

ANVISNING FÖR KLASSIFICERING AV INNESLUTEN ANVÄNDNING AV GENETISKT MODIFIERADE VIRUS OCH DERAS ISOLERINGSÅTGÄRDER

Innehåll

OBSERVERA.....	3
KLASSIFICERINGEN AV ANVÄNDNINGEN BASERAR SIG PÅ EN RISKBEDÖMNING	3
ALLMÄNNA ARBETSPRINCIPER.....	5
ANVÄNDNING AV GMO-VIRUS OCH VIRUSVEKTORER I LOKALER DÄR DET FINNS DJUR	6
ANVÄNDNING AV GENETISKT MODIFIERADE VIRUS OCH VIRUSVEKTORER I EN CORE-ENHET	7
ANVISNINGAR FÖR SPECIFIKA VIRUSGRUPPER.....	7
AAV (adenoassocierade virus) och andra parvovirus	8
Allmänt	8
Biologisk klassificering av vildtypsvirus	8
Klassificering av användning av GM-virus	8
Nödvändiga åtgärder	9
Adenovirus (Adenoviridae)	9
Allmänt	9
Biologisk klassificering av vildtypsvirus	10
Klassificering av användning av GM-virus	10
Nödvändiga åtgärder	10
Baculovirus	11
Allmänt	11
Klassificering av användning av vildtypsvirus	11
Klassificering av användning av GM-virus	11
Nödvändiga åtgärder	12
Virus i herpesgruppen.....	12
Allmänt	12
Biologisk klassificering av vildtypsvirus	13
Klassificering av användning av GM-virus	13
Nödvändiga åtgärder	13
Influensavirus	13
Allmänt	13
Klassificering av vildtypsvirus	14
	1

Klassificering av användning av GM-virus	14
Nödvändiga åtgärder	14
Coronavirus	14
Allmänt	14
Klassificering av vildtypsvirus	15
Klassificering av användning av GM-virus	15
Nödvändiga åtgärder	15
Lentivirus (HIV, FIV, SIV)	15
Allmänt	15
Biologisk klassificering av vildtypsvirus	16
Klassificering av användning av GM-virus	16
Nödvändiga åtgärder	16
Klassificering av användning i olika situationer	16
Nödvändiga åtgärder	17
Klassificering av användning av GM-virus	18
Nödvändiga åtgärder	18
Papillomvirus (Papillomaviridae)	18
Allmänt	18
Biologisk klassificering av vildtypsvirus	19
Klassificering av användning av GM-virus	19
Nödvändiga åtgärder	19
Picornavirus	19
Allmänt	19
Klassificering av vildtypsvirus	20
Klassificering av användning av GM-virus	20
Nödvändiga åtgärder	20
Retrovirus (andra än lentivirus)	20
Allmänt	20
Biologisk klassificering av vildtypsretrovirus	21
Klassificering av användning av GM-virus	21
Nödvändiga åtgärder	22
Sendaivirus	23
Allmänt	23
Biologisk klassificering av vildtypsvirus	23
Klassificering av användning av GM-virus	23
Nödvändiga åtgärder	24
Vacciniavirus	24
Allmänt	24
Biologisk klassificering av vildtypsvirus	25
Klassificering av användning av GM-virus	25
Nödvändiga åtgärder	25
Zoonotiska virus	25
Allmänt	25
Klassificering av vildtypsvirus	26
Klassificering av användning av GM-virus	26

OBSERVERA

Denna anvisning gäller endast sådan användning av genetiskt modifierade (GM-) djurvirus och djurvirusvektorer som omfattas av gentekniklagens (377/1995) tillämpningsområde. [I statsrådets förordning om genteknik \(928/2004\)](#) beskrivs de tekniker och metoder med vilka framställda organismer klassificeras som gentekniskt modifierade organismer enligt gentekniklagen. Anvisningen gäller således inte användning av naturliga virus eller testning eller klassificering av primära celler.

Anvisningen sammanställer rekommendationer på allmän nivå om de vanligaste genetiskt modifierade virusen. Enligt 9 § i gentekniklagen är verksamhetsutövaren alltid skyldig att hålla sig informerad om egenskaperna hos den genetiskt modifierade organismen som används, och en riskbedömning ska göras för varje enskilt fall. Även om anvisningen ger grundläggande information om säker användning av vissa virus – och delvis även andra virus – ska varje verksamhetsutövare baserat på en riskbedömning, välja de riskhanteringsåtgärder som bäst lämpar sig för den egna verksamheten och som utgår från egenskaperna hos de GM-virus som används.

Läs den allmänna delen av anvisningen innan du går vidare till virusspecifika anvisningar.

KLASSIFICERINGEN AV ANVÄNDNINGEN BASERAR SIG PÅ EN RISKBEDÖMNING

Klassificeringen av användningen av genetiskt modifierade virus baserar sig på en riskbedömning som görs av verksamhetsutövaren. Principerna för riskbedömning, klassificering och isoleringsåtgärder föreskrivs i social- och hälsovårdsministeriets [förordning 1053/2005](#). Utgångspunkten för riskbedömningen är klassificeringen av biologiska faktorer i enlighet med det naturliga virusets sjukdomsframkallande förmåga och som ligger till grund för det genetiskt modifierade viruset eller virusvektorn (BSL, eng. biosafety level). Detta föreskrivs i social- och hälsovårdsministeriets förordning 748/2020. Vid riskbedömningen beaktas även den gentekniska modifieringen och det sätt på vilket det modifierade viruset används. Vid riskbedömningar som sker i överensstämmelse med förordningarna om genteknik är det således möjligt att från klassificeringen av biologiska faktorer komma fram till en avvikande klassificering av användningen.

Genetiskt modifierade virus kan klassificeras enligt sjukdomsframkallande förmåga enligt följande:

- Klass 1 omfattar GM-virus som sannolikt inte orsakar sjukdom hos människor, djur eller växter.
- Klass 2 omfattar GM-virus som kan orsaka sjukdom hos människor, djur eller växter, men som sannolikt inte sprids bland befolkningen eller andra

populationer. Det finns i allmänhet en effektiv förebyggande eller avvärande åtgärd eller behandling.

- Klass 3 omfattar GM-virus som kan orsaka allvarlig sjukdom hos människor, djur eller växter och som kan spridas bland befolkningen eller populationer, men det finns i allmänhet en effektiv förebyggande eller avvärande åtgärd eller behandling.
- Klass 4 omfattar GM-virus som kan orsaka allvarlig sjukdom hos människor, djur eller växter och som kan utgöra en allvarlig fara om de sprids bland befolkningen eller en population. Det finns ingen effektiv förebyggande eller avvärande åtgärd eller behandling.

En genteknisk modifiering eller virusets användningssätt kan vid riskbedömningen leda till en klassificering som avviker från de allmänna riktlinjerna. Vid riskbedömningen är det viktigt att identifiera sådana fall där egenskaperna hos den insert som används kan öka risken. Särskild uppmärksamhet bör ägnas åt modifieringar i följande faktorer:

- genernas aktivitet i den infekterade cellen (transkription)
- virusets onkogenitet
- toxicitet
- utveckling av värdens immunsvär (interleukiner, cytokiner)
- virusets värdspecifitet
- virusets patogenicitet
- känslighet för virusläkemedel

Dessutom påverkas riskbedömningen och användningsklassificeringen av särskilda egenskaper i det avsedda sättet att använda det genetiskt modifierade viruset, såsom förvaring, odling i cellodlingar, mängden infektiöst virus och virus med replikationsförmåga när viruset produceras, och infektering av viruset på försöksdjur. Klassificeringen av användningen påverkas också av tillgången på effektiva vacciner eller virusläkemedel och befolkningens vaccinationstäckning.

Användningsklassen påverkas väsentligt av virusets smittsamhet och replikationsförmåga, förmåga att spridas och orsaka skadliga effekter hos individer och befolkningen. Med infektiöst virus avses här ett virus som kan tränga in i cellen. Med replikativt virus avses ett virus som förökar sig (dvs. vars genom replikerar sig självt) i en cell och producerar viruspartiklar med förmåga att infektera och med replikationsförmåga. Ett modifierat virus eller en modifierad virusvektor som producerar enbart nukleinsyra eller rekombinant protein från sin genomstruktur utan att själv replikera sig anses inte vara ett replikativt virus. En virusliknande partikel (VLP-virus) är inte en genetiskt modifierad organism eftersom den inte innehåller virusgenom och därför inte är replikativ.

När man använder genetiskt modifierade virus och särskilt virusvektorer måste man ofta överväga om de kan reverteras eller rekombineras till naturliga virus. Därför måste man känna till viruspartiets replikationsförmåga och infektiösitet.

Risken för rekombination av eventuella naturliga virus i stamceller med ett genetiskt modifierat virus eller en virusvektor ska beaktas i riskbedömningen. Vid arbete med stamceller rekommenderas att man kontrollerar att cellerna inte innehåller samma virusart som används vid modifieringen. Till exempel måste celler från människa testas HIV-negativa om avsikten är att infektera dem med en lentivirus vektor. När

man använder stamceller från människa eller primater ska man också beakta frågor som gäller arbetarskyddet med avseende på endogena sjukdomsalstrare.

