

Uuringuteenuste loetelu, milleks tegevusluba taotletakse

I Bioloogiliste ohutegurite nimekirja kuuluvad 10 ohuklass 3 viirust:

1. Ägedat raskekujulise respiratoorset sündroomi põhjustav koroonaviirus (SARS-CoV)
2. Ägedat raskekujulise respiratoorset sündroomi põhjustav koroonaviirus 2 (SARS-CoV-2)
3. Lähis-Ida respiratoorse sündroomi koroonaviirus (MERS-CoV)
4. Dengue viiruse genotüübid 1-4 (DENV1-DENV4)
5. Kollapalaviku viirus (YFV) sh kollapalaviku viiruse vaktsiinitüvi (YFV-17D)
6. Lääne-Niiluse palaviku viirus (WNV) sh Kunjin viirus (KUNV)
7. Mayaro viirus (MAYV)
8. Hobuste entsefalomüeliidi idaviirus (Eastern Equine Encephalitis virus, EEEV)
9. Rift Valley palaviku fleboviirus (RVFV)
10. A-gripiviiruse ohuklass 3 tüved:
 - kõrge patogeensusega linnugripi viirused HPAIV (H5), nt H5N1;
 - kõrge patogeensusega linnugripi viirused HPAIV (H7), nt H7N7, H7N9
 - A-gripiviirus/New York/1/18 (H1N1) (Hispaania gripp 1918);
 - A-gripiviirus/Singapur/1/57 (H2N2);
 - madala patogeensusega linnugripi viirused (LPAI) H7N9

II Bioloogiliste ohutegurite nimekirja kuuluvad 4 ohuklass 3(*) viirust:

11. Chikungunya viirus (CHIKV).
12. C-hepatiidi viirus (HCV)
13. Puukentsefaliidi viirus (TBEV)
14. Inimese immuundefitsiidi viirus tüüp 1 (HIV)

III Bioloogiliste ohutegurite nimekirja kuuluvad 13 ohuklass 2 viirust:

15. Ross River viirus (RRV),
16. O'nyong-nyong viirus (ONNV)
17. Barmah Forest viirus (BFV)
18. Semliki Forest viirus (SFV)
19. Sindbis viirus (SINV)
20. Zika viirus (ZIKV)
21. Langat viirus (LGTV)
22. A-gripiviiruse ohuklass 2 tüved (IAV)
23. B-gripiviirus (IBV)
24. Inimese alfaherpesviirus (HSV)
25. Inimese koroonaviirus (human coronavirus 229E, hCoV-229E)
26. Inimese metapneumoviirus (HMPV)

IV Bioloogiliste ohutegurite nimekirja kuulub üks ohuklass 2 loomapatogeen (viirus)

27. Sigade transmissiivse gastroenteriidi viirus (porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV)

V Bioloogiliste ohutegurite nimekirja kuulub 15 ohuklass 2 bakterit (mikroorganism)

28. Helicobacter pylori
29. Pseudomonas aeruginosa
30. Escherichia coli (mitte enterohemoraagilised tüved)

31. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium
32. *Acinetobacter baumannii*
33. *Legionella pneumophila*
34. *Porphyromonas gingivalis*
35. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
36. *Klebsiella pneumoniae*
37. *Pasteurella multocida*
38. *Bordetella bronchiseptica*
39. *Staphylococcus epidermidis*
40. *Staphylococcus aureus*
41. *Streptococcus mutans*
42. *Mycobacterium smegmatis*

VI Bioloogiliste ohutegurite nimekirja kuulub kaks ohuklass 2 pärmseent (mikroorganism)

43. *Candida albicans*
44. *Candida auris*

BIOLOOGILISTE OHUTEGURITE KIRJELDUSED

Sugukond *Coronaviridae*, perekond *Betacoronavirus*.

Ägedat raskekujulise respiratoorset sündroomi põhjustav koroonaviirus (SARS-CoV)

Ohuklass BSL3; SARS-CoV epideemia leidis aset aastatel 2002-2004, kuulub sugukonna *Coronaviridae* perekonda *Betacoronavirus*, viirus hakkas levima Hiinast. Nakkuse sümptomid on sarnased teistele külmetushaigustele: palavik, väsimus, peavalu, köha, hingamisraskused; võib tekkida kopsupõletik ja hapnikuvaegus. Kokku nakatus umbes 8000 inimest, hinnanguline suremus 10% juhtudest, kus nõrgema immuunsüsteemiga ja vanemad inimesed on suuremas ohugrupis. Viirus levib nakatunud inimeselt piisknakkusena köhimisel, aevastamisel või väljahingamisel. Samuti võib nakkuse saada saastunud pindade katsumisel. Võrreldes SARS-CoV-2 on haigussümptomite teke ja infektsiooni kulgemine kiirem, seetõttu oli ka epideemia kontrolli alla saamine tõhusam. Puudub spetsiifiline viirusevastane ravi või vaktsiin. Teadmata, kas SARS-CoV-2 vaktsiin kaitseks SARS-CoV eest. Kasutatakse töös sünteetiliselt plasmidi (rekombinantne päritolu) abil päästetud viirust ja selle mutante, mis võimaldab täpsemalt uurida spetsiifilisi viiruse mutante. Plasmiidilt sünteesitakse *in vitro* genoomset RNA-d, mis viiakse rakkudesse; alternatiivina, viiakse plasmiid rakkudesse, kus toimub RNA süntees.

Ägedat raskekujulise respiratoorset sündroomi põhjustav koroonaviirus 2 (SARS-CoV-2).

Ägeda raskekujulise respiratoorse sündroomiga koroonaviirus 2 (SARS-CoV-2) kuulub sugukonna *Coronaviridae* perekonda *Betacoronavirus*; ohuklass BSL3. Põhjustab haigust nimega COVID-19 (inglise keelest coronavirus-disease 2019) ning suure tõenäosusega leidis aset ülekanne nahkhiirtelt inimesele, viirus hakkas levima Hiinas sügisel 2019, praegusel hetkel on viirus levinud üle terve ilma, kinnitatud on 100 miljonit nakatamisjuhtu. Enamikul juhtudest kulgeb haigus kergemate külmetushaigusele iseloomulike sümptomitega, samas viirus võib põhjustada kõhulahtisust, hingamisraskusi ja kopsupõletikku, sealhulgas hapnikuvaegust; võib esineda ka asümptomaatilist infektsiooni. Viirus levib nakatunud inimeselt piisknakkusena köhimisel, aevastamisel või väljahingamisel. Samuti võib nakkuse saada, kui saastunud pindade katsumisel. Nakatumisel sureb keskmiselt 1% inimestest, seejuures on see tugevalt sõltuv inimese vanusest ja tervislikust seisundist, alla 45 aastastel tõenäosuse alla 0,2% ning üle 80 aastastel üle 10%. Viirusspetsiifilise ravimina on kasutusel remdesivir, kuid see võib põhjustada patsiendil kõrvalefekte ja tuleks manustada võimalikult infektsiooni alguses. Euroopa Liidus on kiidetud heaks kolm viiruse vastast vaktsiini ning Eestis populatsiooni massilise vaksineerimisega on juba alustatud. Kasutatakse töös sünteetiliselt plasmidi (rekombinantne päritolu) abil päästetud viirust ja selle mutante, mis võimaldab täpsemalt uurida spetsiifiliste viiruse genoomis olevaid mutatsioone. Plasmiidilt sünteesitakse *in vitro* genoomset RNA-d, mis viiakse rakkudesse; alternatiivina, viiakse plasmiid rakkudesse, kus toimub RNA süntees. Lisaks, uuritakse viiruse looduslike isolaate.

