medicines/availability-veterinary-vaccines>
- 5) FDA/Vaccines Licensed for Use in the United States
<https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/vaccines/vaccines-licensed-use-united-states>

Huom! Jos FDA:n lisensoimalla rokotteella ei ole EMA:n myyntilupaa, sille tulisi hakea Suomessa erityislupaa FIMEAsta.

Lisätietoa viruksista ja virusten aiheuttamista sairauksista: "Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1". Heikkinen, T., Järvinen, A., Meri, S., Vapalahti, O., Vuopio, J. (toim.). 4. uudistettu painos. Kustannus Oy Duodecim. ISBN 978-951-656-548-7. Printon, Tallinna 2020.

MUUNTOGEENISTEN VIRUSTEN JA VIRUSVEKTORIEN KÄYTTÖ ELÄINTILOISSA

Koe-eläinyksikön tai -keskuksen suljetun käytön ilmoitus ei yleensä kata muuntogeenisiä viruksia ja virusvektoreita. Kunkin tiloja käyttävän toiminnanharjoittajan on siksi itse huolehdittava ilmoitusvelvollisuudestaan ja keskusteltava GM-toiminnasta etukäteen koe-eläinyksikön kanssa. GM-virusten käyttäjän velvollisuus on arvioida toiminnan riskit ja määritellä tarvittavat riskinhallintamenettelyt ja mahdolliset virustestaukset. Yleensä tämä tapahtuu yhteistyössä koe-eläinyksikön kanssa. Käytännössä on havaittu hyväksi toimintamalli, jossa toiminnanharjoittaja tiedottaa koe-eläinyksikköä täytettyään geenitekniikkalain mukaiset velvoitteensa ja toimittaa sille tarvittaessa toimintaansa liittyvät asiakirjat ja riskinarvioinnit ennen kuin GM-virusten käyttö koe-eläinyksikössä alkaa.

Muuntogeenisiä viruksia käyttävän toiminnanharjoittajan on huolehdittava, että kaikki eläinten kanssa työskentelevät henkilöt ovat tietoisia käyttöön mahdollisesti liittyvistä riskeistä ihmisille ja eläimille, sekä tarvittavista riskinhallintatoimenpiteistä.

Eläintenhoitajien koulutukseen on syytä kiinnittää huomiota, ja sen järjestämisestä on sovittava toiminnanharjoittajan ja koe-eläinkeskuksen vastuuhenkilöiden kesken.

MUUNTOGEENISTEN VIRUSTEN JA VIRUSVEKTORIEN KÄYTTÖ CORE-YKSIKÖSSÄ

Suljetun käytön ilmoituksesta tai hakemuksesta on käytävä selkeästi ilmi, mitkä muuntogeeniset organismit ovat käytössä core-yksikön ja toiminnanharjoittajan tiloissa ja millaisia toimintoja niissä suoritetaan. Core-yksikön tiloissa tapahtuvan käytön osalta osapuolten on sovittava, kumpi huolehtii ilmoituksista ja myöhemmistä tiedonannoista geenitekniikan lautakunnalle. Väärinkäsitysten välttämiseksi core-yksikön ja toiminnanharjoittajan väliset sopimukset suositellaan tehtävän kirjallisesti.

Kun muuntogeenisillä viruksilla työskennellään core-yksiköissä, on otettava huomioon, että samoissa tiloissa voidaan käyttää myös vastaavia luonnollisia (muuntamattomia) viruksia. Ennen GM-työskentelyn aloittamista on keskusteltava työnjaosta core-yksikön oman henkilökunnan ja toiminnanharjoittajan työntekijöiden välillä. Lisäksi on keskusteltava siitä, miten muut tiloissa työskentelevät huomioidaan ja miten vältetään mahdollinen rekombinaatoriski, jos tiloissa työskennellään samanaikaisesti luonnollisilla ja muuntogeenisillä viruksilla.

VIRUSRYHMÄKOHTAISET OHJEET

Muuntogeenisiä viruksia on alun perin kehitetty viruksen geenitoimintoja ja elinkiertoa koskeviin tutkimuksiin. Näitä tietoja on käytetty virusvektorien kehittämiseen, jolloin virusta käytetään muun muassa auttajaviruksena (esim. adenovirus-AAV), rokotteiden osana (esim. adenovirusvektorirokote) tai syöpähoidoissa (esim. herpesviruksilla tapahtuva onkolyttinen virushoito). Tässä ohjeessa on aiemmin kuvattu periaatteet, joilla muuntogeenisen viruksen tai virusvektorin käytön luokka määritellään luonnollisen viruksen ominaisuuksien ja siihen tehtyjen muokkausten perusteella.

Esitetyt viruskohtaiset käytön luokitukset koskevat sellaisia muunnoksia, joista on jo jossain määrin käytännön kokemusta. Ohjetta on tarvittaessa sovellettava, koska se ei käsittele kaikkia tunnettuja virusryhmiä tai viruksia, joita on muokattu tai joista on kehitetty geenivektoreita, eikä virusten alatyyppejä tai variantteja. Epäselvissä tapauksissa on syytä kääntyä geenitekniikan lautakunnan puoleen ja pyytää lisäohjeita.

AAV (Adeno-associated) -virukset ja muut parvovirukset

Yleistä

Parvovirukset ovat pieniä vaipattomia ssDNA-viruksia. *Parvoviridae*-heimon alaryhmässä *Parvovirinae* on kolme sukua, joihin kuuluu ihmisiä infektoivia viruksia. Näistä merkittävimmät ovat *Erythrovirus*-suvun parvovirus (B19), *Dependovirussukuun* kuuluvat adeno-associated virukset (AAV) ja *Bocavirus*-sukuun kuuluvat

ihmisen bocavirukset 1-4. Parvovirusten joukossa on myös tärkeitä eläinten, kuten nautakarjan, sian, koiran, kissan, minkin ja laboratoriojyrsijöiden patogeeneja.

Ihmisen parvorokkovirus voi aiheuttaa erilaisia sairauksia, kuten parvorokon, niveloireita tai hematologisia komplikaatioita. Raskaudenaikainen parvorokkovirusinfektio voi aiheuttaa sikiön kuoleman. Parvovirusten isäntähakuisuuteen ja kudostropismiin voi vaikuttaa muutaman aminohapon muutos kapsidiproteiinissa. Esimerkiksi 1970-luvulla ilmaantunut Parvovirus-sukuun kuuluva koiran parvovirus (CPV) on ilmeisesti muuntunut kissan tai minkin parvoviruksesta.

AAV:ta ei pidetä ihmiselle patogeenisena, mutta vuonna 2023 AAV2 liitettiin lasten maksatulehdukseen. Taudinaiheuttajan ja taudin syy-seuraussuhde on kuitenkin edelleen epäselvä. AAV voi tarttua aerosolina, uloste-suutietä pitkin tai suoraan silmän sidekalvon kautta. Tällä hetkellä tunnetaan 13 AAV-serotyyppiä, jotka pystyvät transfektoimaan sekä jakaantumattomia että erilaistuneita ihmisen ja eri eläinlajien soluja. AAV-vektorit ovat yleisimpiä geenisiirto- ja ilmentymisvektoreita kliinisessä käytössä.

AAV kykenee replikaatioon vain auttajaviruksen avulla, jolloin kyse on yleensä adenoviruksesta tai herpes simplex -viruksesta. AAV-virukset ovat melko stabiileja ja saattavat säilyä pitkiä aikoja ympäristössä. Soluissa luonnollinen AAV toimii pääasiassa episomaalisesti. Auttajaviruksen puuttuessa AAV-provirus voi integroitua tiettyyn ihmisen kromosomin 19 alueeseen. AAV-pohjaisten virusvektorien, joista on poistettu suuri osa AAV:n genomia, ei ole osoitettu integroituvan tiettyyn krosomialueeseen, vaan integraatio on sattumanvaraista. Eläintutkimuksissa AAV-vektorien integraatoriski maksassa on arvioitu olevan 1×10^{-4} kopiota/diploidi genomi ($<0,1$ % vektorikopiota). AAV-vektorit aiheuttavat insertionaalisen mutageenisuuden takia kohonneen syöpäriskin, mutta tätä pidetään harvinaisena; nuorilla hiirillä on havaittu maksasolusyöpää AAV-kokeiden yhteydessä. Lisäksi eläintutkimuksissa korkeilla AAV-vektoremäärillä on havaittu yhteys tulehdusreaktioihin maksassa ja paikallisesti keskushermostoon annettuna selkäytimen sensorisissa hermosyissä (dorsal root ganglia).

Villityypin viruksen biologinen luokitus

Luokka 1, kun käytetään ilman adeno- tai muuta infektiivistä auttajavirusta.

Ihmisen parvovirus (B19) luokka 2. Myös eläinten parvovirukset ovat pääosin luokkaa 2 kohdelajeilleen aiheuttamansa tautiriskin vuoksi.