Virusets beteende kan iakttas till exempel genom att granska förändringar som viruset orsakar, dvs. cytopatiska effekter i vävnaden (CPE; eng. cytopathic effect) med hjälp av immunfluorescenssteknik eller kvantitativ polymeraskedjereaktion (Q-PCR). Vid PCR-test ska man komma ihåg att ett positivt resultat inte är ett tecken på virusets replikationsförmåga eller -oförmåga. Verksamhetsutövaren ska i riskbedömningen motivera den metod som används och som ledde till den föreslagna användningsklassen.

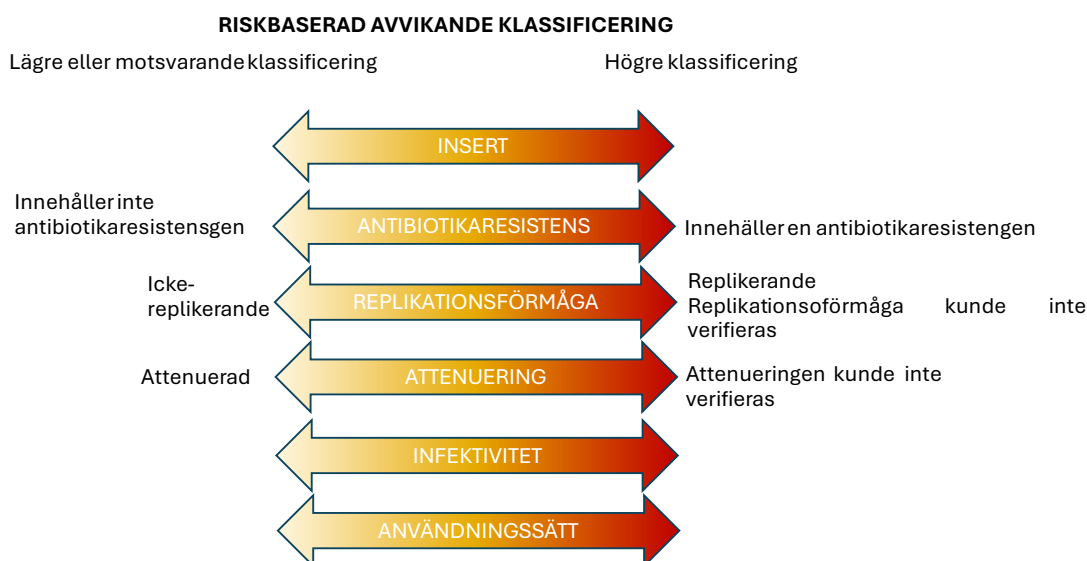


Bild 1: Exempel på faktorer som behandlas i riskbedömningen och som kan ändra den ursprungliga användningsklassen.

ALLMÄNNA ARBETSPRINCIPER

Vid innesluten användning av ett genetiskt modifierat virus eller en virusvektor iakttas skyddsåtgärder enligt den isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen. Kraven på isoleringsnivåer beskrivs i bilagan till förordning 1053/2005. Dessutom ska principerna för gott laboratoriearbete följas i alla användningsklasser.

För att säkerställa arbetstagarnas säkerhet ska Statsrådets förordning om skydd för arbetstagare mot risker som orsakas av biologiska agenser ([933/2017](#)) också beaktas. Förordningen omfattar både naturliga och genetiskt modifierade biologiska agenser och ska, utöver bestämmelserna om genteknik, följas när man arbetar med GM-virus. Mer information om arbetarskyddet finns tillgängligt på Arbetarskyddsförvaltningens och Arbetshälsoinstitutets webbplatser.

Vid val av isoleringsåtgärder ska särskild uppmärksamhet ägnas åt huruvida det genetiskt modifierade viruset kan spridas via aerosoler. Om spridning är möjlig bör arbetsmoment där aerosoler kan bildas minimeras. Vid till exempel homogenisering, centrifugering och mikroskopering av vävnader ska man försöka förhindra spridning

av stänk och droppar, se till att skydda arbetstagaren och miljön mot dessa, och för att rengöra arbetsmiljön välja dekontamineringsmetoder som är lämpliga för det aktuella viruset. Hepa-filtren i laminarerna måste bytas ut med jämna mellanrum.

I arbetet ska man också beakta risken för att genetiskt modifierade virus sprids till produktions-, hobby- och sällskapsdjur eller naturdjur som finns utanför utrymmena för innesluten användning. Arbetstagarna bör undvika regelbunden närkontakt med sådana djur som i synnerhet kan infekteras av de använda virusen. Om detta inte är möjligt ska isoleringsåtgärder vidtas för att säkerställa att GM-viruset inte kan spridas via arbetstagarna från utrymmen för innesluten användning.

Om det finns ett effektivt vaccin mot den sjukdomen som viruset i fråga orsakar bör man överväga att erbjuda det till arbetstagarna, vid behov även utanför det nationella vaccinationsprogrammet. Mer information om tillgängliga vacciner finns i följande källor, varav den sistnämnda listan är den mest omfattande:

- 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>

Obs! Om ett vaccin licensierat av FDA (USA:s livsmedels- och läkemedelsmyndighet) inte har försäljningstillstånd från EMA (europeiska läkemedelsmyndigheten), bör en särskild tillstånd ansökas från Säkerhets- och utvecklingscentret för läkemedelsområdet FIMEA i Finland.

Mer information om virus och virussjukdomar: "Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet 1". Heikkinen, T., Järvinen, A., Meri, S., Vapalahti, O., Vuopio, J. (red.). 4:e reviderade upplagan. Förlag Oy Duodecim. ISBN 978-951-656-548-7. Printon, Tallinn 2020.

ANVÄNDNING AV GMO-VIRUS OCH VIRUSVEKTORER I LOKALER DÄR DET FINNS DJUR

En anmälan om innesluten användning på en försöksdjursenhet eller en försöksdjurscentral omfattar i allmänhet inte genetiskt modifierade virus och virusvektorer. Varje verksamhetsutövare som använder lokalerna ska därför själv sköta om sin anmälningsskyldighet och diskutera GM-verksamheten i förväg med försöksdjursenheten. Användaren av GM-virus är skyldig att bedöma riskerna i verksamheten och fastställa nödvändiga riskhanteringsförfaranden och eventuella virustester. Vanligtvis sker detta i samarbete med försöksdjursenheten. I praktiken har det konstaterats vara en bra verksamhetsmodell där verksamhetsutövaren informerar försöksdjursenheten efter att ha fullgjort sina skyldigheter enligt

gentekniklagen och vid behov lämnar in handlingar och riskbedömningar som gäller verksamheten innan användningen av GM-virus i försöksdjursenheten inleds.

Den verksamhetsutövare som använder genetiskt modifierade virus ska se till att alla personer som arbetar med djur är medvetna om eventuella risker för människor och djur och känner till nödvändiga riskhanteringsåtgärder. Det är skäl att fästa vikt vid utbildningen av djurskötare, och anordnandet av utbildningen ska avtalas mellan verksamhetsutövaren och försöksdjurcentralens ansvariga.

ANVÄNDNING AV GENETISKT MODIFIERADE VIRUS OCH VIRUSVEKTORER I EN CORE-ENHET

Av en anmälan eller ansökan om innesluten användning ska det tydligt framgå vilka genetiskt modifierade organismer som används i core-enhetens och verksamhetsutövarens lokaler och vilka aktiviteter som utförs där. I fråga om användningen i core-enhetens lokaler ska parterna komma överens om vem som sköter anmälningarna och i ett senare skede delgivningar till gentekniknämnden. För att undvika missförstånd rekommenderas att avtal mellan core-enheten och verksamhetsutövaren görs skriftligen.

När man arbetar med genetiskt modifierade virus i core-enheter måste man beakta att motsvarande naturliga (omodifierade) virus också kan användas i samma lokaler. Innan arbetet inleds ska man diskutera arbetsfördelningen mellan core-enhetens egen personal och verksamhetsutövarens arbetstagare. Dessutom ska det diskuteras om hur man tar hänsyn till andra som arbetar i lokalerna och hur man undviker en eventuell rekombinationsrisk om man samtidigt arbetar med naturliga virus och genetiskt modifierade virus i lokalerna.

ANVISNINGAR FÖR SPECIFIKA VIRUSGRUPPER

Genetiskt modifierade virus har ursprungligen framställts för forskning om genfunktioner i virus och virusets livscykel. Denna information har använts för utveckling av virusvektorer, då viruset används bland annat som hjälpvirus (t.ex. adenovirus-AAV), som en komponent i vacciner (t.ex. adenovirusvektorrivaccin) eller i cancerbehandlingar (t.ex. onkolytisk virusbehandling med hjälp av herpesvirus). Ovan i denna anvisning beskrivs principerna för att fastställa användningsklassen för ett genetiskt modifierat virus eller en virusvektor utifrån egenskaperna hos det naturliga viruset och de modifieringar som gjorts.