Lähis-Ida respiratoorse sündroomi koroonaviirus (MERS-viirus; MERS-CoV)

Middle East respiratory syndrome (MERS) avastati 2012 aastal Saudi Araabias; ohuklass BSL3. Nakkunuid kirjeldatud alla 3000. Nakkuse sümptomiteks on palavik, köha, hingamisraskused, võib esineda kopsupõletikku ja kõhulahtisust, suremus viirusesse on 35%. Tõenäoliselt on viirus pärit

nahkhiirtest, neis on ka viiruse looduslik reservuaar, inimestele levis viirus kaamelite vahendusel. Viirus levis loomadelt inimesele lähikontaktide kaudu, inimene on viirusele arvatavasti tupikperemees ning mitte looduslik reservuaar. Viiruse on võimeline levima inimeselt inimesele, valdavalt lähikontaktide kaudu (haiglas või perekonna-siseselt), võimalikuks levikuteeks piisknakkus, kokkupuude neelust pärit sekreediga ja pindadega. Aga tõenäosus levimiseks populatsioonis inimeselt inimesele on väike. Puudub spetsiifiline viirusevastane ravi või vaktsiin, mitu vaktsiinikandidaati on arendamisel. Kasutatakse töös sünteetiliselt plasmiidilt (rekombinantne päritolu) päästetud viirust ja selle mutante, mis võimaldab täpsemalt uurida spetsiifilisi viiruse mutante. Plasmiidilt sünteesitakse *in vitro* genoomset RNA-d, mis viiakse rakkudesse; alternatiivina, viiakse plasmiid rakkudesse, kus toimub RNA süntees.

Sugukond *Coronaviridae*, perekond *Alphacoronavirus*.

Inimese koroonaviirus 229E (human coronavirus 229E, hCoV 229E)

Inimese koroonaviirus 229E (human coronavirus 229E, hCoV-229E) kuulub *Coronaviridae* sugukonna perekonda *Coronavirus*; nakatab nii inimesi kui nahkhiiri; ohuklass BSL2. Üks kõige tavalisematest Eestis ja mujal külmetushaigusi põhjustavatest viirustest. Arvatavasti levinud inimestele nahkhiirtelt, suudab levida inimeselt inimesele. Peamiselt nakatab ülemisi hingamisteid, infektsiooniga võib kaasned a palavik, lihasvalu, nohu, köha, kurguvalu; raskematel juhtudel lastel ja immuunpuudulikkusega inimestel võib kaasned a kopsupõletik ja bronhioliit. Levib piisknakkuse ja patogeeni saastunud pindade teel. Puuduvad spetsiifiline ravi ja vaktsiin. Töös kasutatakse nii looduslike isolaate kui ka rekombinantset plasmiididelt päästetud viirusi, et paremini uurida viiruse mutante. Plasmiidilt sünteesitakse *in vitro* genoomset RNA-d, mis viiakse rakkudesse; alternatiivina, viiakse plasmiid rakkudesse, kus toimub RNA süntees.

Sigade transmissiivse gastroenteriidi viirus (porcine transmissible gastroenteritis virus, TGEV). TGEV kuulub ohuklassi BSL2. Viirus nakatab sigu ja teadaolevalt inimestel haiguseid ei põhjusta. Umbes 50% viirustüvedest on tsütopatogeense toimega. Selle viiruse puhul ei esine rist-immuunsust teiste sigade koroonaviirustega. Olenevalt keskkonna tingimustest võib TGEV väljaspool sea organismi püsida eluvõimelisena pikka aega. Näiteks külmutatud materjal is säilib viirus 5-8 nädalat, -18 °C juures isegi kuni 18 kuud. 56 °C juures inaktiveerub viirus 30 minutiga, 37 °C juures 4 päevaga. Viirus on tundlik eetri, kloroformi ja Na-desoksüholaadi, resistentne aga trüpsiini ja pH kõikumiste suhtes. Külmutamine konserveerib viiruse.

Sigade transmissiivne gastroenteriit (TGE) on ägedalt kulgev väga nakkav sigadel esinev viirushaigus, millele on iseloomulik oksendamine, profuusne kõhulahtisus, veetustumine ja suur suremus. Nakkusallikaks on haiged või haiguse läbipõdenud sead, kes eritavad viirust uriini, rooja ja ninanõrega. Haiguse läbipõdenud sead võivad viirust eritada veel mitu kuud peale kliinilist tervistumist. Viiruse ajutiseks bioloogiliseks reservuaariks võivad olla teised loomad (koerad, kassid) ja närilised ning tuvid ja rändlinnud. Nakatumine toimub alimenteraalselt, kuid pole välistatud ka respiratoorne nakatumine. Viirus kandub üle otsesel kontaktil haige loomaga kuid ülekandefaktoriteks võivad olla ka haigete loomade liha ja subproduktid, sööt, joogivesi, sõnnik, allapanu, transpordivahendid, personali riided jms. Kuna spetsiifiline ravi puudub, kasutatakse sümptomaatilist ja profülaktilist ravi, hoidmaks ära sekundaarsete infektsioonide teket. Haigus on levinud globaalselt. Eestis on haigust diagnoositud eelmise sajandi kaheksakümnendatel aastatel.

Sugukond *Flaviviridae*, perekond *Flavivirus*.

Kõik laboris kasutatavad flavi- ja hepaciiviirused on eranditult rekombinantset päritolu, st ei pärine otseselt kliinilisest materjalist vaid on valmistatud kloonitud materjalist laboritingimustes. Infektsioonilist viirust saadakse sisestades koekultuuri rakkudesse (näiteks hamstri fibroblastid) *in vitro* sünteesitud genoomset RNA-d või plasmiidse kihtvektori DNAd, mis kodeerib alfaviiruste genoomi. Tulevikus on võimalik looduslikest allikatest (nakatunud inimene, lüljalgne vektor) viiruste kasutamine.