GM-viruksen käytön luokitus

Muuntogeeniset AAV:t, joissa ei ole mukana luonnollista adenovirusta tai muuta haitallista auttajavirusta, voidaan luokitella lähtökohtaisesti käytön luokkaan 1. Muuntogeenisen AAV:n riskit riippuvat myös siirretyn geneettisen materiaalin ominaisuuksista, jotka voivat korottaa käytön luokkaa. Jos auttajaviruksena käytetään luonnollista adenovirusta, käytön luokka on aina vähintään 2. Muissa tapauksissa riskit on arvioitava niissä käytetyn auttajaviruksen tai geeninsiirtomenetelmän perusteella.

Muut muuntogeeniset parvovirukset luokitellaan lähtökohtaisesti käytön luokkaan 2. Riskinarvioinnissa on kiinnitettävä huomiota mahdolliseen isäntäkirjon tai kudostropismin muuttumiseen. Toiminnanharjoittajan on huomioitava

riskinarvioinnissa erityisesti riski suoraan tai välilliseen leviämiseen eläimiin työntekijän kautta tai muuta reittiä.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Jos AAV-vektoria käytetään kliinisissä kokeissa, riskinarvioinnissa on huomioitava vektorin leviäminen ja mahdollinen tarttuminen hoitohenkilökuntaan tai muihin lähipiiriin ihmisiin hoitojakson päätyttyä sekä siihen liittyvä riski AAV-vektorin integroitumisesta tartunnansaajan genomiin.

Parvovirustyöskentelyssä on vältettävä aerosolien muodostumista. Raskaana olevien naisten ei pidä työskennellä B19-lajin kanssa. Parvovirusten yksinkertainen kapsidirakenne on erittäin resistentti paitsi lipidiliuottimille myös pH:lle 3-9 ja lämmölle. AAV:t ovat hyvin stabiileja eri pH:ssa ja lämpötiloissa ja ne kestävät varsin hyvin myös erilaisia tavallisia kemialliseen inaktivointiin käytettäviä aineita. Niitä voidaan inaktivoida esimerkiksi 5 % fenolilla, 1-10 % natriumhypokloriitilla, 2 % glutaraldehydillä, kuumentamalla 10 min 75 °C 0,1 % natriumdodekyylisulfaattissa (SDS) sekä emäksisillä liuoksilla, joiden pH on yli 9.

CPV-virukselle parhaiten sopivia inaktivointiaineita ovat halogeeniyhdisteet, aldehydit ja natriumhydroksidi. Suuret proteiinipitoisuudet heikentävät natriumhypokloriitin ja formaldehydin tehoa. Yli 100 °C:n lämpötila inaktivoi CPV:n nopeasti.

Adenovirukset (Adenoviridae)

Yleistä

Adenovirukset ovat vaipattomia dsDNA-viruksia, jotka aiheuttavat ihmisessä pääasiassa hengitystieinfektioita ja joskus myös vakavampia sairauksia. Ne voivat tarttua aerosolina, uloste-suureittä pitkin, suoraan silmän sidekalvon kautta ja veren välityksellä. Adenovirukset voivat infektoida sekä jakautuvia että lepotilassa olevia soluja. Niiden kudostropismi riippuu serotyypistä. Adenovirukset integroituvat isäntäsolun genomiin harvoin, ja sen vuoksi ne saavat aikaan isäntäsolussa yleensä vain väliaikaisen 1-2 viikkoa kestävänsä siirtogeenien ekspression. Adenovirukset ovat melko stabiileja ja voivat säilyä pitkään, jopa 3-8 viikkoa pinnoilla, aerosoleissa ja vedessä.

Adenovirus on yksi yleisimmin käytetyistä geeninsiirtovektoreista ja hyvin yleinen vektorirokotteissa. Adenovirusta on käytetty kuljettimena esimerkiksi ebola-, rabies-, HIV-, malaria- ja tuberkuloosirokoteaihoissa. Adenovirusvektoria käytetään myös onkolyttisessä syöpähoidossa. Adenoviruspohjaiseen covid-19-rokotteeseen on liitetty hyvin harvinainen veren hyytymishäiriön riski.

Villityypin viruksen biologinen luokitus

Luokka 2

GM-viruksen käytön luokitus

Adenovirusvektorit, joiden taudinaiheuttamiskyvyn voidaan osoittaa olevan selvästi alentunut luonnolliseen virukseen verrattuna, on mahdollista luokitella käytön

luokkaan 1. Tämä edellyttää, että viruksen on osoitettu olevan riittävästi heikennetty ja replikaatiokyvyn infektoidussa ihmisessä tai eläimessä. Myös reversiotapahtuman todennäköisyyden tulee olla alhainen. Jos muuntogeeninen virus halutaan luokitella käytön luokkaan 1, jokaisesta viruserästä tulee osoittaa, ettei siinä ole replikaatiokykyisiä viruksia, ellei käytetty tuotantomenetelmä, kuten PerC6-solulinja poissulje tätä mahdollisuutta.

Replikaatiokykyisten adenovirusvektorien käyttö mukaan lukien CRV:t (Conditionally Replicating Viruses) luokitellaan käytön luokkaan 2.

GM-adenovirusten riskinarvioinnissa on kiinnitettävä huomiota rekombinaation mahdollisuuteen, jonka seurauksena geenisekvenssejä voi siirtyä sukulaisviruksiin tai muuntogeeninen virus voi muuttua replikaatiokykyiseksi. Infektiivisiä, replikaatiokykyisiä viruksia voi syntyä rekombinaation tuloksena, jos komplementoivia sekvenssejä on virusten pakkaamiseen käytetyssä solulinjassa, infektoitavassa solulinjassa, auttajaviruksessa tai luonnollisella viruksella infektoituneessa eläimessä.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Aerosolien muodostumisen ja ilmateitse tapahtuvan leviämisen estämiseen on syytä kiinnittää huomiota myös käytön luokassa 1.

Jos käytetään replikaatiokyvyttömiä viruksia, käytössä on oltava menetelmä replikaatiokykyisten virusten mittaamiseksi. Tähän sopivat validoidut menetelmät, esimerkiksi testaus alttiissa, ei-komplementoivissa solulinjoissa.

Jos GM-viruksilla on infektoitu koe-eläimiä, on eläinten eritteissä mahdollisesti olevat infektiiviset virukset tuhottava validoidulla menetelmällä.

Adenovirukset voidaan inaktivoida esimerkiksi 1 % hypokloriitilla, 2 % glutaraldehydillä ja 0,25 % SDS:llä. Adenoviruksia inaktivoivat myös desinfektioaineet, jotka sisältävät usean tehoaineen yhdistelmän, esim. kvaternaarisia ammoniumyhdisteitä, guanidiinijohdannaisia ja alkyyliipolyamiineja sisältävä Barrydin® ja oksonia, Na-dodekyylibentseenisulfonaattia ja sulfaamihappoa sisältävä Virkon®¹. Alkoholia (etanolia) ei suositella adenoviruksen inaktivointiin, koska se vaatii pitkähkön vaikutusajan eikä tehoa orgaanisen aineen läsnäollessa. Isopropanoli ei inaktivoi adenovirusta. Adenovirukset saattavat säilyä infektiivisinä myös eetteri- ja/tai kloroformiuutoissa.

Bakulovirukset

Yleistä

Bakulovirukset ovat niveljalkaisia infektoivia dsDNA-viruksia, joita käytetään bioteknisissä sovelluksissa mm. proteiinien tuottoon hyönteis- ja nisäkässoluissa sekä hyönteisten torjuntaan. Bakulovirusvektoreista yleisimmin käytetty on Autographa californica nukleopolyhedroosivirus (AcNPV), joka infektoi ainakin 30

¹ Huom! Virkon on nykyään kerättävä erikseen eikä sitä saa laskea viemäriin.

Lepidoptera-suvun perhos- ja yökköslajeja sekä joitakin kovakuoriaislajeja aiheuttaen niille tappavan taudin. *Autographa*-suvun lajeja (metalliyökköset (gammayökköset)) esiintyy myös Suomessa. Bakulovirukset eivät ole haitallisia ihmisille.

Bakulovirusten sauvamaisen viruspartikkelin kapsidia peittää isännän solumembraanista peräisin oleva vaippa. Vaipan virusperäinen gp64-proteiini osallistuu viruksen kiinnittymiseen isäntäsoluun ja sisäänpääsyyn soluun. Infektoituneessa isäntäsolussa syntyy kahdenlaisia viruksia. Ensin kuroutuu viruspartikkeleita, jotka infektoivat viereisiä soluja. Myöhäisvaiheessa syntyy suuria määriä polyhedriiniproteiinia, joka viruspartikkelien kanssa muodostaa ns. okklusiopartikkeleita, jotka vapautuvat solujen hajotessa. Polyhedriinimatriksi mahdollistaa uusien hyönteisten infektoitumisen, sillä se lisää viruspartikkelien kestävyttä ympäristössä ja sitä tarvitaan viruksen invaasioon uusien hyönteisisäntien suolistossa.