De föreslagna virusspecifika klassificeringarna gäller sådana modifieringar som man redan har viss praktisk erfarenhet av. Anvisningen ska tillämpas vid behov, eftersom den inte behandlar alla kända virusgrupper eller virus som har modifierats eller av vilka genetiska vektorer har framställts, och inte heller undertyper eller varianter av virus. I oklara fall bör man vända sig till gentekniknämnden och be om ytterligare anvisningar.

AAV (adenoassocierade virus) och andra parvovirus

Allmänt

Parvovirus är små ssDNA-virus utan hölje. I undergruppen *Parvovirinae* av familjen *Parvoviridae* finns det tre släkter av virus som infekterar människor. De viktigaste av dessa är parvovirus i släktet *Erythrovirus* (B19), adeno-associerade virus (AAV) i släktet *Dependovirus* och mänskliga bocaviruset 1-4 i släktet *Bocavirus*. Bland parvovirus finns också viktiga patogener hos djur såsom nötkreatur, gris, hund, katt, mink och laboratoriegnagare.

Parvovirus B19 kan orsaka olika sjukdomar, såsom femte sjukdan, ledsymtom eller hematologiska komplikationer. Infektion med parvovirus B19 under graviditeten kan leda till fosterdöd. Parvovirusens värdtropism och vävnadstropism kan påverkas av en förändring av några få aminosyror i kapsidproteinet. Till exempel är parvovirus hos hund (CPV), i familjen parvovirus, som påvisades på 1970-talet uppenbarligen en virusvariant av parvovirus hos katter eller mink.

AAV anses inte vara patogent för människa, men år 2023 kopplades AAV2 till leverinflammation hos barn. Orsakssambandet mellan patogenen och sjukdomen är emellertid fortfarande oklart. AAV kan överföras som aerosol, fekal-oralt eller direkt via ögats bindhinna. För närvarande finns det 13 kända AAV-serotyper som kan transfektera både odelade och differentierade celler hos människa och olika djurarter. AAV-vektorer är de vanligaste vektorerna vid genöverföring och uttryck i klinisk användning.

AAV kan endast replikera med hjälp av ett hjälpvirus och då är det vanligtvis fråga om adenovirus eller herpes simplex-virus. AAV är relativt stabila och kan finnas kvar i miljön under långa perioder. I cellerna verkar det naturliga AAV huvudsakligen episomalt. I frånvaro av hjälpvirus kan AAV-provirus integreras i ett specifikt område på kromosom 19 hos människan. Det har inte påvisats att AAV-baserade virusvektorer, från vilka en stor del av AAV-genomet har avlägsnats, integreras i ett specifikt kromosomområde, utan integrationen är slumpmässig. I djurstudier har AAV-vektorernas integrationsrisk i levern uppskattats till 1×10^{-4} kopior/diploid genom ($<0,1$ % vektorkopior). AAV-vektorer orsakar en förhöjd cancerrisk på grund av insertionsmutagenes, men detta anses vara sällsynt; levercellscancer har upptäckts hos unga möss i samband med AAV-tester. Dessutom har djurstudier med höga mängder AAV-vektorer visat en koppling till inflammatoriska reaktioner i levern och, när lokalt införda i centrala nervsystemet, i ryggmärgens dorsala rotganglier.

Biologisk klassificering av vildtypsvirus

Klass 1 vid användning utan adenovirus eller annat infektiöst hjälpvirus.

Humant parvovirus (B19) klass 2. Även parvovirus hos djur tillhör huvudsakligen klass 2 på grund av den sjukdomsrisk som de utgör för sina målarter.

Klassificering av användning av GM-virus

Genetiskt modifierade adenoassocierade virus som inte innehåller naturligt adenovirus eller annat skadligt hjälpvirus kan i princip klassificeras i

användningsklass 1. Riskerna med genetiskt modifierad AAV beror också på egenskaperna hos det överförda genetiska materialet som kan höja användningsklassen. Om ett naturligt adenovirus används som hjälpvirus är användningsklassen alltid minst 2. I andra fall ska riskerna bedömas utifrån hjälpviruset eller den metod som används för genöverföring.

Andra genetiskt modifierade parvovirus hör i princip till användningsklass 2. Vid riskbedömningen ska man vara uppmärksam på eventuella förändringar av värdspektrum eller vävnadstropism. Verksamhetsutövaren ska vid riskbedömningen särskilt beakta risken för direkt eller indirekt spridning till djur via arbetstagaren eller annan väg.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklass iakttas. Om en AAV-vektor används i kliniska provningar, ska man vid riskbedömningen beakta möjligheten att vektorn kan spridas och eventuellt smitta vårdpersonalen eller andra nära människor efter behandlingsperioden samt risken att AAV-vektorn integreras i genomet hos den smittade.

Vid arbete med parvovirus ska bildning av aerosoler undvikas. Gravida kvinnor ska inte arbeta med B19. Parvovirusens enkla kapsidstruktur är mycket resistent inte bara mot lipidlösningar utan även mot pH 3–9 och värme. AAV är mycket stabila vid olika pH-värden och temperaturer och är mycket motståndskraftiga mot olika vanliga medel som används för kemiska inaktivering. De kan inaktiveras med till exempel 5 % fenol, 1–10 % natriumhypoklorit, 2 % glutaraldehyd, uppvärmning i 10 min 75 °C 0,1 % natriumdodecylsulfat (SDS) och alkaliska lösningar med pH över 9.

De mest lämpliga medel för inaktivering av CPV är halogenföreningar, aldehyder och natriumhydroxid. Höga proteinhalter försvagar effekten hos natriumhypoklorit och formaldehyd. Temperaturer över 100 °C inaktiverar snabbt CPV.

Adenovirus (Adenoviridae)

Allmänt

Adenoviruset är ett dsDNA-virus som saknar hölje och som främst orsakar infektioner i luftvägarna och ibland även allvarigare sjukdomar hos människan. De kan överföras som aerosol, fekal-oralt, direkt via ögats bindhinna och blodet. Adenovirus kan infektera både celler som delar sig och celler i viloläge. Deras vävnadstropism beror på serotypen. Adenovirus integreras sällan i värdcellens genom och ger därför vanligtvis endast ett tillfälligt transgenuttryck i värdcellen som varar i 1–2 veckor. Adenovirus är relativt stabila och kan leva länge, upp till 3–8 veckor på ytor, i aerosoler och i vatten.

Adenovirus är en av de vanligaste vektorerna som används för genetisk överföring och är mycket vanligt förekommande i vektorvacciner. Adenovirus har använts som bärare i vaccinämnen mot till exempel ebola, rabies, HIV, malaria och tuberkulos. Adenovirusvektorn används också vid onkolytisk cancerbehandling. Ett adenovirus-

baserat covid-19-vaccin har förknippats med en mycket sällsynt risk för blodkoaguleringsstörningar.

Biologisk klassificering av vildtypsvirus

Grupp 2

Klassificering av användning av GM-virus

Adenovirusvektorer, vars sjukdomsframkallande förmåga kan påvisas vara klart reducerad jämfört med det naturliga viruset, kan anses tillhöra användningsklass 1. Detta förutsätter att viruset har visat sig vara tillräckligt försvagat och oförmöget att replikera i en infekterad människa eller ett infekterat djur. Sannolikheten för en reversering ska också vara låg. Om man vill att ett genetiskt modifierat virus ska höra till användningsklass 1 ska varje virusparti visa att det inte innehåller virus med replikationsförmåga, såvida inte den produktionsmetod som används, såsom PER.C6-cellinjen, utesluter denna möjlighet.

Användning av adenovirusvektorer med replikationsförmåga, inklusive CRV (Conditionally Replicating Viruses) hör till användningsklass 2.

Vid riskbedömningen av GM-adenovirus ska man fästa vikt vid en möjlig rekombination, vilket kan leda till att gensekvenser överförs till besläktade virus eller att det genetiskt modifierade viruset får replikationsförmåga. Infektiösa virus med replikationsförmåga kan uppstå som ett resultat av rekombination om det finns komplementärerande sekvenser i den cellinje som används för att packa virus, en infekterad cellinje, ett hjälpvirus eller ett djur som är infekterat med ett naturligt virus.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Förhindrande av aerosolbildning och luftburen spridning bör beaktas även i samband med användningsklass 1.

Om man använder virus som inte har replikationsförmåga ska det finnas en metod för att mäta virus som kan replikera sig. Validerade metoder lämpar sig för detta, till exempel testning i sådana mottagliga cellinjer där komplettering inte är möjligt.

Om försöksdjur har infekterats med GM-virus ska eventuella infektiösa virus i djurens sekret förstöras genom en validerad metod.

Adenovirus kan inaktiveras med till exempel 1 % hypoklorit, 2 % glutaraldehyd och 0,25 % SDS. Adenovirus inaktiveras även av desinfektionsmedel som innehåller en kombination av flera aktiva ämnen, t.ex. med Barrydin® som innehåller kvaternära ammoniumföreningar, guanidinderivat och alkylpolyaminer och Virkon®¹ som innehåller oxon, nadodekylbensensulfonat och sulfamsyra. Alkohol (etanol) rekommenderas inte för inaktivering av adenovirus eftersom det kräver en längre verkningstid och har ingen effekt i närvaro av organiskt material. Isopropanol

¹ Obs! Virkon ska nuförtiden samlas in separat och får inte släppas ut i avloppet.

inaktiverar inte adenovirus. Adenovirus kan förbli infektiösa även i eter- och/eller kloroformextraktion.