Dengue viiruse genotüübid 1-4 (DENV1-4). DENV esineb looduses 4 genotüübina (DENV1-4), mis kõik kuuluvad 3. ohuklassi. DENV on arboviirus, peamiseks levitajaks on linnasääsk *Aedes aegypti*. DENV on inimesel kõige sagedamini haigust põhjustav viirus: aastas esineb 100 miljonit kliinilist juhtumit (dengue palavik, "luumurdja" palavik) mille hulgas umbes 250000 raskekujulise dengue hemorraagilise palaviku juhtu. DENV põhjustatud haigusele on iseloomulikud kõrge palavik, peavalu, lööve ning selja- ja luuvalu. Haiguse sümptomid kestavad 6–7 päeva. Superinfektsiooni korral ühega neljast DENV genotüübis võib tekkida samuti dengue hemorraagiline palavik ja dengue šokisündroom.

DENV levib putukvektori – *Aedes* moskiitode kaudu (peamiselt *Ae.aegypti* harvem *Ae. albopictus*), kes Eestis ei ela. Viirus ei levi õhu kaudu, mistõttu keskkonda sattumise puhul ei ole võimaline edasi levima. Spetsiifiline ravi puudub. DENV vastast vaktsiini on püütud arendada alates 1929. aastast. Praeguseks on turule jõudnud üks nõrgestatud viiruseid sisaldav vaktsiin *Dengvaxia*, mida soovitatakse kasutada endeemilistes piirkondades isikutel, kes on eelnevalt DENV'ga kokku puutunud. Põhjuseks on vaktsiini kõrvalnähtude rohkus viiruse suhtes naiivsetel isikutel. Kliinilises arenduses on mitu erineva tehnoloogiaga valmistatud vaktsiini (DENVax, V180, TV-003/005). Dengue vaktsiinide probleemiks on siiani olnud potentsiaalne immuunreaktsiooni võimendumise risk superinfektsiooni korral.

Kollapalaviku viirus (YFV). YFV kuulub 3. ohuklassi. Nagu näha nimetusest põhjustab see viirus kollapalavikku. Kollapalavikule on iseloomulik raske süsteemne haigestumine, millele kaasub maksa-, neerude ja südamekahjustus ning hemorraagiad. Maksakahjustus on kollasuse põhjuseks, millest haigus on ka oma nime saanud. Võivad olla ka massiivsed gastrointestinaalsed verevalumid; suremus on tüüpiliselt ~15-20% kuid võib ulatuda 50%-ni.

YFV levib putukvektori – *Aedes* moskiitode kaudu (peamiselt *Ae.aegypti*, kes Eestis ei ela. Viirus ei levi õhu kaudu, mistõttu keskkonda sattumise puhul ei ole võimaline edasi levima. Spetsiifiline ravi puudub. Olemas on äärmiselt efektiivne elusvaktsiin. Vaktsiini manustatakse intradermaalselt, mille järel tekib eluaegne immuunsus kollapalaviku, aga võimalik, et ka teiste flaviviiruste vastu. Töös tuleb kasutusele rekombinantne plasmiidilt päastatud viirus.

Tüvi YFV-17D on vaktsiinina kasutatav YFV nõrgestatud variant. Ametlik ohuklass puudub, kuid lähtume eeldusest, et see võiks olla klass 2. Vaktsiini on 70 aasta jooksul kasutatud enam kui 100 miljoni inimese vaktsineerimiseks. Tüvi saadi 1930-ndatel aastatel kollapalaviku viiruse üle 200-kordsel kultiveerimisel ahvides ning hiire ja kana embrüotes. See on üks efektiivsemaid vaktsiine maailmas, mis kutsus esile aastakümneid kestvat spetsiifilist immuunvastust >98% vaktsineeritel. 17D vaktsiiniviirust kasutatakse laialdaselt viirusvektorina rekombinantsete vaktsiinide loomiseks teiste haiguste vastu. Vaktsiinitüvi ei ole võimaline vektorputukaid efektiivsel nakatama. Eestis vastavad putukavektorid ei elagi. Seega, vaktsiiniviiruse keskkonda sattumise puhul ei ole ta võimaline edasi levima. Töös tuleb kasutusele rekombinantne plasmiidilt päastatud viirus.

Lääne-Niiluse palaviku viirus (WNV) kuulub 3. ohuklassi. **Kunjin viirus (KUNV)** on Austraalias leviv WNV variant mis on tavalisest WNV'ist vähem patogeene. Kuna tegemist ei ole iseseisva viiruse liigiga vaid WNV alatüübiga on ka seda õige liigitada 3. ohuklassi. WNV põhjustab Lääne-Niiluse palavikku. Enamusel nakatunutest (80%) sümptome ei ole, 20%-l tekib palavik, peavalu, lööve, esinev oksendamist. Umbes 1% nakatunute esinevad rasked sümptoomid, tekib entsefaliit või meningiit;

nende sümptomide korral on suurem umbes 10%. Sarnaselt paljudele teistele viirustele on WNV ohtlikum vanematele või kaasuvate haigustega inimestele. Viirus avastati 1937 aastal Aafrikas kuid on levinud kõikidel kontinentidel, seal hulgas Euroopas. Viiruse looduslikuks peremeheks on linnud ja ta levib *Culex* sääskede vahedusel. Eestis teadaolevalt dokumenteeritud ei ole, küll aga on WNV'd leitud meiega sarnasest kliimavööndist (Rootsis). Viiruse võib harvadel juhtudel levida ka vereproduktide kaudu, on kirjeldatud ülekannet emalt lapsele raseduse käigus, sünnitusel ja rinnaga toitmisel. Muid ülekandeteid inimeste vahel ei ole teada millest järeldub et WNV ei levi õhu kaudu. WNV vastu ei ole vaktsiini ega spetsiifilist ravi (kasutatav ravi on mõeldud sümptomide leevendamiseks)

Puukentsefaliidi viirus (TBEV) kuulub 3* ohuklassi. Peremeheks on närilised, kitsed, lehmad, hobused jt. loomad kelle vahel TBEV kandub edasi enamasti *Ixodes* puukidega. Puukentsefaliidi endeemilisteks piirkondadeks on Kesk-Euroopa, Baltimaad (sh. Eesti) ja Venemaa. Eestis on haigestumus kõrgem maapiirkondades, kuid kogu Eesti loetakse ohupiirkonnaks. On kirjeldatud viiruse edasikandumist pastöriseerimata piima (sagedamini kitsepiima) kaudu. Haigus võib avalduda gripitaoliste nähtude näol ning raskematel juhtudel (kuni 30%) aju- ja ajukelme põletikuna palaviku, tugeva peavalu, oksendamise ja üldise halva enesetundega. Haiguse läbipõdemisel umbes kolmandikul jäävad jääknähud, mis kestavad aastaid või elu lõpuni: tasakaalu- ja koordinatsioonihäired, halvatused, mäluhäired jt. Läbipõdenutel patsientidel areneb eluaegne immuunsus.