Sen lisäksi, että bakulovirus infektoi hyönteissolulinjoja, virus transfektoi myös useiden nisäkäslajien, mukaan lukien ihmisen jakaantuvia ja ei-jakaantuvia soluja. Bakulovirus ei kuitenkaan replikoidu nisäkässoluissa, ja sen omat ekspressiosignaalit toimivat vain hyönteissoluissa. Nisäkässoluekspressioon tarkoitettussa bakulovirusvektorissa ilmennettävä geenijakso insertoidaan tyypillisesti voimakkaan nisäkässolussa toimivan viruspromootorin alle. Bakulovirusgenomi ei insertoidu isäntäsolun genomiin.

Villityypin viruksen käytön luokitus

Luokka 2 hyönteisille aiheutuvan riskin perusteella. Ihmisille ja muille eläimille riski on olematon.

GM-viruksen käytön luokitus

GM-bakulovirukset, joilta puuttuu polyhedriini tai p10, pystyvät infektoimaan soluviljelmiä, mutta eivät aiheuttamaan tautia niveljalkaisissa. Kun käytetään heikennettyä bakulovirusta, joka ei tuota okklusiopartikkeleita, viruksesta ei ole vaaraa ympäristön niveljalkaisille. Käyttö voidaan tällöin luokitella käytön luokkaan 1. Jos käytetään vähemmän heikennettyjä bakuloviruksia, jotka ympäristöön levitessään saattaisivat säilyä ja infektoida isäntiään, on tapauskohtaisesti arvioitava, kuuluuko käyttö luokkaan 2.

Bakulovirusvektoreiden mahdolliset ihmisen terveyteen kohdistuvat riskit liittyvät siirtogeenin luonteeseen. Potentiaalisesti haitallinen insertti, kuten bakteeritoksiini, onkogeeni tai kasvutekijä, saattaa nostaa käytön luokkaa. GM-bakulovirukset, joissa on nisäkässolussa toimivan promootorin säätelemiä mahdollisesti haitallisia inserttejä, voi olla tarpeen luokitella käytön luokkaan 2.

Immuunipuolustuksen komplementti inaktivoi bakuloviruksen nopeasti, mutta virus laukaisee nisäkkäissä synnynnäiseen immunitettiin kuuluvia reaktioita. Siten bakuloviruksille altistuminen voi aiheuttaa tulehdusreaktion.

Bakulovirus voidaan pseudotyyppata heterologisella viruksen glykoproteiinilla, esimerkiksi VSVg:llä. Pseudotyyppaus lisää bakuloviruksen kykyä infektoida nisäkässoluja sekä vähentää viruksen herkkyyttä komplementille. VSVg-pseudotyyppaus saattaa lisätä myös viruksen säilyvyyttä ympäristössä. Viruksen

tropismia voidaan muuttaa myös lisäämällä gp64-proteiiniin kohdesolun reseptoria sitova jakso. Tropismin muuttuminen tulee ottaa huomioon riskinarvioinnissa.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Kun käytetään bakulovirusia, joiden ekspressiosignaalit toimivat vain hyönteissoluissa ja jotka on heikennetty inaktivoimalla tai deletoimalla polyhedriini, voidaan työskennellä eristystasolla 1. Tällaiset GM-virukset, joilla ei ole polyhedriinimatriksia suojanaan, ovat villityypistä virusta herkempiä kuumuudelle ja ultraviolettivalolle ja inaktivoituvat nopeasti ympäristössä. Niiden inaktivointiin voidaan käyttää esimerkiksi etanolia. Tässäkin tapauksessa suositellaan jätteen inaktivointia.

Okklusiopartikkeli säilyy luonnossa useita viikkoja, joten polyhedriiniä tuottavat bakulovirukset ja niitä sisältävät jätteet on inaktivoitava käytön luokkansa 2 mukaisesti.

Herpesryhmän virukset

Yleistä

Herpesvirukset ovat suuria, vaipallisia DNA-virusia. Ihmisellä on yhdeksän herpesvirusta ja herpesvirusia on myös monilla eläinlajeilla. Herpesryhmän aiheuttamat infektiot ovat varsin yleisiä ja seroprevalenssi on korkea useimmille herpesviruksille. Herpesviruksille on ominaista pysyvä, latentti infektiomuoto ja ajoittaiset aktivaatioepisodit. Tyypillisiä herpesvirusten aiheuttamia tauteja ovat huuliherpes ja sukuelinten herpes, vesirokko ja vyöruusu. Herpesvirusten aiheuttamia infektioita on helppo diagnosoida, ja ne voidaan pääosin hoitaa viruslääkkeillä. Joitakin herpesryhmän virusia ja vyöruusua vastaan on olemassa rokote.

Herpesvirusia muokataan sekä herpesvirusten elinkierron tutkimiseksi että virusvektori käyttöön. Herpesviruspohjaisia vektoreita on saatavina kaupallisesti. Herpes simplex -viruksesta on kehitetty ihomelanooman hoitoon lääkevirus (T-vec), josta on poistettu neurovirulenssigeeni ja immuuniväistökijä. HSV-DNA ei integroidu genomiin ja siinä on luontaisesti lääkeherkkyysgeeni (tymidiinikinaasi), jotka ovat turvallisuustekijöitä HSV-vektoreita käytettäessä.

Villityypin viruksen biologinen luokitus

Luokka 2

GM-viruksen käytön luokitus

Luokka 2 ellei ole osoitettu, että virus on replikaatiokyvytön. Plasmidimuodossa oleva virusvektori (*E. coli* -bakteeri isäntänä) ei ole infektiivinen, ja se voidaan luokitella käytön luokkaan 1.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Myös luokkaan 1 kuuluvat virusjätteet on inaktivoitava todennetulla tavalla. Raskaana

olevien työskentelyssä pitää noudattaa erityistä varovaisuutta, koska akuutti herpesvirusinfektio on vaarallinen sikiönkehitykselle ja vastasyntyneelle.

Vaipallisina viruksina herpesvirukset inaktivoituvat helposti yleisillä desinfektioaineilla (esim. 70 % etanoli pintojen ja käsien desinfektiossa), ja ne ovat suhteellisen herkkiä kuivumiselle. Ne voivat kuitenkin säilyä erityisesti kylmähuoneessa useita päiviä esimerkiksi kasvatusmediumissa tai muussa proteiinipitoisessa materiaalissa.

Herpesvirukset ovat hyvin lajispesifejä, joten niiden leviäminen muihin lajeihin on epätodennäköistä. Muokatuista viruksista on yleensä poistettu viruksen patogeeniteesiin ja virulenssiin liittyviä geenejä, mikä vähentää niiden infektiivisyyttä ja replikaatiokykyä.

Influenssavirukset

Yleistä

Influenssavirukset ovat vaipallisia RNA-viruksia, joiden genomi koostuu kahdeksasta erillisestä geenejä sisältävästä RNA-palasta. Niille on tyypillistä, että RNA-paloja voi vaihtua eri viruskantojen välillä (reassortatio). Tämän lisäksi virus muuntuu pistemutaatioiden kautta. Erityisen merkittäviä nämä muutokset ovat silloin, jos ne kohdistuvat viruksen pintaproteiineihin, hemagglutiniiniin ja neuraminidaasiin. Eri eläimillä voi esiintyä sama influenssaviruksen alatyyppejä, mikä voi johtaa uusien virusmuotojen syntyyn ja jopa pandemiaan. Influenssavirusta esiintyy kausiluonteisesti ja sitä vastaan kehitetään vuosittain kausi-influenssarokote. Virusta vastaan on tehokkaita lääkkeitä, jos infektiota diagnosoidaan infektion alkuvaiheessa.

Influenssavirusten geenifunktioita voidaan muokata muokkaamalla erillisiä plasmidimuotoon kloonattuja RNA-paloja *in vitro*. Rekombinanttiviruksia tuotetaan transfektoimalla kaikki kahdeksan RNA-palaa samaan soluun plasmidimuodossa siten, että niistä transkriptoituu RNA:ta, joka toimii viruksen tavoin tuottaen infektiivisen viruksen.

Villityypin viruksen luokitus

Kausi-influenssa luokka 2, lintuinfluenssa luokka 3.

GM-viruksen käytön luokitus

Lähtökohtaisesti muuntamattoman viruksen luokituksen mukainen.

Plasmidimuodossa oleva virusvektori (*E. coli* -bakteeri isäntänä) ei ole infektiivinen, ja se voidaan luokitella käytön luokkaan 1.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Myös luokkaan 1 kuuluvat GM-virusjätteet on inaktivoitava todennetulla tavalla.

Vaipallisina viruksina influenssavirukset inaktivoituvat helposti yleisillä desinfektioaineilla (esim. 70 % etanoli pintojen ja käsien desinfektiossa) ja ne ovat suhteellisen herkkiä kuivumiselle. Virukset voivat kuitenkin säilyä erityisesti

kylmähuoneessa useita päiviä esimerkiksi kasvatusmediumissa tai muussa proteiinipitoisessa materiaalissa.