Baculovirus

Allmänt

Baculoviruset är ett dsDNA-virus som infekterar leddjur och som används i biotekniska tillämpningar bl.a. för framställning av proteiner i insekts- och däggdjursceller samt för bekämpning av insekter. Den vanligaste baculovirusvektorn är *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcNPV) som infekterar minst 30 till släktet *Lepidoptera* tillhörande fjärilsarter och nattfjärilsarter samt vissa skalbaggsarter och orsakar en dödlig sjukdom för dessa. Arter av släktet *Autographa* (gammafly) förekommer också i Finland. Baculovirus är inte skadligt för människan.

Baculoviruset har en stavliknande viruspartikel och partikelns kapsid är täckt av ett hölje med ursprung från värdens cellmembran. Det virala GP64-proteinet i höljet bidrar till att viruset fäster i värdcellen och kommer in i cellen. Två typer av virus bildas i en infekterad värdcell. Först avsnörs viruspartiklar som infekterar intilliggande celler. I ett sent skede bildas stora mängder polyhedrinprotein som tillsammans med viruspartiklar bildar så kallade ocklusionspartiklar som frigörs när cellerna bryts ned. Polyhedrinmatrisen gör det möjligt för nya insekter att infekteras eftersom den ökar viruspartiklarnas hållbarhet i miljön och behövs för virusinvasion i tarmarna hos nya insektsvärdar.

Förutom att infektera insektscellsinjer transfekterar baculoviruset även flera däggdjursarters celler, inklusive människans. Det gäller både celler som delar sig och som inte delar sig. Baculovirus replikeras dock inte i däggdjursceller och dess egna uttryckssignaler fungerar endast i insektsceller. Den gensekvensen som uttrycks med hjälp av en baculovirusvektor inserteras i däggdjurscelluttrycket vanligtvis under en stark viruspromotor i däggdjurscellen. Baculovirusgenomet inserteras inte in i värdcellens genom.

Klassificering av användning av vildtypsvirus

Grupp 2 baserat på risken den har för insekter. Det finns ingen risk för människor eller andra djur.

Klassificering av användning av GM-virus

GM-baculovirus som saknar polyhedrin eller p10 kan infektera cellkulturer, men inte orsaka sjukdom i leddjur. Vid användning av ett försvagat baculovirus som inte producerar ocklusionspartiklar utgör viruset ingen risk för leddjur i miljön. Användningen kan då klassificeras att höra till användningsklass 1. Vid användning av mindre försvagade baculovirus som då de sprids i miljön kunde överleva och infektera sina värdar, är det nödvändigt att överväga från fall till fall om användningen hör till klass 2.

Baculovirusvektorernas eventuella risker för människans hälsa är relaterade till egenskaperna hos transgenen. En potentiellt skadlig insert, som till exempel bakterietoxin, onkogen eller tillväxtfaktor, kan höja användningsklassen. GM-

baculovirus med potentiellt skadliga inserter som regleras av en promotor i däggdjurscellen kan behöva klassificeras till användningsklass 2.

Immunförsvarets komplement inaktiverar snabbt baculoviruset, men viruset utlöser reaktioner som hör till den medfödda immuniteten hos däggdjur. Exponering för baculovirus kan därför orsaka en inflammatorisk reaktion.

Baculovirus kan pseudotypas med ett heterologiskt viralt glykoprotein, till exempel VSVg. Pseudotypning ökar baculovirusets förmåga att infektera däggdjursceller och minskar virusets känslighet för komplement. VSVg-pseudotypning kan också öka virusets hållbarhet i miljön. Virustropismen kan man också förändras genom att i gp64-proteinet lägga till målcellens receptorbindande kedja. Förändringen av tropismen ska beaktas i riskbedömningen.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Vid användning av baculovirus vars genuttryckssignaler endast verkar i insektsceller och som har försvagats genom inaktivering eller deletion av polyhedrin kan man arbeta på isoleringsnivå 1. Sådana GM-virus som inte har en polyhedrinmatris som skydd är mer känsliga för värme och ultraviolett ljus än vildtypsvirus och inaktiveras snabbt i miljön. De kan till exempel inaktiveras med etanol. Även i detta fall rekommenderas inaktivering av avfallet.

Eftersom ocklusionspartiklar förblir i naturen i flera veckor måste polyhedrinproducerande baculovirus och avfall som innehåller dessa inaktiveras i enlighet med användningsklass 2.

Virus i herpesgruppen

Allmänt

Herpesvirus är stora, höljeförsedda DNA-virus. Människan bär på nio herpesvirus, och även många djurarter bär på herpesvirus. Infektioner orsakade av herpesgruppen är ganska vanliga och seroprevalensen för de flesta herpesvirus är hög. Herpesvirus kännetecknas av en permanent latent infektionsform och intermittenta aktiveringsepisoder. Typiska sjukdomar som orsakas av herpesvirus är munsår, genital herpes, vattkoppor och bältros. Infektioner orsakade av herpesvirus är lätta att diagnostisera och kan i huvudsak behandlas med antivirala läkemedel. Det finns vaccin mot vissa virus i herpesgruppen och mot bältros.

Herpesvirus modifieras både för att undersöka herpesvirusets livscykel och för användning som virusvektor. Herpesvirus-baserade vektorer finns tillgängliga kommersiellt. För behandling av hudmelanom har ett medicinskt virus (T-vec) framställts av herpes simplex-viruset där man avlägsnat neurovirulensgenen och faktorn som passerar immunförsvaret. HSV-DNA integreras inte i genomet och har

naturligt en gen som är känslig för läkemedel (tymidinkinas). Dessa är säkerhetsfaktorer vid användning av HSV-vektorer.

Biologisk klassificering av vildtypsvirus

Grupp 2

Klassificering av användning av GM-virus

Klass 2 om det inte har visats att viruset inte kan replikera sig. En virusvektor i form av en plasmid (*E. coli*-bakterien som värd) är inte infektiös och kan klassificeras höra till klass 1.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Även virusavfall i klass 1 ska inaktiveras på ett verifierbart sätt. Särskild försiktighet ska iakttas i fråga om gravida i arbete, eftersom en akut herpesvirusinfektion är farlig för fosterutvecklingen och det nyfödda barnet.

Som höljeförsedda virus inaktiveras herpesvirus lätt med vanliga desinfektionsmedel (t.ex. 70 % etanol vid desinfektion av ytor och händer) och är relativt känsliga för uttorkning. De kan emellertid leva i flera dagar, särskilt i kylrum, till exempel i odlingsmedium eller annat proteinhaltigt material.

Herpesvirus är mycket artspecifika, så det är osannolikt att de sprids till andra arter. Generna som är associerade med virusets patogenes och virulens har vanligtvis avlägsnats från modifierade virus, vilket minskar deras infektiösitet och replikationsförmåga.

Influenzavirus

Allmänt

Influenzavirus är höljeförsedda RNA-virus vars genom består av åtta separata RNA-avsnitt som innehåller gener. Typiskt för dem är att RNA-avsnitten kan växla mellan olika virusstammar (reassortering). Dessutom omvandlas viruset genom punktmutationer. Dessa förändringar är särskilt signifikanta om de riktas mot proteinerna på virusets yta, hemagglutinin och neuraminidas. Olika djur kan vara bärare av samma undertyp av influenzaviruset vilket kan leda till uppkomsten av nya virusformer och till och med en pandemi. Influenzavirus förekommer säsongsmässigt, och årligen utvecklas ett vaccin mot säsongsinfluenzan. Det finns effektiva läkemedel mot viruset om infektionen diagnostiseras i ett tidigt skede av infektionen.

Influenzavirusens genfunktioner kan modifieras genom att modifiera separata RNA-avsnitt som klonats till plasmidform *in vitro*. Rekombinanta virus framställs genom att

transfektera alla åtta RNA-avsnitt i samma cell i plasmidform så att av dessa transkriberas RNA som fungerar som ett virus och producerar ett infektiöst virus.

Klassificering av vildtypsvirus

Säsongsinfluensa grupp 2, fågelinfluensa grupp 3.

Klassificering av användning av GM-virus

I princip i enlighet med klassificeringen av ett icke-modifierat virus. En virusvektor i form av en plasmid (*E. coli*-bakterien som värd) är inte infektiös och kan klassificeras höra till klass 1.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Även GM-virusavfall av klass 1 ska inaktiveras på ett verifierbart sätt.

Som höljeförsedda virus inaktiveras influensavirus lätt med vanliga desinfektionsmedel (t.ex. 70 % etanol vid desinfektion av ytor och händer) och är relativt känsliga för uttorkning. Virusen kan emellertid leva i flera dagar, särskilt i kylrum, till exempel i odlingsmedium eller annat proteinhaltigt material.