TBEV infektsiooniline kloon on loodud sünteetilisest DNA fragmentidest kloneerimise teel. Aluseks on võetud TBEV Lääne-Euroopa subtüübi loodusliku Torö-2003 isolaadi järjestus. Torö-2003 isolaat eraldati Rootsis *Ixodes ricinus* puugist. *Ixodes* puugid on Eestis levinud, mistõttu puukentsefaliidi viirus on Eesti jaoks endeemiline. Spetsiifiline viirus-vastane ravi puudub, kuid eksisteerivad efektiivsed vaktsiinid mis vaktsiinid baseeruvad formaliiniga surmatud viirusi. Maailmas on kasutusel viis erisugust vaktsiini, neist kaks Euroopas, kaks Venemaal ja üks Hiinas. *Ticovac*[®] ja *Encepur*[®] valmistamiseks kasutatakse viiruse Euroopa alltüüpi. Vaktsineerimine on efektiivne, põhjustades Austrias ja Rootsis läbiviidud uuringute alusel 92–100% serokonversiooni. Siiski on kirjeldatud haigestumist ka täielikult vaktsineeritud isikutel. Esmene vaktsineerimine koosneb kolmest süstist. Kaks esimest tehakse 1–3-kuuse vaheajaga, kolmas kuni aasta hiljem. Pärast kahte vaktsiini manustamist tekib hea immuunsus, kuid see kestab ainult ühe hooaja, kolmas süst pikendab immuunsust.

Langat viirus (LGTV) kuulub 2. ohuklassi ja kujutab endas TBEV looduslikult esinevat nõrgestatud varianti. Levib *Ixodes* puukide vahendusel, kuid epidemioloogilist ohtu endast ei kujuta, kuna nakatab vaid närilisi. Inimesele see viirus ei ole patogeenne. Seni pole kirjeldatud ühtegi inimese haigestumise juhtumit. Tänu lähisugulusele TBEV-ga kasutatakse teda mudelina viimase replikatsiooni ja elutsükli uurimisel. Ka on LGTV üks TBEV vastase elusvaktsiini kandidaate.

Zika viirus (ZIKV) kuulub 2. ohuklassi. Infektsioon inimesel on enamasti asümptoomaatileine; umbes viiendikul nakatunuil põhjustab ZIKV mõne päevaga mööduvat palavikku, nahalöövet, konjunktiviiti ja liigeste valu. Viirus levib troopikamaades: Aafrikas, Aasias ja Lõuna-Ameerikas moskiitode vahendusel. Selgrootuteks vahendajateks on *Aedes aegypti* ja *Aedes albopictus* liikide sääsed. Eestis need sääseliigid ei ela. Inimeselt inimesele võib viiruse ülekanne toimuda perinataalselt (emalt lootele või sünnituse ajal) ja rinnapiimaga; vähemalt kahte haigusjuhtu seostatakse ka viiruse ülekandumisega sugulisel teel. Praeguste arusaamiste kohaselt on ülekandumine sugulisel teel haruldane erandjuhtum (võrdluseks – moskiitodega ülekandmise juhtumeid on alates 2015. a. kevadest olnud üle miljoni). Üsasisest ZIKV infektsiooni seostatakse loote kaasasündinud väärarengute tekkega (mikrotsefaalia). On olemas ka neuroloogiliste ja autoimmuunsete tüsistuste üksikjuhud. ZIKV on muutunud aktuaalseks seoses puhangutele Prantsuse Polüneesias 2013. aastal ja Brasiilias 2015. aastal. ZIKV ei levi õhu kaudu, mistõttu keskkonda sattumise puhul ei ole see

võimeline edasi levima. Spetsiifiline ravi ja vaktsiin selle viiruse vastu puuduvad. Laboris kasutatav ZIKV Brasiilia isolaat on sünteetiline koopia looduslikust viirusest mis pärineb Brasiilias aset leidnud puhangust.

Sugukond *Flaviviridae*, perekond *Hepacivirus*.

C hepatiidi viirus (HCV) kuulub 3* ohuklassi. HCV põhjustab inimesel C-hepatiiti, mis enamasti juhtudel omab kroonilist iseloomu. HCV levib enamasti saastunud verega kokkupuute kaudu. HCV võib olla nii rekombinantset kui ka looduslikku päritolu. Rekombinantne HCV tüvi on tuletis genotüüp 2 viirusest JFH1 (Japanies fulminant hepatitis 1) ja pärineb kloonitud materjalist. Pärit on see inim-patsiendilt. Erinevalt enamikest HCV tüvedest paljuneb see koekultuuri rakkudes hästi. Uurimused *in vivo* patoloogia osas on näidanud, et katseloomadel (šimpansid) ei põhjusta JFH1 kroonilist hepatiiti (st immuunsüsteem tõrjub viirust efektiivselt). HCV genotüüp 2 on ka hästi ravile alluv HCV variant. Looduslik HCV – võib pärineda Eestis kogutud vereproovidest ja on enamasti HCV 1b (Eestis levinuim) genotüüp. Sageli esineb proovides koos HIV1-ga. Seda viirust ei kultiveerita ega paljundata (kuna see pole tehniliselt võimalik). Ainus reaalne viiruse levitaja (ja arvestatav riskifaktor) on nakatatud inimene. HCV partiklid on väliskeskkonnas ebastabiilsed ning ei ole võimelised keskkonda sattumise puhul edasi levima. HCV vastu pole vaktsiini. Tänapäevane antiviraalne teraapia on väga efektiivne ja viib >90% juhtudest viiruse kõrvaldamisele organismist. Hetkel on turul kümme otsest antiviraalse toimega preparaati, millest enamikku kasutatakse kombinatsioonides teineteisega, mõnikord ka kombinatsioonides interferooni ja ribaviiniga.

Sugukond *Togaviridae*, perekond *Alphavirus*.

Kõik laboris kasutatavad alfaviirused on eranditult rekombinantset päritolu, st ei pärine otseselt kliinilisest materjalist vaid on valmistatud kloonitud materjalist laboritingimustes. Infektsioonilist viirust saadakse sisestades koekultuuri rakkudesse (hamstri fibroblastid) *in vitro* sünteesitud genoomset RNA-d või plasmiidse kihtvektori DNA-d, mis kodeerib alfaviiruste genoomi.