Viruksia muokattaessa on kiinnitettävä erityistä huomioita viruksen alatyyppeihin ja sen luontaiseen kykyyn infektoida eri eläinlajeja. Muokkauksen vaikutusta viruksen patogeenisuuteen pitää tarkastella huomioiden alatyypin pandeeminen potentiaali. Influenssavirusten suuren muuntumiskyvyn takia toiminnassa on kiinnitettävä erityistä huomioitava GM-viruksen ympäristöön leviämisen estämiseen.

Koska virusta vastaan on tehokas rokote, on huolehdittava, että työntekijöillä on ajantasainen ohjeistus rokotteiden saatavuudesta ja että uudet työntekijät perehdytetään rokotuksia koskevaan ohjeistukseen.

Koronavirukset

Yleistä

Koronavirukset ovat vaipallisia RNA-viruksia. Koronaviruksiin kuuluu sekä ihmisen että eläinten taudinaiheuttajia. Koronavirukset ovat varsin lajispesifisiä, mutta siirtymiä lajien välillä on havaittu, ja oletettavasti ihmisen koronavirukset ovat alun perin siirtyneet ihmisiin muista eläimistä. Ihmisissä eri koronaviruslajit aiheuttavat sekä lieviä että vakavia tauteja, mikä vaikuttaa niiden luokitukseen. Ihmisen eri koronavirukset myös leviävät eri tavalla ihmisten välillä. Koronavirukset ovat yleisiä ja niiden tyypillinen taudinkuva on nuhakuume. Koronavirukset ovat herkkiä muuntumaan. Tästä hyvä esimerkki on covid-19-pandemian aiheuttanut SARS-CoV-2, josta on tunnistettu kymmeniä eri virusvariantteja. SARS-CoV-2-virusta vastaan on olemassa rokotteita ja lääkkeitä.

Villityypin viruksen luokitus

Luokitus perustuu viruksen infektiivisyyteen ja taudinaiheutuskykyyn. SARS, SARS-2 ja MERS luokka 3. Muut luokka 2.

GM-viruksen käytön luokitus

SARS, SARS-2 ja MERS luokka 3. Muut GM-koronavirukset luokka 2. Plasmidimuodossa oleva virus-cDNA tai virusvektori *E. coli* -isännässä ei ole infektiivinen, ja se voidaan luokitella käytön luokkaan 1.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. SARS-2-viruksen diagnostisia näytteitä voidaan käsitellä eristystason 2 tiloissa, mutta virukset on kasvatettava eristystason 3 tiloissa. Myös luokkaan 1 kuuluvat GM-virusjätteet on inaktivoitava todennettavalla tavalla.

Vaipallisina viruksina koronavirukset inaktivoituvat helposti yleisillä desinfektioaineilla, esimerkiksi 70 % etanolia voidaan käyttää pintojen ja käsien desinfiointiin. Koronavirukset ovat suhteellisen herkkiä kuivumiselle, mutta ne voivat säilyä esimerkiksi kasvatusalustalla useita päiviä.

Viruksia muokattaessa on kiinnitettävä erityistä huomioita viruksen tyyppiin ja sen luontaiseen infektiokykyyn ja kykyyn infektoida eri eläinlajeja. Muokkauksen

vaikutusta viruksen patogeenisuuteen pitää tarkastella huomioiden tyypin pandeeminen potentiaali ja rokotevaste.

SARS-2-virusta vastaan on tehokas rokote, ja siksi on huolehdittava, että työntekijöillä on ajantasainen ohjeistus rokotteiden saatavuudesta ja että uudet työntekijät perehdytetään rokotuksia koskevaan ohjeistukseen.

Lentivirukset (HIV, FIV, SIV)

Yleistä

Lentivirukset ovat retroviruksiin kuuluvia vaipallisia RNA-virusia. Tyypillinen muokattava lentivirus on HIV-1, jonka aiheuttama krooninen infektiota johtaa immuunikatoon (AIDS) ja kuolemaan ilman lääkitystä. Taudin kulkua voidaan hidastaa merkittävästi lääkityksellä, mutta tautia ei voida parantaa, eikä sitä vastaan ole rokotetta.

Lentiviruksia käytetään yleisesti geenisiirron kuljettimina. Lentiviruspohjaiset virukset infektoivat sekä jakaantuvia että jakaantumattomia soluja, ja niiden kuljettama siirtogeeni integroituu genomiin, jolloin saavutetaan stabiili geeniekspressio.

Lentiviruksista eniten käytetään HIV-1-pohjaisia vektoreita, mutta myös HIV-2, SIV (Simian Immunodeficiency Virus) ja FIV (Feline Immunodeficiency Virus) -pohjaisia vektoreita on käytössä. Niiden kohdalla käytetään soveltuvien osin HIV-1-pohjaisia vektoreita koskevaa ohjeistusta.

Villityypin viruksen biologinen luokitus

Luokka 3.

GM-viruksen käytön luokitus

Muuntogeeniset HIV ja SIV kuuluvat käytön luokkaan 3, ellei ole osoitusta siitä, että niiden infektiota tai taudinaiheuttamiskyky on selvästi alentunut. FIV kuuluu eläimiin kohdistuvien riskien osalta luokkaan 3. Ihmiseen kohdistuvat terveysriskit ovat vähäisiä tai olemattomia.

Tarvittavat toimenpiteet

Infektiivisillä HI- ja SI-virusilla työskennellään aina eristystasolla 3. Jos lentiviruksen perimään liitetyn geenin integroituminen solun genomiin saattaa aiheuttaa haitallisia vaikutuksia tai mahdollisia vaikutuksia ei voida luotettavasti arvioida, on harkittava, tarvitaanko tehostettuja riskinhallintatoimenpiteitä roiskeilta, aerosoleilta ja haavoilta suojautumiseksi.

Kun käytössä on replikaatiokykyistä virusta sisältävää materiaalia, on varauduttava siihen, että onnettomuustapauksissa estolääkitys voidaan aloittaa tarvittaessa mahdollisimman nopeasti. On osoitettu, että ajoissa aloitettu estolääkitys vähentää HIV-infektion todennäköisyyttä.

Vaipallisina virusina lentivirukset inaktivoituvat helposti yleisillä desinfektioaineilla (esim. 70 % etanoli pintojen ja käsien desinfektiossa), ja ne ovat suhteellisen herkkiä

kuivumiselle. Virus voi kuitenkin säilyä useita päiviä esim. kasvatusmediumissa tai muussa proteiinipitoisessa materiaalissa, erityisesti kylmähuoneessa. Viruksen pseudotyyppauksella saattaa olla virusta stabiloiva vaikutus, mikä on otettava huomioon arvioitaessa mahdollisia altistumistapoja esim. virusta sisältäviä näytteitä käsiteltäessä, mukaan lukien infektoiduista eläimistä otetut näytteet.

Kun lentiviruksella infektoitu materiaali on inaktivoitu esimerkiksi fiksaamalla siten, ettei se enää sisällä infektiivisiä viruksia, voidaan työskennellä eristystasolla 1.

1. HIV-1-pohjaiset vektorisysteemit

Käytön luokitus eri tilanteissa

Pääasialliset riskit HIV-1-pohjaisten vektorien käytössä ovat replikaatiokykyisten virusten muodostuminen ja mahdolliset onkogeeniset vaikutukset, jotka johtuvat siirtogeenin ekspressiosta tai vektorikasetin integraatiotapahtumasta. Riskeihin vaikuttavat käytetyn vektorisysteemin bioturvallisuutta lisäävät muokkaukset ja vektoriin insertoidun sekvenssin tuottaman proteiinin aktiivisuus. Riskinarvioinnissa on otettava huomioon pseudotyyppauksen aiheuttamat vaikutukset, kuten kudostropismi ja stabiilisuus. Lisäksi on huomioitava viruksen kohdesolu tai -kudos ja viruksen pintarakenteiden muutosten vaikutus komplementin toimintaan. Jos työssä käytetään kantasoluja tai potilasmateriaalia, on varmistettava, että tällainen kudostai solumateriaali ei sisällä HI-virusta.

HIV-virusvektoreista on kehitetty useita sukupolvia, ja on suositeltavaa käyttää vähintään kolmannen sukupolven plasmidisysteemiä. Kolmannen sukupolven systeemeissä siirtogeeniä koodaava siirtoplasmidi ja plasmidin pakkausproteiinit koodataan neljästä erillisestä plasmidista, jotka eivät sisällä päällekkäistä sekvenssiä. Menetelmä lisää käytön biologista turvallisuutta. Yleensä tällaiset lentivektorit ovat ns. SIN-vektoreita (self-inactivating), joissa siirtoplasmidin replikaatio on estetty poistamalla siitä tietyt säätelyalueet. Lentivirusvektoriartikkelit kohdistetaan tiettyyn soluun pseudotyyppityksellä, jossa yksi systeemin plasmideista koodaa heterologista vaippaproteiinia, kuten vesikulaarisen stomatiittiviruksen glykoproteiinia (VSV-g).