Vid modifiering av virus ska särskild uppmärksamhet ägnas åt virusets undertyp och dess naturliga förmåga att infektera olika djurarter. Modifieringens inverkan på virusets patogenicitet ska granskas med beaktande av undertypens pandemiska potential. På grund av influensavirusens stora förmåga att mutera måste särskild uppmärksamhet ägnas åt att förhindra spridning av GM-virus i miljön.

Eftersom det finns ett effektivt vaccin mot viruset ska man se till att arbetstagarna har aktuella anvisningar om tillgången på vaccin och att nya arbetstagare får introduktion i anvisningarna om vaccinationer.

Coronavirus

Allmänt

Coronavirus är höljeförsedda RNA-virus. Coronavirus orsakar sjukdom både hos människor och djur. Coronavirus är ytterst artspecifika, men övergår mellan arter har upptäckts och humana coronavirus har förmodligen ursprungligen överförts till människor från andra djur. Hos människor orsakar olika arter av coronavirus både lindriga och allvarliga sjukdomar, vilket påverkar deras klassificering. Olika coronavirus hos människan sprids också på olika sätt mellan människor. Coronavirus är vanliga och deras typiska sjukdomsbild är förkylning. Coronavirus förändrar sig lätt. Ett bra exempel på detta är SARS-CoV-2, som förorsakade covid-19-pandemin, och av vilket tiotals olika virusvarianter har identifierats. Det finns vacciner och läkemedelsbehandling mot SARS-CoV-2-viruset.

Klassificering av vildtypsvirus

Klassificeringen baseras på virusets infektiösitet och patogenicitet. SARS, SARS-2 och MERS grupp 3. Övriga grupp 2.

Klassificering av användning av GM-virus

SARS, SARS-2 och MERS klass 3. Andra GM-coronavirus klass 2. Virus-cDNA eller en vektor i form av en plasmid i *E. coli* -värden är inte infektiöst och kan klassificeras till användningsklass 1.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Diagnostiska prover för SARS-2-virus kan behandlas i lokaler med isoleringsnivå 2, men virusen måste odlas i lokaler med isoleringsnivå 3. Även GM-virusavfall av klass 1 ska inaktiveras på ett verifierbart sätt.

Som höljeförsedda virus inaktiveras de lätt med vanliga desinfektionsmedel (t.ex. 70°% etanol vid desinfektion av ytor och händer). Coronavirus är relativt känsliga för uttorkning, men de kan leva till exempel i odlingsmedium i flera dagar.

Vid modifiering av virus ska särskild uppmärksamhet ägnas åt virustypen och dess naturliga förmåga att infektera och förmåga att infektera olika djurarter. Modifieringens inverkan på virusets patogenicitet ska granskas med beaktande av typens pandemiska potential och vaccinsvar.

Det finns ett effektivt vaccin mot SARS-2-viruset, och därför ska man se till att arbetstagarna har aktuella anvisningar om tillgången på vaccin och att nya arbetstagare får introduktion i anvisningarna om vaccinationer.

Lentivirus (HIV, FIV, SIV)

Allmänt

Lentivirus är höljeförsedda RNA-virus och hör till retrovirus. Ett typiskt modifierbart lentivirus är HIV-1, vars kroniska infektion leder till immunbrist (AIDS) och död utan medicinering. Sjukdomsförloppet kan bromsas avsevärt med medicinering, men sjukdomen kan inte botas och det finns inget vaccin mot den.

Lentivirus används ofta som transportörer vid genöverföring. Lentivirus-baserade virus infekterar både celler som delar sig och som inte delar sig och deras transgen integreras i genomet, vilket ger ett stabilt genuttryck.

Bland lentivirus används mest HIV-1-baserade vektorer, men även HIV-2-, SIV (Simian Immunodeficiency Virus) och FIV-baserade (Feline Immunodeficiency Virus)

vektorer används. För dessa används i tillämpliga delar anvisningar utifrån HIV-1-baserade vektorer.

Biologisk klassificering av vildtypsvirus

Grupp 3.

Klassificering av användning av GM-virus

Genetiskt modifierade HIV och SIV hör till användningsklass 3, såvida det inte finns tecken på att deras infektions- eller sjukdomsalstrande förmåga är tydligt nedsatt. FIV tillhör klass 3 när det gäller risker för djur. Hälsoriskerna för människan är små eller obefintliga.

Nödvändiga åtgärder

När det gäller infektiösa HI- och SI-virus utförs arbetet alltid på isoleringsnivå 3. Om integrationen i cellens genom av transgenen i lentivirusets genom kan orsaka skadliga effekter eller om eventuella effekter inte kan bedömas tillförlitligt, ska man överväga om det behövs skärpta riskhanteringsåtgärder för i fråga om stänk, aerosoler och skydd mot sår.

När man använder material som innehåller ett virus med replikationsförmåga ska man vara beredd på att i olycksfall så snabbt som möjligt påbörja profylaktisk behandling. Det har visat sig att profylaktisk behandling som inleds i tid minskar sannolikheten för HIV-infektion.

Som höljeförsedda virus inaktiveras lentivirus lätt med vanliga desinfektionsmedel (t.ex. 70 % etanol vid desinfektion av ytor och händer) och är relativt känsliga för uttorkning. Viruset kan emellertid leva i flera dagar i t.ex. odlingsmedium eller annat proteinhaltigt material, särskilt i kylrum. Pseudotypning av virus kan ha en virusstabiliserande effekt, vilket måste beaktas vid bedömning av möjliga exponeringssätt t.ex. vid hantering av prover som innehåller virus, inklusive prover från infekterade djur.

När material som är infekterat med lentivirus har inaktiverats, till exempel genom fixering, så att det inte längre innehåller infektiösa virus, kan man arbeta på isoleringsnivå 1.

1. HIV-1-baserade vektorsystem

Klassificering av användning i olika situationer

De huvudsakliga riskerna med användning av HIV-1-baserade vektorer är bildningen av virus med replikationsförmåga och eventuella onkogen effekt som beror på transgenens uttryck eller integration av vektorkassetten. Riskerna påverkas av modifieringar som ökar biosäkerheten för det använda vektorsystemet och aktiviteten av proteinet som produceras av den sekvens som infogas i vektorn. Vid riskbedömningen ska man ta hänsyn till effekterna av pseudotypning såsom vävnadstropism och stabilitet. Dessutom ska man beakta virusets målcell eller målvävnad och effekten av förändringar i virusets ytstrukturer på komplementets

funktion. Om stamceller eller patientmaterial används i arbetet ska man säkerställa att vävnads- eller cellmaterialet inte innehåller HI-virus.

Flera generationer av HIV-virusvektorer har utvecklats och det rekommenderas att man använder minst ett tredje generationens plasmidsystem. I tredje generationens system kodas transplasmiden som kodar transgenen och plasmidens packningsproteiner av fyra separata plasmider som inte innehåller någon överlappande sekvens. Metoden ökar den biologiska säkerheten vid användningen. Vanligtvis är sådana lentivektorer så kallade SIN-vektorer (self-inactivating), där replikationen av transplasmiden förhindras genom att ta bort vissa regleringsområden. Lentivirusvektorpartiklarna riktar mot en specifik cell genom pseudotypning, där en av systemets plasmider kodar för ett heterologiskt höljeprotein, t.ex. glykoproteinet (VSV-g) från det vesikulära stomatit-viruset.

Infektiösa lentivirusvektorer och pseudotypade virusvektorer tillhör alltid minst användningsklass 2, även om det har påvisats att partiet av virusvektorer inte innehåller virus med replikationsförmåga. Med lentivirusvektor infekterat material, t.ex. en cellinje hör i regel till användningsklass 2 innan det har påvisats att det infekterade materialet är fritt från lentiviruspartiklar. Därefter kan man övergå till att arbeta i lokaler av isoleringsnivå 1. Det är dock nödvändigt att använda utrymmen med isoleringsnivå 2 och efterfölja riskhanteringsåtgärderna om det är möjligt att integrationen i genomet av en gen som vektoren transporterar orsakar biverkningar eller om effekterna inte kan bedömas tillförlitligt. Transgener som höjer risken är till exempel onkogener, gener som kodar för siRNA som inaktiverar tumörsuppressorn och toxingener.

Lentiviruspartiklar kan identifieras av odlingens supernatant till exempel med hjälp av p24-ELISA (antigentest för kapsidprotein) eller med kvantitativ PCR-metod (Scherr et al. 2001; <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11570495/>). Som positiv kontroll kan man använda infektionsdagens supernatant och som negativ supernatanten i den icke-infekterade odlingen. Odlingen blir ofta negativ först efter den tredje inokuleringen. När det på ett tillförlitligt sätt har påvisats att odlingen inte innehåller infektiösa virus kan användningen klassificeras tillhöra klass 1.