Mayaro viirus (MAYV) kuulub 3. ohuklassi. MAYV on levinud Lõuna Ameerikas. Pärilise peremeheks on looduses elavad primaadid, nende vahel (ja mõnikord ka inimesele) kandub viirus sääskede vahendusel. Peamiseks vektoriks on *Haemagogus* perekonna sääsed kuid viirust võivad üle kanda ka *Aedes* ja *Anopheles* perekondadesse kuuluvad sääsed. Inimese nakatamine tundub olema suhteliselt haruldane kuid pole võimatu, et tegemist on ala-diagnoosimisega. Seda põhjustab asjaolu et MAYV tekitatava haiguse sümptoomid on väga sarnased samas regioonis väga tavalise DENV (ja ka CHIKV) infektsiooni põhjustatud sümptoomidega: tüüpilised on palavik, peavalu, liigesevalu ja lööve. MAYV vastast vaktsiini ega spetsiifilist ravi ei ole.

Laboris kavandatakse kasutada rekombinantset MAYV viirust. Õhu kaudu see ei levi ja MAYV putukvektoreid ei ela. Seetõttu ei kujutaks viirus keskkonda sattudes endast ohtu.

Hobuste entsefalomüeliidi idaviirus (*eastern equine encephalitis virus*, EEEV) kuulub 3. ohuklassi. Viiruse looduslik levikuala piirdub Uue maailmaga. EEEV looduslikuks peremeheks on linnud kellel vahel EEEV levib vektorite (*Culiseta* perekonna sääsed) vahendusel. Ülekandumine kabalisele ja inimesetele on suhteliselt haruldane ja toimub *Aedes*, *Coquillettia* või *Ochlerotatus* perekondadesse kuuluvate sääskede vahendusel. Sarnaselt teistele entsefaliiti põhjustavatele viirustele on EEEV riskirühmaks vanemad ja kaasuvaid haigusi põdevad inimesed. Haiguse kulg meenutab TBEV nakkust alates süsteemsete sümptoomidega (kõrge palavik, liigesevalu, peavalu) millele võib järgneda kesknärvisüsteemi nakkus. EEEV põhjustatud entsefaliit on eluohtlik, tervenemisel võivad tekkida eluaegsed tõsised kahjustused. Inimesel kasutamiseks mõeldud vaktsiini ei ole, samuti puudub spetsiifiline ravi.

Laboris kavandatakse kasutada rekombinantset EEEV-V105 viirusetüve. Õhu kaudu see ei levi ja EEEV putukvektoreid ei ela. Seetõttu ei kujutaks viirus keskkonda sattudes endast ohtu.

Chikungunya viirus (CHIKV) kuulub 3* ohuklassi. CHIKV on oluline inimese patogeen mis põhjustab palavikku ja kauakestvat artriiti. Andmed viiruse põhjustatud surmajuhtumite kohta on vasturääkivad, kuid igal juhul on selle tõenäosus alla 0.1%. CHIKV on levinud troopilistes regioonides ja põhjustab perioodilisi epideemiaid. Alates 2013. aastast on CHIKV nakkus üle kandunud ka Uude Maailma, kus on Kesk-Ameerika riikides antud hetkeks registreeritud üle miljoni haigusjuhtumit. Levib putukvektori – *Aedes* moskiitode kaudu (*Ae. albopictus* ja *Ae. aegypti*), kes Eestis ei ela. CHIKV ei levi õhu kaudu, mistõttu keskkonda sattumise puhul ei ole võimeline edasi levima. Spetsiifiline CHIKV-vastane vaktsiin ja ravi puudub.

Kasutada soovitakse viiruse tüve, mis pärineb Le Reunion saarelt (2006. aasta epideemia) ja kannab nimetust CHIKV LR-2006-OPY1; samast epideemiast pärinevaid isolaate Mauriitius 2006, SGP011 ja IND91. Lisaks neile on soovitakse kasutada isolaati Caribbean (pärineb 2013 epideemiast) ja Malaysian, mis on koopia Malaisias isoleeritud viirusest ja Lääne Aafrika genotüüpi kuuluvat viirus (isolaat 37997).

O'nyong'nyong viirus (ONNV) Aafrika päritolu alfaviirus mis kuulub 2. ohuklassi. Bioloogiliselt omadustelt sarnaneb see CHIKV-ga, sarnased on ka riskid. ONNV põhjustatud haigus on kergema kulgemisega kui CHIKV põhjustatud haigus. ONNV ülekande toimub *Anopheles* perekonda kuuluvate sääskede abil. Kuna neid sääski Eestis ei leidu siis risk ONNV looduslikuks levikuks puudub. Ravimeid ja vaktsiini ei ole. Laboris kavandatakse kasutada rekombinantset ONNV Chadist pärinevat viirustüve.

Ross River viirus (RRV) on Austraalia ja Okeania päritolu alfaviirus mis kuulub 2. ohuklassi. Nakatatud inimestel põhjustab RRV artriiti, lihasevalu ja löövet. Sarnaselt teistele alfaviirustele ei levi RRV otse inimeselt (või katseloomalt) inimesele, levik looduses toimub vektorputuka vahendusel. RRV ülekandevektorit Eestis ei leidu, mistõttu risk viiruse looduslikuks ülekandeks puudub. Vaktsiin ja ravimid puuduvad. Laboris kavandatakse kasutada rekombinantset RRV-T48 viirustüve.

Barmah Forest viirus (BFV) on Austraalia päritolu alfaviirus mis kuulub 2. ohuklassi. Inimese nakatamisel põhjustab kergemakujulist (RRV-ga võrreldes) artriiti, lihasevalu ja löövet. Sarnaselt teistele alfaviirustele ei levi BFV otse inimeselt (või katseloomalt) inimesele, levik looduses toimub vektorputuka vahendusel. BFV ülekandevektorit Eestis ei leidu, mistõttu risk viiruse looduslikuks ülekandeks puudub. Vaktsiin ja ravimid puuduvad. Laboris kavandatakse kasutada rekombinantset BFV-2193 viirustüve.

Semliki Forest viirus (SFV) on Aafrika päritolu alfaviirus mis kuulub 2. ohuklassi. Bioloogiliselt omadustelt sarnaneb SFV CHIKV-ga, kuid teadaolevalt SFV inimestel haigusi ei põhjusta. Laboris kasutatavad viiruse tüved SFV4, SFV6, A774 ei ole kunagi olnud seotud ühegi haigestumisjuhtumiga (ajalooliselt on aset leidnud üks laboratoorse SFV nakkusjuht, kuid sellel juhul oli tegemist loodusliku tüvega). Risk looduslikuks levikuks puudub. Ravimeid ja vaktsiini ei ole.