Infektiiviset lentivirusvektorit ja pseudotyyppitetty virusvektorit kuuluvat aina vähintään käytön luokkaan 2, vaikka olisi osoitettu, ettei virusvektori sisällä replikaatiokykyisiä viruksia. Lentivirusvektorilla infektoitu materiaali, kuten solulinja, kuuluu pääsääntöisesti käytön luokkaan 2, ennen kuin on osoitettu, että infektoitu materiaali on vapaa lentiviruspartikkeleista. Tämän jälkeen voidaan siirtää työskentelemään eristystason 1 tiloissa. Eristystason 2 tilojen käyttö ja riskinhallintatoimenpiteiden noudattaminen on kuitenkin tarpeellista, jos vektorin kuljettaman geenin integroitumisesta genomiin aiheutuvat haittavaikutukset ovat mahdollisia tai vaikutuksia ei voida luotettavasti arvioida. Riskiä lisääviä siirtogeeniä ovat esimerkiksi onkogeeneja, tuumorisuppressoria inaktivoivaa siRNA:ta koodaavat geenit ja toksinigeenit.

Lentiviruspartikkelit voidaan tunnistaa viljelmän supernatantista esimerkiksi p24-ELISA:lla (antigeenitestillä kapsidiproteiinille) tai kvantitatiivisella PCR-menetelmällä (Scherr et al. 2001; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11570495/>). Positiivisena kontrollina voidaan käyttää infektiopäivän supernatanttia ja negatiivisena infektoimattoman viljelmän supernatanttia. Viljelämä muuttuu negatiiviseksi usein

vasta kolmannen siirrostuksen jälkeen. Kun on luotettavasti osoitettu, ettei viljelmä sisällä infektiivisiä viruksia, käyttö voidaan luokitella luokkaan 1.

Kaikki jätteet on inaktivoitava, vaikka infektoidun materiaalin olisi osoitettu kuuluvan luokkaan 1.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Koska HIV-pohjaisen viruksen joutuminen elimistöön veriteitse, limakalvon tai rikkoutuneen ihon kautta altistaa infektiolle, on minimoitava haavojen, roiskeiden ja aerosolien syntymisen mahdollisuus. Suojatoimenpiteet määräytyvät toiminnan luonteen perusteella. Terävien ja rikkoutuvien esineiden käyttöä on ensisijaisesti vältettävä. Jos se ei ole mahdollista, työntekijät on ohjeistettava niiden turvalliseen käyttöön, ja koulutus on dokumentoitava. Viruksia ei saa käsitellä avonaisissa astioissa laminaarikaapin ulkopuolella. Suun, nenän ja silmien suojaamiseksi roiskeilta ja aerosoleilta on tarvittaessa käytettävä henkilökohtaisia suojaimia. Työskentelyssä on käytettävä suojakäsineitä. Luokkaan 2 kuuluvilla HIV-konstrukteilla ei pidä työskennellä, jos käsien iho on selvästi vaurioitunut (esim. haavat ja ihottuma).

Tiloissa on oltava kulunvalvonta, tai tilan käyttäjät ja käyttöajat on kirjattava. Kirjattavaksi suositellaan kokeessa käytetyt organismit ja virusten pitoisuudet. Infektoitaessa eläimiä lentivirusvektoreilla on noudatettava eristystason 2 toimenpiteitä työntekijän altistumisriskin minimoimiseksi. Lentivirus ei replikoidu jyrsijöissä, joten niiden ylläpito voidaan siirtää eristystason 1 tiloihin muutaman päivän kuluttua infektoinnista, kunhan infektoimiskohta puhdistetaan huolellisesti ja eläimet siirretään puhtaisiin häkkeihin. HI-viruksen replikoituminen on kuitenkin mahdollista eläimissä, joihin on siirretty ihmiskudosta tai muuta HI-virukselle permissiivistä kudosta. Infektoitaessa tällaisia eläimiä lentivirusvektorilla on toimittava vähintään eristystasolla 2.

Vaipallisina viruksina lentivirukset inaktivoituvat helposti yleisillä desinfektioaineilla esimerkiksi 70 % etanoli sopii pintojen ja käsien desinfiointiin. Lentivirukset ovat suhteellisen herkkiä kuivumiselle. Ne voivat kuitenkin säilyä erityisesti kylmähuoneessa useita päiviä esimerkiksi kasvatusmediumissa tai muussa proteiinipitoisessa materiaalissa. Viruksen pseudotyyppauksella saattaa olla virusta stabiloiva vaikutus. Se on otettava huomioon arvioitaessa mahdollisia altistumistapoja esimerkiksi infektoiduista eläimistä otettujen tai muiden näytteiden käsittelyssä.

2. FIV-pohjaiset vektorisysteemit (Feline Immunodeficiency Virus)

GM-viruksen käytön luokitus

Muuntogeenisten FIV-vektorien luokituksessa on eläintautiriskin lisäksi otettava huomioon, mitä yllä on mainittu lentivirusvektorien pseudotyyppauksesta ja inserttien vaikutuksesta luokitukseen.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Ihmissoluja infektoivien pseudotyyppattujen FIV-vektorien osalta noudatetaan samanlaisia

turvatoimia kuin käytettäessä HIV-pohjaisia vektoreita. FIV-vektorit on tuotettava kolmen plasmidin yhteistransfektioilla. Lisääntymiskykyisen viruksen puuttuminen on osoitettava valmiista viruspreparaatista myös FIV-vektoreita käytettäessä.

Kun käytetään FIV-vektoreita, jotka kykenevät infektoimaan kissaeläimiä ja replikoitumaan niissä, on riskinarvioinnissa kiinnitettävä erityistä huomioitava mahdollisuuteen, että virus pääsisi kosketuksiin isäntäeläimen kanssa. Jos riskinarvioinnissa tunnistetaan tällainen GM-viruksen leviämisen mahdollistava vaaratilanne, työskentelytavat ja jätteiden inaktivointi on toteutettava siten, ettei eläintautiriskiä pääse syntymään.

Papilloomavirukset (Papillomaviridae)

Yleistä

Papilloomavirukset ovat vaipattomia dsDNA-viruksia, jotka infektoivat vain ihon tai limakalvojen epiteelisoluja ja aiheuttavat ihmisessä mm. ihosyyliä, kurkunpään papilloomia sekä sukuelinten visvasyyliä. Papilloomavirukset ovat osallisena myös useiden kasvainten ja syöpien, kuten kohdunkaulasyövän synnyssä. Ihmisen papilloomavirusten ei tiedetä infektoivan muita eläinlajeja.

Papilloomavirukset voivat integroitua isäntäsolun genomiin erityisesti vakavissa epiteelimuutoksissa ja syövässä. Papilloomavirus vaatii replikoituakseen pitkälle erilaistuneen epiteelisolun, joita ei voida kasvattaa soluviljelmissä. Tavanomainen kokeellinen infektiopapilloomaviruksilla ei ole mahdollinen. Kolmiulotteisissa soluviljelymalleissa voidaan tuottaa kohtalaisia määriä papilloomavirusta. Useat yleisesti käytössä olevat jatkosolulinjat, kuten HeLa-, CaSki- ja SiHa-linjat ovat peräisin papilloomaviruksen aiheuttamista syövästä, ja ne sisältävät papilloomaviruksen genomiosia. Virus ei kuitenkaan voi replikoitua näissä solulinjoissa, eikä niissä voi syntyä infektiivisiä viruspartikkeleita.

Villityypin viruksen biologinen luokitus

Luokka 2

GM-viruksen käytön luokitus

Lähtökohtaisesti luokka 2.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Muuntogeenisten papilloomavirusten replikaatio-ominaisuudet ovat verrattavissa villityypin papilloomaviruksiin. Papilloomavirukset ovat immunokompetenteilla henkilöillä hyvin kudosspesifisiä, ja iholla ja limakalvoilla esiintyy eri virustyypppejä. Terveysriskejä ei voida kuitenkaan täysin sulkea pois tilanteissa, joissa virusta joutuisi työntekijän elimistöön esimerkiksi haavan kautta, joten papilloomaviruspartikkeleilla ei pidä työskennellä, jos iho on rikkoutunut.

Työskentelyssä on huolehdittava asianmukaisesta suojavaatetuksesta ja vältettävä mahdollisuuksien mukaan terävien esineiden käyttöä.