Allt avfall ska inaktiveras även om det infekterade materialet har påvisats höra till klass 1.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Mottagligheten för infektion ökar om ett HIV-baserade virus kommer in i kroppen via blod, slemhinnor eller skadad hud, och därför måste risken för sår, stänk och aerosoler minimeras. Skyddsåtgärderna bestäms utifrån verksamhetens karaktär. Undvik i första hand att använda vassa och ömtåliga föremål. Om detta inte är möjligt ska arbetstagarna få handledning i trygg användning av dessa, och utbildningen ska dokumenteras. Virus får inte behandlas i öppna behållare utanför laminarskåpet. Personlig skyddsutrustning ska användas vid behov för att skydda mun, näsa och ögon mot stänk och aerosoler. Använd alltid skyddshandskar. Man ska inte arbeta med HIV-konstruktioner tillhörande klass 2 om huden på händerna är uppenbart skadad (t.ex. sår och eksem).

Lokalerna ska ha tillträdeskontroll eller så ska användarna och användningstiderna för lokalen registreras. Enligt rekommendationerna ska man registrera de organismer och virushalter som använts i experimentet. Vid infektion av djur med lentivirusvektorer ska åtgärder tillhörande isoleringsnivå 2 följas för att minimera exponeringsrisken för arbetstagaren. Lentivirus replikerar sig inte i gnagare, så skötseln av dessa kan flyttas till lokaler av isoleringsnivå 1 några dagar efter infektionen, förutsatt att infektionsstället rengörs noggrant och djuren flyttas till rena burar. Det är emellertid möjligt att hiv-viruset replikerar sig i djur som har fått transplanterad humanvävnad eller annan vävnad som är permissiv för hiv-viruset. Vid infektion av sådana djur med lentivirusvektorn ska man arbeta på minst isoleringsnivå 2.

Som höljeförsedda virus inaktiveras lentivirus lätt med vanliga desinfektionsmedel, till exempel 70% etanol lämpar sig för desinfektion av ytor och händer. Lentivirus är relativt känsliga för uttorkning. De kan emellertid leva i flera dagar, särskilt i kylrum, till exempel i odlingsmedium eller annat proteinhaltigt material. Pseudotypning av virus kan ha en virusstabiliserande effekt. Det ska beaktas vid bedömning av potentiella exponeringar, till exempel vid hantering av prover från infekterade djur eller andra prover.

2. FIV-baserade vektorsystem (Feline Immunodeficiency Virus)

Klassificering av användning av GM-virus

Vid klassificeringen av genetiskt modifierade FIV-vektorer ska man utöver risken för djursjukdomar beakta vad som nämns ovan om pseudotypning av lentivirusvektorer och hur inserter påverkar klassificeringen.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. I fråga om pseudotypade FIV-vektorer som infekterar humana celler tillämpas samma säkerhetsåtgärder som vid användning av HIV-baserade vektorer. FIV-vektorerna måste framställas genom en samtransfektion av tre plasmider. Frånvaro av ett reproduktivt virus ska påvisas i det färdiga viruspreparatet även vid användning av FIV-vektorer.

När man använder FIV-vektorer som kan infektera och replikera sig hos kattdjur är det nödvändigt att i samband med riskbedömningen särskilt beakta möjligheten att viruset kommer i kontakt med värdjuret. Om man i samband med riskbedömningen identifierar att det finns risk för att GM-viruset sprids ska arbetsmetoder och inaktiveringen av avfallet genomföras så att ingen risk för djursjukdom uppstår.

Papillomvirus (Papillomaviridae)

Allmänt

Papillomvirus är ett dsDNA-virus utan hölje som endast infekterar epitelceller i huden eller i slemhinnorna och orsakar hos människan bland annat hudvårtor, papillom i struphuvudet och kondylom i könsorganen. Papillomvirus är också delaktiga till

uppkomsten av flera tumörer och cancerformer, såsom livmoderhalscancer. Det är inte känt att humant papillomvirus infekterar andra djurarter.

Papillomvirus kan integreras i värdcellens genom, särskilt vid allvarliga epitelförändringar och cancer. För att replikera sig kräver papillomvirus en högt differentierad epitelcell som inte kan odlas i cellodlingar. Vanlig experimentell infektion med papillomvirus är inte möjlig. I 3D-cellodlingsmodeller är det möjligt att framställa måttliga mängder papillomvirus. Flera allmänt använda cellinjer, såsom HeLa-, CaSki- och SiHa-cellinjerna har isolerats från cancer som orsakats av papillomvirus och omfattar delar av papillomvirusets genom. Viruset kan dock inte replikera sig i dessa cellinjer och infektiösa viruspartiklar kan inte heller bildas i dem.

Biologisk klassificering av vildtypsvirus

Grupp 2

Klassificering av användning av GM-virus

I princip klass 2.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Replikationsegenskaperna hos genetiskt modifierade papillomvirus är jämförbara med vildtypens papillomvirus. Hos immunkompetenta personer är papillomvirus mycket vävnadsspecifika och det finns olika typer av virus på huden och slemhinnorna. Hälsorisker kan dock inte helt uteslutas, eftersom det finns situationer där viruset kan komma in exempelvis via ett sår. Man ska således inte arbeta med papillomviruspartiklar om huden är skadad. Använd lämpliga skyddskläder vid arbetet och undvik om möjligt att använda vassa föremål.

Picornavirus

Allmänt

Picornavirus är små RNA-virus med sfärisk form och utan hölje. De hör till de vanligaste patogener för människan. Kända picornavirus är bland annat poliovirus, rhinovirus, enterovirus och parekovirus. Picornavirus har påträffats hos nästan alla undersökta djur. Det finns många kända typer av picornavirus och korsskyddet är svagt. En picornavirusinfektion är övergående och immunsystemet eliminerar effektivt viruset från kroppen. Typiska sjukdomar som orsakas av picornavirus är förkylning, höstblåsor och hjärnhinneinflammation. Det finns inga läkemedel eller vacciner mot picornavirus med undantag för poliovirus och hepatit A-virus. Picornavirus har testats som medicinskt virus vid behandling av cancer. För forskningsändamål används icke-modifierade cellanpassade picornavirus samt genetiskt modifierade virus.

Klassificering av vildtypsvirus

Grupp 2

Klassificering av användning av GM-virus

En picornavirusvektor i form av cDNA, dvs. plasmid, och som innehåller ett virusgenom hör till klass 1 eftersom den inte är infektiös, beter sig som en plasmid och uttrycks inte naturligt i en human cell utan lämpliga promotorer. När ett virus produceras från en sådan vektor eller när ett genom i en cDNA-vektor modifieras, till exempel genom mutation eller utbyte av delar av virus, hör det virus som produceras till klass 2. En VLP-partikel (virus-like particle) som framställts av picornavirus är inte en genetiskt modifierad organism eftersom den inte innehåller virusgenom och inte är infektiös.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Om picornavirusvektorn används i kliniska provningar ska man i riskbedömningen beakta att vektorn kan spridas till vårdpersonalen eller till människor i försökspersonens närmaste krets efter avslutad behandlingsperiod. Den enkla strukturen på picornaviruset kapsid är mycket stabil och viruset förblir infektiöst på ytor i dagar. Enteroviruspartikeln tål mycket lågt pH (2,5). Viruset kan inaktiveras genom värmebehandling (över 56 °C, 30 min), men ett säkrare sätt är att behandla materialet med Virkon², Oxivir eller 10% natriumhypoklorit. Etanol förstör inte picornavirusstrukturen.

Retrovirus (andra än lentivirus)

Allmänt

Retrovirus är ett höljeförsett virus vars genom består av två positivsträngade RNA-molekyler. Virusets genom genomgår omvänd transkription som innebär att virusets RNA omvandlas till DNA. Det DNA-provirus som bildas fäster i värdcellens genom, där det vid transkription fungerar som en mall för viralt mRNA. De långa terminala upprepade sekvenserna (LTR) som flankerar virusgenomen omfattar sekvenser av promotorer och förstärkare (U3) som reglerar virusets uttryck. Alla retrovirus innehåller ett gag-genkluster som kodar för byggproteiner, en pol-gen som kodar för omvänd transkription och integras, och en env-gen som kodar för glykoproteinerna på höljet. Dessutom har vissa grupper av retrovirus gensekvenser som kodar för proteiner som förstärker och modifierar replikationen och som kan påverka patogeniciteten.

Många retrovirus är onkogenetiska på grund av att de kan orsaka insertionsmutagenes eller på grund av att DNA i värdcellens genom har integrerats i virusets RNA-genom. Den senare leder vanligtvis till en defektiv, men akut transfektionsduglig stam som behöver ett hjälpvirus för replikation. Retrovirus sprids vanligen genom exponering

² Obs! Ämnet ska nuförtiden samlas upp separat och får inte släppas ut i avloppet

för kroppsvätskor eller nålstick. De flesta av dessa virus är starkt immunogena, men värdjurets immunitet undertrycker vanligtvis replikationen mer än renar infektionen helt.

I laboratorier används retrovirus från möss (MoMLV), fåglar (ALV) och katter (FeLV).

Biologisk klassificering av vildtypsretrovirus

Andra retrovirus än de som bärs av primater är i allmänhet inte patogena för människan, så deras användningsgrupp är i princip 1. Om ett retrovirus kan orsaka djursjukdomar kan riskklassificeringen vara högre. Till exempel hör bovint leukemivirus BLV till grupp 2 och virus som förorsakar infektiös anemi hos hästar EIAV till grupp 3.