Sindbis viirus (SINV) on 2. ohuklassi kuuluv alfaviirus mille erinevad tüved on levinud Vanas Maailmas ja Austraalias. Viirust leidub looduslikult ka Eestis. Peamine peremees on muustrastas, SINV põhjustatud haigust nimetatakse Karjala palavikuks (suhteliselt kerge kulgemisega haigus). Kroonilist haigust, nagu seda põhjustab CHIKV, SINV ei tekita. Nakatumine toimub vektorputuka vahendusel ja on seetõttu hooajaline. Ravimeid ja vaktsiini ei ole. Laboris kasutatavad SINV tüved on adapteeritud paljunemiseks koekultuuris ja/või hiirtes ja ei ole teadaolevalt inimesele patogeensed.

Sugukond Phenuiviridae, perekond Phlebovirus

Rift Valley palaviku fleboviirus (RVFV) kuulub ohuklassi BSL3. RVFV nakatab sõralisi (veised, kitsed, lambad, kaamlid) ning levikualaks looduslikult Sahara kõrbe alused troopilised ja subtroopilised piirkonnad Aafrikas ning seal viirust levitavad *Culex*, *Mansonia* and *Anopheles* perekonna moskiitod; Eestis levimiseks risk praktiliselt olematu. Nakatunud noorloomad on suuremas ohus kui

täiskasvanud, nende suremus võib olla kuni 90%, samuti põhjustab viirus aborte loomadel (kuni 100%). Inimesed nakkuvad kokkupuutel loomade verega või muu loomse päritolu materjali käitlemisel, inimeselt inimesele levikut ei ole kirjeldatud. Inimesel võib viirus tekitada palavikku, lihasvalu, liigesvalu, raskemal juhul veritsust ja entsefaliiti, suremus viirusesse on väiksem kui 1%. Töös kasutatakse RVFV tüve MP-12, mida päästetakse plasmiidilt (rekombinantne päritolu), see võimaldab uurida täpsemalt viiruse mutante. MP-12 tüvi on nõrgestatud viirus ja on USA Armeepoolt loodud vaktsiinikandidaat, mille kasutamine USAs lubatud erijuhtudel.

Sugukond *Orthomyxoviridae*, perekond *Alphainfluenzavirus*

A-gripiviirus (IAV)

Inimese A-gripi viirus (IAV) kuulub sugukonda Orthomyxoviridae. Töösse plaanitakse võtta ohuklass 2 kuuluvad A-grpi tüved, näiteks: A/PR8-NS116-GFP (H1N1), A/WSN/33 (H1N1), A/PR/8/34 (H1N1), A/Udoorn/72 (H3N2). Viirus levib piisnakkuse teel, köhimisel või rääkimisel. Haigussümptomiteks on palavik, külmavärinad, köha, kurguvalu, nohu, lihasvalu peavalu, väsimus. Riskigrupi kuuluvad alla 5-aastased lapsed ja üle inimesed üle 65, samuti rasedad ning nõrga immuunsüsteemiga inimesed. Hinnanguliselt sureb aastas grippi 300'000 kuni 400'000 inimest maailmas. Iga aasta hooajalise IAV tüve vastu disainitakse vaktsiin. Gripiviiruse vastu on olemas erinevad ravimid: Relenza, Tamiflu, Xofluza. Töös kasutatakse viiruse looduslikke isolaate; kasutatavad tüved pärinevad patsientidelt kogutud proovidest, keskkonda sattudes nad epideemilist potentsiaali ei oma. Võimalusel kasutatakse töös rekombinantset plasmiidilt päästetud viirust, näiteks WSN ja PR8 tüvede baasil. Lisaks luuakse tehnogeneetiliste võtetega markervalke kandvaid viirusi, mis on võrreldes loodusliku tüvega nõrgestatud.

Sugukond *Orthomyxoviridae*, perekond *Betainfluenzavirus*

B-gripiviirus (IBV)

Sarnaselt IAV-le plaanitakse töösse võtta BSL2 ohuklassiga viirused, näiteks tüvi: B/Shandong/7/97. Inimese B-gripi viirus (IBV) kuulub sugukonda Orthomyxoviridae. Viirus levib samuti piisnakkuse teel, köhimisel või rääkimisel. Haigussümptomiteks on palavik, külmavärinad, köha, kurguvalu, nohu, lihasvalu peavalu, väsimus. Riskigrupi kuuluvad alla 5-aastased lapsed ja üle inimesed üle 65, samuti rasedad ning nõrga immuunsüsteemiga inimesed. Ning hinnanguliselt sureb aastas grippi 300'000 kuni 400'000 inimest maakera elanikest. IBV levib väiksema tõenäosusega kui IAV, umbes iga kuues iga aastastest epideemiast on IBV põhjustatud. Sarnaselt IAV-le luuakse hooajalise IBV tüve vastu vaktsiin ning kasutada saab ravimeid Relenza, Tamiflu, Xofluza. Töös kasutatakse viiruse looduslikke isolaate. Võimalusel kasutatakse töös rekombinantset plasmiidilt päästetud viirust. Lisaks luuakse tehnogeneetiliste võtetega markervalke kandvaid viirusi, mis on võrreldes loodusliku tüvega nõrgestatud.

Sugukond *Retroviridae*, perekond *Lentivirus*

Inimese immundefitsiidi viirus tüüp 1 (HIV-1) kuulub 3* ohuklassi. HIV-1 nakkus põhjustab omandatud immuunpuudulikkuse sündroomi (AIDS). HIV on osalt looduslikku päritolu ja pärineb Eestis kogutud vereproovidest. Tõenäoliselt on esindatud kõik Eestis leiduvad peamised genotüübid ja ringlevad rekombinantset versioonid. Kasutatav rekombinantne HIV-1 tüvi on pärit ACH-2 indutseeritavast stabiilsest rakuliinist (*NIH AIDS Reagent Program*), mis toodab viirust vastusena forboolmüristaatatsetaadi töötlustele. HIV-1 levik on seotud kehavedelike (ja muid viirust sisaldavate vedelike) ülekandumisega; muid leviku meetodeid leitud ei ole. HIV ülekande on seega võimalik vaid enese vigastamisel (kogemata või tahtlikul), selle võimaluse vastu ei kaitse mingid eriaabinõud. Keskkonda sattumisel ei ole viiruspartiklid võimelised edasi levima. HIV vastu puudub efektiivne vaktsiin, kuid viirusega kokku puutumise korral (st. HIV sattumisel organismi) on võimalik nakatumist

vältida kasutades 28 päeva kestvat PEP-protokolli (HIV Postexposure Prophylaxis). See välistab nakatumise ligi 100% efektiivsusega, kuid selle kasutamist tuleb alustada 24 tunni jooksul. PEP-protokolli kasutamine ei ole efektiivne, kui seda alustada rohkem kui kolm ööpäeva peale kokkupuudet viirusega. HIV infektsiooni raviks on kasutusel HAART, mis on suhteliselt efektiivne (efektiivsust suurendavad ka praegu arenduses olevad uued lähenemised ja ravimid), ehkki elukestev ja sagedaste kõrvalmõjudega ravi.