Pikornavirukset

Yleistä

Pikornavirukset ovat pieniä, pallomaisia ja vaipattomia RNA-viruksia. Ne ovat yleisimpiä ihmisen taudinaiheuttajia. Tunnettuja pikornaviruksia ovat muun muassa poliovirus, rinovirus, enterovirus ja parechovirus. Pikornaviruksia on tavattu liki kaikissa tutkituissa eläimissä. Pikornavirustyyppejä tunnetaan paljon ja ristisuoja on pieni. Pikornavirusinfektio on ohimenevä ja immunititeettijärjestelmä poistaa viruksen elimistöstä tehokkaasti. Tyypillisiä pikornavirusten aiheuttamia sairauksia ovat nuhakuume, enterorokko ja aivokalvontulehdus. Pikornaviruksia vastaan ei ole lääkkeitä tai rokotteita lukuunottamatta polioviruksia ja hepatiitti A -virusta. Pikornaviruksia on testattu lääkeviruksina syövän hoidossa. Tutkimuskäytössä on muuntamattomia soluadaptoituja pikornaviruksia, sekä muuntogeenisiä viruksia.

Villityypin viruksen luokitus

Luokka 2

GM-viruksen käytön luokitus

cDNA-muodossa eli plasmidina oleva virusgenomin sisältävä pikornavirusvektori kuuluu luokkaan 1, koska se ei ole infektiivinen, käyttäytyy plasmidin tavoin eikä ekspressoidu luontaisesti ihmissoluissa ilman sopivia promoottereita. Kun tällaisesta vektorista tuotetaan virus tai jos cDNA-vektorissa olevaa genomia muokataan esimerkiksi mutatoimalla tai vaihtamalla virusten osia keskenään, tuotettu virus kuuluu luokkaan 2. Pikornaviruksista tuotettu VLP-partikkeli (virus-like particle) ei ole muuntogeeninen organismi, koska se ei sisällä virusgenomia eikä ole infektiivinen.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Jos pikornavirusvektoria käytetään kliinisissä kokeissa, riskinarvioinnissa on huomioitava mahdollinen vektorin leviäminen hoitohenkilökuntaan tai koehenkilön lähipiiriin ihmisiin hoitojakson päätyttyä. Pikornavirusten yksinkertainen kapsidirakenne on erittäin stabiili, ja virus säilyy pinnoilla infektiivisenä päiviä. Enteroviruspartikkeli kestää erittäin matalaa pH:ta (2,5). Virus voidaan inaktivoida lämpökäsittelyllä (yli 56 °C, 30 min), mutta varmempi tapa on käsitellä materiaalit Virkonilla², Oxivirilla tai 10 % natriumhypokloriitilla. Etanoli ei tuhoa pikornavirusrakennetta.

Retrovirukset (muut kuin lentivirukset)

Yleistä

Retrovirukset ovat vaipallisia viruksia, joiden genomi koostuu kahdesta positiivisäikeisestä RNA-molekyylistä. Viruksen käänteiskopioijaentsyymi kääntää

² Huom! Virkon on nykyään kerättävä erikseen eikä sitä saa laskea viemäriin.

virus-RNA:n DNA:ksi. Syntyvä DNA-provirus kiinnittyy isäntäsolun perimään, jossa se toimii transkriptiossa templaattina virus-mRNA:lle. Virusgenomeja reunustavat pitkät toistoalueet (LTR) sisältävät viruksen ekspressiota säätelevät promootori- ja tehostajajaksot (U3). Kaikki retrovirukset sisältävät rakenneproteiineja koodaavan gag-geeniklusterin, käänteistranskriptaasia ja integraasia koodaavan pol-alueen ja vaipan glykoproteiineja koodaavan env-alueen. Lisäksi joillakin retrovirusryhmillä on replikaatiota tehostavia ja muokkaavia proteiineja koodaavia geenijaksoja, jotka voivat vaikuttaa patogeenisuuteen.

Useat retrovirukset ovat onkogeenisia, koska ne voivat aiheuttaa insertiomutageneesiä tai koska isäntäsolun genomien DNA:ta on integroitunut viruksen RNA-genomiin. Jälkimmäinen tapahtuma johtaa yleensä defektiiviseen, mutta akuutisti transfektiokykyiseen kantaan, joka tarvitsee replikaatioonsa helper-virusta. Retrovirukset leviävät yleensä altistuttaessa ruumiinnesteille tai neulanpiston välityksellä. Useimmat näistä viruksista ovat voimakkaasti immunogeenisiä, mutta isännän immunitetti yleensä paremminkin suppressoi replikaatiota kuin puhdistaa infektion kokonaan.

Laboratoriokäytössä käytetään hiiren (MoMLV), lintujen (ALV) ja kissan (FeLV) retroviruksia.

Villityypin retroviruksen biologinen luokitus

Muut kuin kädellisten retrovirukset eivät ole yleensä patogeenisia ihmiselle, joten niiden käytön luokka on lähtökohtaisesti 1. Jos retrovirus voi aiheuttaa eläintauteja, sen riskiluokitus voi olla korkeampi. Esimerkiksi naudon leukemiavirus BLV kuuluu luokkaan 2 ja hevosen infektiivinen anemiavirus EIAV luokkaan 3.

GM-viruksen käytön luokitus

Pääasialliset riskit retroviruspohjaisten vektorien käytössä ovat replikaatiokykyisten virusten muodostuminen ja mahdolliset onkogeeniset vaikutukset, jotka johtuvat siirtogeenin ekspressiosta tai vektorikasetin integraatiotapahtumasta. Riskeihin vaikuttavat käytetyn vektorisysteemin bioturvallisuutta lisäävät modifikaatiot ja vektoriin insertoidun sekvenssin luonne. Riskinarvioinnissa on otettava huomioon pseudotyyppauksen aiheuttamat vaikutukset (kudostropismi, stabiilisuus) ja se, että muutokset viruksen pintarakenteissa voivat vaikuttaa viruksen herkkyyteen komplementille. Ihmiseen kohdistuvien terveystarkastelujen lisäksi on tarkasteltava eläintautiriskiä, jos muuntogeeninen virus pääsisi leviämään suljetun käytön tilojen ulkopuolelle.

Kolmen plasmidin yhteiskäyttö on suositeltavaa, kun käytetään onkogeenisia retrovirusvektoreita, kuten ALV ja MOMLV. Alun perin ekotrooppisten eli pelkästään jyrsijöitä infektoivien retrovirusvektoreiden isäntäkirjoa voidaan laajentaa pseudotyyppityksellä, jossa Env-proteiini korvataan jollain toisella vaippaproteiinilla. Esimerkiksi kun pseudotyyppityksessä käytetään vesikulaarisen stomatiittiviruksen glykoproteiinia (VSVg), syntyy amfotrooppisia viruksia, jotka infektoivat ihmiset mukaan lukien useita nisäkäslajeja. Ksenotrooppiset virukset infektoivat mm. ihmisen mutta eivät jyrsijöiden soluja. SIN (self inactivating) -systeemiä käyttämällä voidaan vähentää siirtoplasmidin trans-aktivaation riskiä. GM-retrovirusten valmistuksessa on

käytettävä pakkaussolulinjoja, jotka on kehitetty siten, että replikaatiokykyisen viruksen syntyminen rekombinaatiotapahtuman välityksellä on lähes mahdotonta.

Replikaatiokyvystä riippumatta retrovirukset, jotka voivat infektoida ihmisoluja, kuuluvat aina vähintään käytön luokkaan 2. Siirretyn insertin ominaisuudet voivat nostaa luokitusta. Riskiä lisääviä geenejä ovat esimerkiksi onkogeeneit, tuumorisuppressoria inaktivoivaa siRNA:ta koodaavat geenit ja toksinigeenit.

Replikaatiokyvyttömillä ekotrooppisilla retrovirusvektoreilla (poislukien kädellisten retroviruksiin pohjautuvat vektorit) työskentely kuuluu pääsääntöisesti käytön luokkaan 1, ellei siirretty insertti tai eläintautiriski nosta käytön luokitusta. Jos ekotrooppisten retrovirusten replikaatiokyvyttömyyttä ei ole osoitettu, niiden käyttö luokitellaan eläintautiriskin mukaiseen käytön luokkaan, ellei insertti vaikuta käytön luokitukseen.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa.

Käytettäessä amfo- tai ksenotrooppisia retroviruksia, jotka voivat infektoida ihmisoluja, jokainen rekombinantiviruserä on testattava sitä varten kehitettyjen erityisten solulinjojen tai muun luotettavan testisysteemin avulla replikaatiokykyisten virusten poissulkemiseksi. Positiivisena kontrollina voidaan käyttää infektiopäivän supernatanttia ja negatiivisena infektoimattoman viljelmän supernatanttia. Viljelämä muuttuu negatiiviseksi usein vasta kolmannen siirrostuksen jälkeen.