Klassificering av användning av GM-virus

De huvudsakliga riskerna med användning av retrovirus-baserade vektorer är bildningen av virus med replikationsförmåga och eventuella onkogen effekt som beror på transgenens uttryck eller integration av genkassetten. Riskerna påverkas av de modifieringar som använts för att öka vektorsystemets biosäkerhet och karaktären hos den infogade sekvensen. Vid riskbedömningen ska hänsyn tas till effekterna av pseudotypning (vävnadstropism, stabilitet) och att modifieringar i virusets ytstruktur kan påverka virusets känslighet för komplement. Utöver de hälsorisker som gäller människan ska man granska risken för djursjukdomar om det genetiskt modifierade viruset skulle spridas utanför lokaler för innesluten användning.

Samanvändning av tre plasmider rekommenderas vid användning av onkogen retrovirusvektorer såsom ALV och MOMLV. Det ursprungliga värdspektrumet för ekotropiska, dvs. retrovirusvektorer som endast infekterar gnagare, kan utökas genom pseudotypning, där Env-proteinet ersätts med något annat höljeförsett protein. Till exempel, när glykoproteinet från vesikulärt stomatit-virus (VSVg) används för pseudotypning, bildas amfotropa virus som infekterar människor, inklusive flera däggdjursarter. Xenotropa virus infekterar bl.a. celler hos människa men inte gnagare. Genom att använda själv-inaktiverande (SIN) lentivirala vektorer kan man minska risken att plasmidvektoren transaktiveras. Vid framställningen av GM-retrovirus måste man använda packningscellinjer som har utvecklats på ett sådant sätt att det är nästan omöjligt att ett virus med replikationsförmåga bildas genom rekombination.

Oavsett replikationsförmåga tillhör retrovirus, som kan infektera humana celler, alltid minst i användningsklass 2. Egenskaperna av inserten kan höja klassificeringen. Gener som höjer risken är till exempel onkogener, gener som kodar för siRNA som inaktiverar tumörsuppressorer samt toxingener.

Arbete med ekotropiska retrovirusvektorer som inte kan replikera sig (med undantag för vektorer som är baserade på retrovirus hos primater) hör i regel till användningsklass 1, såvida inte den överförda inserten eller risken för djursjukdom höjer användningsklassificeringen. Om man inte påvisat ekotropiska retrovirus oförmögna att replikera sig, klassificeras användningen av dessa enligt

användningsklassen för risken djursjukdom, såvida inte inserten påverkar användningsklassificeringen.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas.

Vid användning av amfo- eller xenotropa retrovirus som kan infektera humana celler ska varje parti av rekombinanta virus testas med för ändamålet utvecklade cellinjer eller annat tillförlitligt testsystem för att utesluta att virusen har replikationsförmåga. Som positiv kontroll kan man använda infektionsdagens supernatant och som negativ supernatanten i den icke-infekterade odlingen. Odlingen blir ofta negativ först efter den tredje inokuleringen.

Om integrationen av en gen som bärs av retroviruset i genomet kan orsaka skadliga effekter eller om eventuella effekter inte kan bedömas tillförlitligt, ska kraven för isoleringsnivå 2 följas i arbetet i enlighet med verksamhetens karaktär. Vid arbete med amfo- eller xenotropa retrovirus ska man i första hand undvika användning av vassa föremål och föremål som lätt går sönder. Om detta inte är möjligt ska arbetstagarna få handledning i trygg användning av dessa, och utbildningen ska dokumenteras. Virus får inte behandlas i öppna behållare utanför laminarskåpet. För att skydda mun, näsa och ögon mot stänk och aerosoler ska personlig skyddsutrustning och skyddshandskar användas vid behov. Lokalerna ska ha tillträdeskontroll eller så ska användarna och användningstiderna för lokalen registreras. Vi rekommenderar att man registrerar de organismer och virushalter (titrar) som använts i experimentet.

När det färdiga partiet av ekotropiska virus har testats för att det inte innehåller virus med replikationsförmåga anses användningen uppfylla förutsättningarna för innesluten användning klass 1. Även då måste avfallet inaktiveras.

När det har påvisats att det i cellinjer som infekterats med eko- eller amfotropa retrovirus inte bildas virus med replikationsförmåga, kan arbetet med dessa ske på isoleringsnivå 1, förutsatt att man följer skyddsåtgärderna som krävs för cellodling. Även då måste avfallet inaktiveras.

När infekterade cellinjer lyseras eller fixeras kan man arbeta med dem på isoleringsnivå 1, oavsett hurdana de för infektionen använda retrovirusen är i förhållande till sin värdspecifitet eller replikationsförmåga.

Då djur infekteras med amfo- eller xenotropa retrovirusvektorer som även kan infektera humana celler ska åtgärder enligt isoleringsnivå 2 följas för att minimera exponeringsrisken för personalen. Djuret kan flyttas till lokaler av isoleringsnivå 1 för några dagar efter infektionen, om det retrovirus som används inte kan replikera sig i försöksdjuret. Vid överföringen rengörs infektionsstället noggrant och djuren flyttas till rena burar. Man behöver inte kontrollera provdjurens utsöndringar eftersom det inte finns några infektiösa rekombinanta virus i dem.

Då man infekterar djur med ekotropiska retrovirus med replikationsförmåga (förutom retrovirus hos primater) iakttas en isoleringsnivå i enlighet med risken för djursjukdomar. Om det på ett tillförlitligt sätt kan påvisas att virus med

replikationsförmåga inte bildas hos djur som infekterats med ekotropiska retrovirus, kan arbete med dessa utföras på isoleringsnivå 1.

Retrovirus är känsliga för uttorkning och inaktiveras snabbt utanför värdcellen, men de kan leva under långa perioder i proteinrikt material såsom odlingsmedium. Som höljeförsedda virus inaktiveras de lätt med vanliga desinfektionsmedel (t.ex. 70% etanol vid desinfektion av ytor och händer). Pseudotypning av virus kan stabilisera viruset, vilket måste beaktas vid bedömning av eventuella exponeringssätt, till exempel vid hantering av prover från infekterade djur eller andra prover.

Sendaivirus

Allmänt

Sendaiviruset, som orsakar infektioner i luftvägarna hos gnagare, tillhör släktet respirovirus i familjen *Paramyxoviridae*. Till samma släkte av humana virus hör parainfluenzavirus 1 och 3.

Sendaiviruset är ett stort, höljeförsett virus med en diameter på 150--250 nm, vars genom består av en negativt strängad RNA-molekyl. Sendaiviruset är idag känt som murine respirovirus (respirovirus hos gnagare), men det tidigare namnet är fortfarande vanligt förekommande. Andra tidigare namn på viruset är murine parainfluenza virus type 1 och hemagglutinating virus of Japan (HVJ).

Sendaiviruset överförs lätt via aerosoler och luftvägssekret och är känt för att orsaka infektioner i luftvägarna åtminstone hos möss, råttor, hamstrar och marsvin. Det är känt att olika mus- och råttstammar är olika känsliga för Sendai-virusinfektioner. Bland möss är till exempel C57BL/6-stammen mycket resistent, medan 129/J- och DBA/2J-stammarna är mycket sensitiva. Sendaivirusinfektioner har rapporterats vara vanliga hos möss och råttor som hålls som husdjur, men hos immunkompetenta djur läker infektionerna vanligtvis naturligt utan behandling.

Sendaivirusets genom kodar för sex proteiner: nukleokapsidproteinet NP, den lilla underenheten av RNA-polymerasen fosfoprotein P, den stora underenheten av RNA-polymerasen L, bindnings- och hemagglutininproteinet HN samt fusionsproteinet F. Sendaiviruset infekterar celler via sialsyrareceptorn. Sialsyrareceptorn är en mycket vanlig och konserverad receptor på cellytan och därför kan Sendai-viruset infektera olika djurceller.

Sendaiviruset är inte känt för att vara patogent för människan, men det kan lätt infektera humana celler under cellodlingsförhållanden. Sendaiviruset integreras inte i värdcellens genom och det replikerar sig i cytoplasman med hjälp av sin egen RNA-polymeras.

Biologisk klassificering av vildtypsvirus

Grupp 2

Klassificering av användning av GM-virus

Sendai-viruset anses vara mycket tryggt för människan och man känner inte till något fall då det skulle ha orsakat någon sjukdom hos människan. Sendai-viruset

har använts i utvecklingen av andra vacciner mot humana patogener av stammen Paramyxoviridae (bl.a. RS-virus, parainflensa 1), men även i utvecklingen av HIV-vaccinet. Modifierade, icke-replikerbara Sendai-virusvektorer används allmänt i synnerhet för att framställa inducerade pluripotenta stamceller (iPSC).

Celler som omprogrammeras med Sendai-virus är i sig inte genmodifierade eftersom virusen inte integreras i värdcellens genom. Sendai-vektorer kan leva i cellerna i upp till 10 passager beroende på cellinjen. Med PCR- eller liknande antikroppstest kan man påvisa att det inte längre finns Sendai-virus i cellerna.