Sugukond *Herpesviridae*, perekond *Simplexvirus*

Inimese alfa herpesviirus 1 ja 2 (lihtherpesviiruse tüüp 1 ja 2) kuuluvad sugukonda *Herpesviridae* perekonda lihtherpesviirus (*Simplexvirus*). Umbkaudu kaks kolmandiku inimestest on nakatunud HSV1-ga ja iga kaheksas HSV2-ga. Enamikel inimestel ei põhjusta kumbki viirusi vaegusi. Aga, nõrgenenud immuunsüsteemi korral inimestel võivad põhjustada villoid (nn külma villid) ja armistusi suu ja nina või ka genitaalpiirkonna nahal ning limaskestadel; raskemal juhul võib kaasneda närvisüsteemi kahjustus. Viirus võib aktiveeruda, kui inimene on haigestunud muusse patogeeni, millega kaasneb immuunsüsteemi nõrgenemine, näiteks HIV. Puudub vaktsiin, aga infektsiooni on võimalik spetsiifiliste ravimitega kontrolli all hoida (valaciclovir, famciclovir, penciclovir). Uuritakse looduslikke isolaate, samuti kasutatakse töös sünteetilise plasmidi (rekombinantne päritolu) abil päästetud viirust ja selle mutante, mis võimaldab täpsemalt uurida spetsiifiliste viiruse genoomis olevaid mutatsioone.

Sugukond *Picornaviridae*, perekond *Enterovirus*

Töösse on plaanitud võtta Echovirus-1 (EV-1) ja Echovirus-6 (EV-6), mõlemad on looduslikud isolaadid ning kuuluvad ohuklassi BSL2. Enteroviirustega nakkumine toimub kokkupuutel väljaheidetega, röga, süljega, nakkust kandvate osakestega. Enteroviiruste infektsiooniga laiemalt võivad kaasneda külmetusele sarnanevad tunnused, villid/lööve suus ja sõrmedel-varvastel, raskematel juhtudel ka meningiit, müokardiit, pankrease põletik, poliomüeliit; seostatakse veel diabeedi, astma ja allergiatega. Echoviirustega nakatumine väljaheidete, pindade ja osakeste vahendustel, infektsiooniga enamikel inimestel ei kaasne mingeid sümptomeid. Kergematel juhtudel sarnanevad sümptomid teistele külmetushaigustele; raskemad juhud on harvad ning siis võib viia see viirusliku meningiidini. Puuduvad spetsiaalsed ravimid ning vaktsiin. Töösse planeeritud looduslikud isolaadid.

Sugukond *Pneumoviridae*, perekond *Metapneumovirus*

Inimese metapneumoviirus (human metapneumovirus, HMPV) kuulub ohuklassi BSL2. Levib kokkupuutel sülje, röga, samuti saastunud pindade kaudu. Nakatab hingamisteid, sümptomid omased tavalisele külmetusele, aga võib põhjustada vajadust väikelaste, vanainimestel ning nõrgestatud immuunsüsteemiga inimeste hospitaliseerimiseks. Viirusega on kokku puutunud elu jooksul peaaegu kõik inimesed. Viiruse vastu puudub spetsiifiline ravi ja vaktsiin. Töös on planeeritud kasutada rekombinantset HMPV-d, sh markervalku ekspresseerivat viirust.

Looduslikud ja rekombinantset päritolu viirused

Kõikide rekombinantsete viiruste puhul peetakse silmas ka nende mutantsete vormide, mis on tekkinud või tekitatakse geneetiliste manipulatsioonide tulemusena, kasutamist. Sellised vormid võivad sisaldada punktmutatsioone, deletsioone, insertioone ja mitte-viiruslikku päritolu markergeene (fluorestsentsed valgud, lutsiferaasid), viiruste vahelisi geenide vahetusi. Ühelgi juhul pole teada, et sellise geneetilise manipuleerimise tulemusena võiks viirus muutuda patogeensemaks (või kergemini levivaks), kui esialgne, looduslik variant. Vastupidi, suurem enamus (kui mitte kõik) kasutatavaid mutatsioone omavad viiruse paljunemist inhibeerivat efekti.

Kavandavate tööde iseloom: viiruste fundamentaaluuritud ja rakenduslikud uuringud. Täpsemalt:
1. Looduslikud viirused (TGEV, hCoV-229E, HCV, HIV, IAV, IBV, SARS-CoV2, HSV-1, HSV-2, EV-1, EV-6).

SARS-CoV-2 puhul on tegemist Eesti COVID-19 patsientidelt pärinevate viirus isolaatidega. Neid viiruseid kasutatakse ravimiuuringutes, vereplasmauuritud ja COVID-19 vastaste tehnoloogiate testimisel. **TGEV** ja **hCoV-229** on kasutatavad koroonaviiruste vastaste ühendite, materjalide ja tehnoloogiate testimisel ohtlikuma (SARS-CoV-2) viiruse asendajana ja võrdlusmaterjalina. Sarnaselt kasutatakse juba varasemalt isoleeritud TGEV, hCoV-229E, HCV, HIV, IAV, IBV, SARS-CoV2, HSV-1, HSV-2, EV-1, EV-6 viiruseid.

Peale selle võivad laborisse sattuda ka siinkohal nimetamata viirused, mille uurimisega bioohutuse tuumiklaboris ei tegeleta. Sellised viirused pärinevad TÜ Arstiteaduskonna ja või teiste uurijate poolt kogutud proovidest (veri, sülg, muu materjal). Viiruseid otseselt ei uurita, neid ei paljundata ega kontsentreerita. Põhimõtteliselt kujutavad nad kontaminatsiooni proovides. Töö iseloom – uurida immunoloogilisi parameetreid (markereid) nakatatute vereproovides kasutades selles rakusortereid. Kuna Arstiteaduskonnas vastavate omadustega seadmed puuduvad, soovitakse teha seda bioohutuse tuumiklabori seadmetega, mis paiknevad kolmanda ohutaseme laboris. Põhimõtteliselt on selline tegevus lubatav ka ilma eriloata vastavalt määruse „Bioloogilistest ohuteguritest mõjutatud töökeskkonna töötervishoiu ja tööohutuse nõuded“ (Vastu võetud Vabariigi Valitsuse 5. mai 2000. a määrusega nr 144 (RT I 2000, 38, 234) paragrahv 15 lõige 2 tingimustele: „(2) Kui labor kasutab oma töös materjali, mis võib sisaldada haigustekitajaid, kuid seda materjali ei kultiveerita ega kontsentreerita, peab labor vastama vähemalt 2. ohutustaseme nõuetele“.