Jos retroviruksen kuljettaman geenin integroituminen genomiin saattaa aiheuttaa haitallisia vaikutuksia tai mahdollisia vaikutuksia ei voida luotettavasti arvioida, työskentelyssä on noudatettava eristystason 2 vaatimuksia toiminnan luonteen mukaisesti. Työskenneltäessä amfo- tai ksenotrooppisilla retroviruksilla on ensisijaisesti vältettävä terävien ja rikkoutuvien esineiden käyttöä. Jos se ei ole mahdollista, työnteekijät on ohjeistettava niiden turvalliseen käyttöön, ja koulutus on dokumentoitava. Viruksia ei saa käsitellä avonaisissa astioissa laminaarikaapin ulkopuolella. Suun, nenän ja silmien suojaamiseksi roiskeilta ja aerosoleilta on tarvittaessa käytettävä henkilökohtaisia suojaimia, ja työskentelyssä on käytettävä suojakäsineitä. Tiloissa on oltava kulunvalvonta, tai tilan käyttäjät ja käyttöajat on kirjattava. Kirjattavaksi suositellaan kokeessa käytetyt organismit ja virusten pitoisuudet (tiitterit).

Kun valmiista ekotrooppisesta viruserästä on testattu, ettei se sisällä replikaatiokykyisiä viruksia, käytön katsotaan täyttävän suljetun käytön luokan 1 edellytykset. Jätteet on tällöinkin inaktivoitava.

Kun on osoitettu, ettei eko- tai amfotrooppisilla retroviruksilla infektoiduissa solulinjoissa synny replikaatiokysyisiä viruksia, niillä voidaan työskennellä

soluviljelyn vaatimia suojatoimenpiteitä noudattaen eristystasolla 1. Jätteet on tällöinkin inaktivoitava.

Kun infektoidut solulinjat lyysataan tai fiksataan, niillä voidaan työskennellä eristystasolla 1 riippumatta siitä, millaisia infektiioon käytetyt retrovirukset ovat isäntäspesifisyytensä tai replikaatiokykynsä suhteen.

Infektoitaessa eläimiä sellaisilla amfo- tai ksenotrooppisilla retrovirusvektoreilla, jotka voivat infektoida myös ihmisoluja, on noudatettava eristystason 2 toimenpiteitä henkilökunnan altistumisriskin minimoimiseksi. Eläin voidaan siirtää eristystason 1 tiloihin muutaman päivän kuluttua infektoinnista, jos käytettävä retrovirus ei voi replikoitua koe-eläimessä. Siirron yhteydessä infektoimiskohta puhdistetaan huolellisesti ja eläimet siirretään puhtaisiin häkkeihin. Koe-eläinten eritteitä ei tarvitse tarkistaa, sillä niistä ei löydy infektiivisiä rekombinanttiviruksia.

Infektoitaessa eläimiä ekotrooppisilla replikaatiokykyisillä retroviruksilla (poislukien kädellisten retrovirukset) noudatetaan eläintautiriskin mukaista eristystasoa. Jos voidaan luotettavasti osoittaa, ettei ekotrooppisilla retroviruksilla infektoiduissa eläimissä synny replikaatiokykyisiä viruksia, niillä voidaan työskennellä eristystasolla 1.

Retrovirukset ovat herkkiä kuivumiselle ja inaktivoituvat nopeasti isäntäsolun ulkopuolella, mutta ne voivat toisaalta säilyä pitkiä aikoja proteiinipitoisessa materiaalissa kuten kasvatusmediumissa. Vaipallisina viruksina ne inaktivoituvat helposti yleisillä desinfektioaineilla (esim. 70 % etanoli pintojen ja käsien desinfektiossa). Viruksen pseudotyyppauksella saattaa olla virusta stabiloiva vaikutus, mikä on otettava huomioon arvioitaessa mahdollisia altistumistapoja esimerkiksi infektoiduista eläimistä otettujen tai muiden näytteiden käsittelyssä.

Sendai-virus

Yleistä

Jyrsijöiden hengitystieinfektioita aiheuttava Sendai-virus kuuluu *Paramyxoviridae*-heimoon kuuluvaan respirovirusten sukuun. Samaan sukuun kuuluu ihmisen viruksista parainfluenssavirukset 1 ja 3.

Sendai-virus on kookas, läpimitaltaan 150-250 nm vaipallinen virus, jonka genomi koostuu yhdestä negatiivissäikeisestä RNA-molekyylistä. Sendai-virus tunnetaan nykyään nimellä murine respirovirus (jyrsijöiden respirovirus) mutta aiempi nimi on edelleen yleisesti käytössä. Muita viruksesta aiemmin käytettyjä nimiä ovat murine parainfluenza virus type 1 sekä hemagglutinating virus of Japan (HVJ).

Sendai-virus tarttuu helposti aerosolien ja hengitystie-eritteiden välityksellä ja sen tiedetään aiheuttavan hengitystieinfektioita ainakin hiirillä, rotilla, hamstereilla ja marsuilla. Eri hiiri- ja rottakantojen herkkyyden Sendai-virusinfektioille tiedetään eroavan. Esimerkiksi hiiristä C57BL/6-kanta on erittäin resistentti, kun taas 129/J- ja DBA/2J-kannat ovat erittäin sensitiivisiä. Sendai-virusinfektioiden on raportoitu

olevan yleisiä lemmikkihiirillä ja -rotilla, mutta immunokompetenteilla eläimillä infektiot paranevat yleensä luontaisesti ilman hoitoa.

Sendai-viruksen genomi koodaa kuutta proteiinia: nukleokapsidiproteiini NP, RNA-polymeraasin pieni alayksikkö fosfoproteiini P, RNA-polymeraasin suuri alayksikkö L, tarttumis- ja hemagglutiniiniproteiini HN sekä fuusioproteiini F. Sendai-virus infektoi soluja siaalihapporeseptorin välityksellä. Siaalihapporeseptori on hyvin yleinen ja konservoitunut solupinnan reseptori ja siksi Sendai-virus pystyy infektoimaan erilaisia eläinsoluja.

Sendai-viruksen ei tiedetä olevan ihmisille patogeeninen, mutta se pystyy helposti infektoimaan ihmisen soluja soluviljelyolosuhteissa. Sendai-virus ei integroidu isäntäsolun genomiin ja se replikoituu sytoplasmassa käyttäen omaa RNA polymeraasiaan.

Villityypin viruksen biologinen luokitus

Luokka 2

GM-viruksen käytön luokitus

Sendai-virusta pidetään ihmiselle erittäin turvallisena, eikä sen tiedetä aiheuttaneen ihmiselle mitään tautia. Sendai-virusta on käytetty muiden Paramyxoviridae-heimon ihmispatogeenien rokotteiden kehitykseen (mm. RS-virus, parainfluenssa 1), mutta myös HIV-rokotteiden kehityksessä. Muunnettuja, replikaatiokyvyttömiä Sendai-virusvektoreita käytetään yleisesti etenkin indusoitujen pluripotenttien kantasolujen (iPSC) tuottoon.

Sendai-virusten avulla uudelleen ohjelmoidut solut eivät itsessään ole muuntogeenisiä, sillä virukset eivät integroidu isäntäsolun genomiin. Sendai-virusvektorit voivat säilyä soluissa solulinjasta riippuen jopa yli 10 pasaasin ajan. PCR- tai vasta-ainetestillä voidaan osoittaa, ettei soluissa enää ole Sendai-virusta.

Sendai-viruksen käyttö on huomioitava koe-eläintyöskentelyssä, sillä se voi aiheuttaa jyrksijöillä keuhkomuutosten lisäksi hedelmättömyyttä sekä altistaa muille infektiolle. Infektoituneita eläimiä ei tulisi käyttää tutkimuksessa.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Sendai-virustyöskentelyssä on vältettävä aerosolien muodostumista. Sendai-virukset ovat epästabiileja, eikä niiden inaktivoitiin tarvita erityistoimenpiteitä. Viruksen erittäin korkean leviämispotentiaalin vuoksi on kuitenkin noudatettava tiukkoja toimia, joilla leviäminen estetään.

Henkilöiden, jotka tekevät töitä koe-eläinten (etenkin jyrksijöiden) kanssa tai joilla on jyrksijöitä lemmikkieläiminä, ei tulisi tehdä töitä Sendai-viruksilla.

Hiiriyhdyskunta, jolla esiintyy yllättäen hengitystieoireita, tulisi aina testata Sendai-virusinfektion varalta (SV-antigeenitesti). Huomioitavaa on, että muilla jyrksijöillä kuin hiirillä ja rotilla (mm. marsut), positiivinen SV-antigeenitesti voi olla seurausta

parainfluenssatartunnasta, sillä etenkin marsut ovat herkkiä ihmisten parainfluenssaviruksille.

Vacciniavirukset

Yleistä

Vaccinia-virus (VACV tai VV) on poxviruksiin kuuluva vaipallinen dsDNA-virus, joka on sukua lehmä- ja isorokkoviruksille. Muista DNA-viruksista poiketen pox-virukset eivät replikoidu isäntäsolun tumassa vaan sen sytoplasmassa. Tämä edellyttää suurta genomia, joka koodaa replikaatioon ja transkriptioon tarvittavia eri entsyymejä. Replikaatiosyklin aikana VV tuottaa neljää eri infektiivistä muotoa, joilla on erilainen ulkomembraani. Infektiivisten muotojen runsaudessa on eroja ja niillä on ilmeisesti hieman eri tehtävät viruksen leviämisessä isännasta toiseen, solujen välillä ja isäntäorganismissa. Vaccinian genomi koodaa myös useita proteiineja, jotka suojaavat virusta interferoneilta.