Användningen av Sendai-viruset ska uppmärksammas i samband med arbete med försöksdjur, eftersom det förutom förändringar i lungorna kan orsaka infertilitet hos gnagare och utsätta dem för andra infektioner. Infekterade djur ska inte användas i forskning.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Vid arbete med Sendai-virus ska man undvika att aerosoler bildas. Sendai-virus är instabila och kräver inga särskilda åtgärder för att inaktiveras. På grund av virusets mycket höga spridningspotential måste emellertid strikta åtgärder vidtas för att förhindra spridning.

Personer som arbetar med försöksdjur (särskilt gnagare) eller har gnagare som husdjur bör inte arbeta med Sendai-virus.

Ett mussamhälle som plötsligt får luftvägssymtom bör alltid testas för Sendai-virusinfektion (SV-antigentest). Observera att ett positivt SV-antigentest hos andra gnagare än möss och råttor (bl.a. marsvin) kan vara en följd av parainfluensasmitta, eftersom marsvin i synnerhet är känsliga för humant parainfluensavirus.

Vacciniavirus

Allmänt

Vaccinaviruset (VACV eller VV) är ett höljeförsett dsDNA-virus som hör till poxvirus och är släkt med kokopps- och mässlingvirus. Till skillnad från andra DNA-virus replikerar sig inte poxvirus i värdcellens kärna, utan i dess cytoplasma. Detta kräver ett stort genom som kodar för replikation och transkription nödvändiga enzymer. Under replikationscykeln producerar VV fyra olika infektiösa former med olika yttre membran. Det finns skillnader i antalet infektiösa former och de har uppenbarligen något olika uppgifter när det gäller att sprida viruset från värd till värd, mellan celler och i värdorganismen. Vaccinias genom kodar också för flera proteiner som skyddar viruset mot interferoner.

En vacciniainfektion är lindrig och vanligen symtomfri hos friska människor, även om lindriga utslag och feber kan förekomma. Immunreaktionen som vacciniaviruset orsakar skyddar mot smittkoppor (Variola), så vaccinia har använts som vaccin mot smittkoppor. För personer med immunbrist har levande vacciniavacciner föranlett komplikationer, och det finns varierande data om dödligheten. Eftersom smittkoppor anses vara utrotade har man slutat vaccinera mot smittkoppor, med undantag av riskgrupper som riskerar att komma i kontakt med vaccinviruset, till exempel inom

hälso- och sjukvården eller i samband med forskningsarbete. Säkrare vacciner har utvecklats/finns tillgängliga, eftersom det finns ett hot om att smittkoppor kan användas för bioterrorism.

Utöver vaccinanvändning används vacciniaviruset som vektor för att föra in gener i djur- och människovävnader samt inom genterapi. Bäst karakteriserade stammar är Western Reserve, Copenhagen, Dryvax (l. "Wyeth"; vaccinstam), ACAM2000 (vaccinstam), och Modified Vaccinia Ankara (MVA). Den sistnämnda är en försvagad (icke-virulent) stam som kan vara tryggare.

Biologisk klassificering av vildtypsvirus

Grupp 2

Klassificering av användning av GM-virus

GM-vacciniavirus som är derivat av vildtyp vacciniavirus (t.ex. WR, NYCBOH, Copenhagen, Lister) kan klassificeras höra till användningsklass 2.

Särskilt försvagade ("highly attenuated") vacciniavirusstammar (t.ex. MVA, NYVAC) som inte kan replikera sig eller replikerar sig dåligt i däggdjursceller och inte kan orsaka progressiv infektion kan klassificeras höra till användningsklass 1.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Även GM-virusavfall av klass 1 ska inaktiveras på ett verifierbart sätt.

Det infektiösa viruset måste förhindras att komma in i magtarmkanalen, skadad hud eller via droppar och aerosoler på slemhinnorna, särskilt i ögonen. Man måste också se till att viruset inte kommer in i kroppen via nålstick. Viruset kan också spridas från vaccinationsställen hos djur och människor som infekterats med vaccinia och från vaccinerades sekret, exkret och vävnader från luftvägarna och överförs som kontaktsmitta från vaccinationsstället. Vissa poxvirus är stabila även i torkat tillstånd och kan spridas via föremål. Dessa spridningsvägar måste elimineras. Arbete med oförsvagat virus ska utföras i laminarskåp och arbetstagarnas ögon ska skyddas.

Personer med nedsatt immunförsvar eller personer med hudskador eller svåra eksem ska inte arbeta med viruset.

Zoonotiska virus

Allmänt

Zoonoser är sjukdomar som överförs från djur till människor och viruszoonoser orsakas av virus från flera olika virusstammar. Av dessa är Puumalavirus (hantavirus), TBE-virus och Sindbisvirus typiska virus som påträffas i Finland. Till denna grupp hör globalt sett denguevirus, zikavirus och chikungunyavirus. På grund av det stora antalet zoonotiska virus behandlas de inte separat i denna anvisning, utan verksamhetsutövaren ska då de används tillämpa de allmänna riktlinjerna i avsnittet.

Zoonotiska virus sprids bland annat via sorkar, fästingar och leddjur. Detta kan ibland leda till zoonotisk spridning. Infektionen kan begränsas till en infekterad individ eller bilda långa smittkedjor från människa till människa.

Flera zoonotiska virus är betydande sjukdomsalstrare hos människan och utgör risk för allvarlig sjukdom. Vid rabiesinfektion är dödligheten 100 procent, men tack vare vaccination och antikroppsbehandling efter exponeringen kan en dödlig utgång förhindras. Det finns effektiva vacciner mot gula febern, japansk encefalit och fästingburen encefalit.

Zoonotiska genetiskt modifierade virus används främst inom forskning.

Klassificering av vildtypsvirus

Puumalavirus, TBE-virus, dengue- och chikungunyavirus hör till klass 3.

Sindbisvirus och zikavirus hör till grupp 2.

Klassificering av användning av GM-virus

Klassen till vilket ett virus med replikationsförmåga hör bestäms huvudsakligen utifrån det naturliga viruset, såvida inte virusets sjukdomsalstrande eller replikationsförmåga är nedsatt. Detta ska påvisas med hjälp av en lämplig metod. En cDNA klon som framställts av ett virusgenom bildar inte ett infektiöst virus i bakterier, vilket innebär att användningen av det hör till klass 1. När man använder replikonvektorer som över huvud taget inte innehåller några virala strukturgener kan arbetet klassificeras till riskklass 1. Om replikonerna packas i virusreplikonpartiklar (VRP) med hjälp av helper-RNA som innehåller strukturproteiner är det möjligt att det genom rekombinationen bildas smittsamma virus. Detta måste beaktas i samband med att användningen klassificeras. Användningen av VRP kan klassificeras höra till klass 1 om de framställs genom metoder där risken för rekombination är mycket liten (till exempel ett system med tre plasmider) eller om det på ett tillförlitligt sätt kan påvisas (till exempel genom frånvaro av CPE) att partiet inte innehåller något smittsamt virus. Riskbedömningen ska innehålla en förklaring på hur man säkerställer att inga rekombinanter har bildats.

Vid arbete med replikerande vektorer måste man ta hänsyn till den använda insertens eventuella effekt på värdcellerna och värdorganismen och virusets replikationsegenskaper i dem. Ett protein som produceras av viruset, såsom cytokin eller tillväxtfaktor, kan öka virusets replikationshastighet och därmed orsaka oförutsedda situationer. Vid arbete med försöksdjur är det viktigt att utreda om de använda generna är funktionella även i humana celler.

Nödvändiga åtgärder

I verksamheten ska en isoleringsnivå som motsvarar användningsklassen iakttas. Om försöksdjur infekteras med virus med replikationsförmåga ska lokaler och åtgärder enligt isoleringsnivå 2 eller 3 användas.

Virusets förmåga att spridas via aerosoler ska beaktas och aerosolbildning i arbetet ska undvikas. För homogenisering av vävnader kan Falcon-rör användas med kork

med hål för homogeniseringsstaven. För centrifugering ska slutna rör användas. Det är bättre att utföra mikroskopundersökningar med titerlattor än skålar; båda tejpas färdigt redan i virusutrymmet med parafilm så att de inte öppnas. HEPA-filtren i laminarskåpen ska bytas ut med jämna mellanrum.

På grund av infektionsrisken ska virusavfall alltid inaktiveras, oavsett klassificering. Flytande avfall kan i tillämpliga delar behandlas med etanol, Virkon³, Oxivir eller hypoklorit. Ytor och kärl kan behandlas med 70 % etanol eller Virkon. Torrt avfall autoklaveras och/eller förbränns. Användning av engångsmaterial rekommenderas. Om avfallet inte inaktiveras på plats ska det fasta avfallet separat samlas in i virusutrymmet i särskilda kärl märkta för infektionsavfall.

Beroende på viruset måste möjligheten att vaccinera arbetstagarna utredas i förväg.

³ Obs! Ämnet ska nuförtiden samlas upp separat och får inte släppas ut i avloppet