Vaccinia-infektio on lievä ja terveissä ihmisissä yleensä oireeton, joskin lievää ihottumaa ja kuumetta voi esiintyä. Vaccinia-viruksen aiheuttama immuunireaktio suojaa isorokolta (Variola), joten Vacciniaa on käytetty isorokkorokotteena. Elävät Vaccinia-rokotteet ovat aiheuttaneet komplikaatioita immuunipuutteisille, ja kuolleisuudesta on vaihtelevia tietoja. Isorokon hävittyä isorokkorokotuksista on luovuttu muille kuin riskiryhmille, joilla on riski joutua tekemisiin Vaccinia-viruksen kanssa esimerkiksi terveydenhuollossa tai tutkimustyössä. Turvallisempia rokotteita on kehitetty/saatavilla, koska uhka isorokkoviruksen käytöstä bioterrorismiin on olemassa.

Rokotekäytön lisäksi Vaccinia-virusta käytetään geenisiirtovektorina eläin- ja ihmiskudoksiin sekä geeniterapiassa. Parhaiten karakterisoituja kantoja ovat Western Reserve, Copenhagen, Dryvax (l. "Wyeth"; rokotekanta), ACAM2000 (rokotekanta), ja Modified Vaccinia Ankara (MVA). Viimemainittu on heikennetty (nonvirulentti) kanta, joka saattaa olla turvallisempi.

Villityypin viruksen biologinen luokitus

Luokka 2

GM-virusten käytön luokitus

GM-vacciniavirukset, jotka ovat villityypin vacciniaviruksen johdannaisia (esim. WR, NYCBOH, Copenhagen, Lister), voidaan luokitella käytön luokkaan 2.

E erityisen heikennetyt ("highly attenuated") vacciniaviruskannat (esim. MVA, NYVAC), jotka eivät kykene replikoitumaan tai replikoituvat huonosti nisäkässoluissa eivätkä kykene aiheuttamaan etenevää infektiota, voidaan luokitella käytön luokkaan 1.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Myös luokkaan 1 kuuluvat GM-virusjätteet on inaktivoitava todennetulla tavalla.

Infektiivisen viruksen pääsy ruoansulatuskanavaan, rikkiinäselle iholle tai pisaroiden ja aerosolien välityksellä limakalvoille ja erityisesti silmiin on estettävä. Niin ikään on

huolehdittava, ettei virusta pääse elimistöön neulanpistojen välityksellä. Virus voi levitä myös Vaccinialla infektoitujen eläinten ja ihmisten rokotuskohdista ja rokotettujen eritteistä, hengitysteiden eritteistä ja kudoksista ja siirtyä kosketustartuntana rokotuskohdasta. Jotkut poxvirukset ovat kuivattuinkin stabiileja ja voivat levitä esineiden välityksellä. Nämä leviämisreitit on eliminoitava. Heikentämättömällä viruksella on työskenneltävä laminaarikaapissa, ja työntekijöiden silmien suojauksesta on huolehdittava.

Immuunipuutteisten henkilöiden tai henkilöiden, joilla on ihovaurioita tai vaikea ihottuma, ei pidä työskennellä viruksella.

Zoonoosivirukset

Yleistä

Zoonoosit ovat eläimistä ihmisiin tarttuvia tauteja, ja viruszoonooseja aiheuttavat useaan eri virusheimoon kuuluvat virukset. Näistä tyypillisiä Suomessa tavattavia viruksia ovat Puumala-virus (hantavirus), puutiaisenkefaliittivirus ja Sindbis-virus. Maailmanlaajuisesti tähän joukkoon kuuluvat mm. denguevirukset, zikavirus ja chikungunyavirukset. Zoonoosivirusten suuren määrän takia niitä ei käsitellä tässä ohjeessa yksitellen, vaan toiminnanharjoittajan pitää soveltaa niiden käytössä osion yleisiä linjauksia.

Zoonoottiset virukset leviävät muun muassa myyrien, puutiaisten ja niveljalkaisten välityksellä. Tämä voi joskus johtaa lajisiirtymään eläimestä ihmiseen. Infektio voi rajoittua infektoituun yksilöön tai muodostaa pitkiä tartuntaketjuja ihmisestä toiseen.

Useat zoonoottiset virukset ovat merkittäviä ihmisen taudinaiheuttajia ja aiheuttavat vakavan taudin vaaran. Rabiesinfektiossa kuolleisuus on 100 %, mutta kuolema voidaan estää altistuksen jälkeisellä rokotus- ja vasta-ainehoidolla. Keltakuumeen, Japanin aivotulehduksen ja puutiaisaivokuumeen torjuntaan on käytössä tehokkaat rokotteet.

Zoonoottisia muuntogeenisiä viruksia käytetään lähinnä tutkimuksessa.

Villityypin virusten luokitus

Puumalavirus, puutiaisenkefaliittivirus, dengue- ja chikungunyavirukset ovat luokkaa 3.

Sindbisvirus ja zikavirus ovat luokkaa 2.

GM-virusten käytön luokitus

Replikaatiokykyisten virusten luokka määräytyy pääosin luonnollisen viruksen mukaan, ellei viruksen taudinaiheuttamis- tai replikaatiokykyä ole alennettu. Tämä pitää osoittaa sopivalla menetelmällä. Virusgenomista tehty cDNA-klooni ei tuota infektiivistä virusta bakteereissa, jolloin sen käytön luokka on 1. Kun käytetään replikonivektoreita, joissa ei ole mukana lainkaan viruksen rakennegeenejä, voidaan työskentely luokitella luokkaan 1. Jos replikonit pakataan virus-replikoni-partikkeleihin (VRP) käyttämällä rakenneproteiinit sisältävää auttaja-RNA:ta, on mahdollista, että rekombinaation kautta syntyy infektiokykyisiä viruksia. Tämä on

huomioitava käytön luokituksessa. VRP:iden käyttö voidaan luokitella luokkaan 1, jos ne tuotetaan menetelmillä, joissa rekombinaation mahdollisuus on tehty hyvin pieneksi (esimerkiksi kolmen plasmidin systeemillä), tai jos luotettavasti osoitetaan (esimerkiksi CPE:n puuttumisella), että erä ei sisällä infektiokykyistä virusta. Riskinarvioinnissa on perusteltava, miten varmistetaan, ettei rekombinantteja ole muodostunut.

Replikoivilla vektoreilla työskenneltäessä on otettava huomioon käytetyn insertin mahdollinen vaikutus isäntäsoluihin ja -organismiin ja viruksen replikaatioominaisuuksiin niissä. Viruksen tuottama proteiini, kuten sytokiini tai kasvutekijä, voi lisätä viruksen replikaationopeutta ja siten aiheuttaa ennalta arvaamattomia tilanteita. Koe-eläintyöskentelyssä on tärkeää selvittää, ovatko käytetyt geenit toiminnallisia myös ihmisen soluissa.

Tarvittavat toimenpiteet

Toiminnassa on noudatettava käytön luokitusta vastaavaa eristystasoa. Mikäli koe-eläimiä infektoidaan replikaatiokykyisillä viruksilla, on käytettävä eristystason 2 tai 3 mukaisia tiloja ja toimenpiteitä.

Viruksen kyky levitä aerosolin välityksellä on huomioitava, ja aerosolin muodostumista työskentelyssä on vältettävä. Kudosten homogenoinnissa voidaan käyttää Falcon-putkia, joiden korkkien läpi on tehty reikä homogenisaattorin sauvalle. Sentrifugoinnissa on käytettävä suljettuja putkia. Mikroskopointi on parempi tehdä kuoppalevyillä kuin maljoilla; molemmat teipataan valmiiksi jo virustilassa parafilmillä, etteivät ne avaudu. Laminaarien hepa-suodattimet vaihdetaan säännöllisin väliajoin.

Infektioriskin vuoksi virusjätteet on luokituksesta riippumatta aina inaktivoitava. Nestejätteet voidaan käsitellä soveltuvin osin joko etanolilla, Virkonilla³, Oxivirilla tai hypokloriitilla. Pinnat ja astiat voi käsitellä 70 % etanolilla tai Virkonilla. Kuivajätteet autoklavoidaan ja/tai poltetaan. Kertakäyttömateriaalien käyttöä suositellaan. Jos jätteitä ei inaktivoida paikan päällä, kiinteät jätteet kerätään virustilassa erikseen infektiójätteeksi merkittyihin erityisastioihin.

Viruksesta riippuen on etukäteen selvitettävä mahdollisuus rokottaa työntekijät.

³ Huom! Virkon on nykyään kerättävä erikseen eikä sitä saa laskea viemäriin.