2. Rekombinantset päritolu viirused on SARS-CoV, MERS, SARS-CoV-2, IAV, IBV, HMPV, HSV-1, HSV-2, DENV-1-4, YFV, YFV-17D, WNV, TBEV, LGTV, ZIKV, HCV (JFH1 põhinevad variandid), RVFV, MAYV, EEEV, CHIKV, RRV, ONNV, BFV, SFV ja SINV. Neid viiruseid kasutatakse viirust-inaktiveerivate tehnoloogiate testimiseks (SARS-CoV-2) kuid peamiselt on nad otseselt Tartu Ülikoolis läbiviidavate teadustööde uurimisobjektiks. Bioohutuse tuumiklaboris planeeritakse nende viirustega viia läbi fundamentaal- ja rakendusuuritud. Uuringute sisu on järgnev:

- Viirus-vastaste ühendite aktiivsuste uurimine viirusega nakatatud koekultuuri rakke kasutades (potentsiaalsete ravimikandidaatide analüüs);
- Viiruse ja peremeesraku vaheliste interaktsioonide uurimine nakatatud koekultuuri rakke kasutades. Selle töö sisuks on hinnata rakulisi protsesse (sealhulgas viiruse vastu suunatud), mis leiavad aset rakkudes vastusena viirusnakkusele;
- Viiruse replikatsiooni uurimine viirusega nakatatud koekultuuri rakke kasutades. Selle töö sisuks on uurida viiruslike komponentide (valgud, nukliinhapped) paiknemist ja funktsioneerimist nakatatud rakus eesmärgiga välja selgitada viiruse omadused, mis mõjutavad tema paljunemist.
- Viiruse vastase immuunvastuse analüüsimine (viiruse neutraliseerimine)
- Viiruse kohastumise ja infektsioonivõime uurimine
- Viirustel põhinevate katsemudelite (nt biosensorid) ja viirustel põhinevate tehnoloogiate (nt viiruse vastased vaktsiinikandidaadid) arendamine

Kõik need tööd on üldjuhul teostatavad madala viiruse hulga. Need uuringud ei vaja viirust sisaldavate proovide kontsentreerimist suurte kontsentratsioonideni.

Samuti plaanitakse bioohutuse tuumiklaboris viia läbi viiruse fundamentaaluuritud ja rakenduslike uuringuid loomudelites:

- Viirus-vastaste ühendite aktiivsuste uurimine viirusega nakatatud loomudelites (potentsiaalsete ravimikandidaatide analüüs);
- Viiruse ja peremees-organismi vaheliste interaktsioonide uurimine nakatatud loomades. Selle töö sisuks on hinnata nakkuse käigus toimuvate rakulisi protsesse (sealhulgas viiruse vastu suunatud), kui ka analüüsida humoraalset ja rakulist viiruse-vastast immuunvastust;

- Viiruse replikatsiooni uurimine nakatatud loomaorganismis. Selle töö sisuks on uurida viiruslike komponentide (valgud, nukleiinhapped) paiknemist ja funktsioneerimist nakatatud looma elundites, kudedes ja rakkus eesmärgiga välja selgitada viiruse omadused, mis mõjutavad tema paljunemist.
- Viiruse leviku uurimine organismis
- Viiruse vastaste vaktsiinikandidaatide arendamine ja nende efektiivsuse uurimine

Kasutatavate ohuklass 2 mikroorganismide nimekiri ja kirjeldus:

Gramnegatiivsed bakterid

Liigi nimi	Põhjustatavad haigused inimestel	Nakatumine
<i>Helicobacter pylori</i>	võib suurendada riski maohaavandi ja kaksteistsõrmiksoole haavandi, gastriidi, duodeniidi ning teatud maovähivormide tekkeks	Suu kaudu
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Põletushaavade infektsioon; kopsuinfektsioon tsüstilise fibroosi (CF) haigetel;	Haavade kaudu, CF haigetel hingamisteede kaudu,
<i>Escherichia coli</i> (mitte enterohemoraagilised tüved)	Haavanakkused, urogenitaalse trakti infektsioon	Haavade kaudu, kusejuha suudme kaudu
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	salmonelloos	Suu kaudu
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Haiglainfektsioonid immuunpuudulikkusega patsientidel	Haavade ja meditsiiniseadmete kaudu
<i>Legionella pneumophila</i>	Leegionelloos	Piisknakkuse teel (aerosoolide sissehingamisel)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Igemepõletikud	Suu kaudu
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	Igemepõletikud	Suu kaudu
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Kopsupõletik; uroinfektsioon; haiglainfektsioonid immuunpuudulikkusega patsientidel	Piisknakkuse teel (aerosoolide sissehingamisel); meditsiiniseadmete kaudu
<i>Pasteurella multocida</i>	Haavanakkused	Haavade kaudu
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Kopsuinfektsioon immuunpuudulikkusega patsientidel	Hingamisteede kaudu

Mitte-sporuleeruvad grampositiivsed bakterid

Liigi nimi	Põhjustatavad haigused	Nakatamine
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Haiglainfektsioonid immuunpuudulikkusega patsientidel	Haavade ja meditsiiniseadmete kaudu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nahainfektsioonid, kopsupõletik	Haavade ja hingamisteede kaudu
<i>Streptococcus mutans</i>	Igemepõletikud ja kaaries	Suu kaudu
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Mittetpatogeenne, kuid võib põhjustada naha pehmete kudede infektsiooni immuunpuudulikkuse korral	Haavade kaudu

Pärmseened

Liigi nimi	Põhjustatavad haigused	Nakatamine
<i>Candida albicans</i>	Kuulub iminesee suuõõne, soolestiku, naha ja tupe loomuliku mikrofloorasse, kuid võib eri tegurite (nt. antibiootikumiravi) toimel kandidoosi põhjustada	Sattumine limaskestadele ja riskitegurite esinemine (nt. antibiootikumiravi)
<i>Candida auris</i>	Haiglainfektsioonid immuunpuudulikkusega patsientidel	meditsiiniseadmete kaudu

Nakkusohuga seotud uuringute loetelu, milleks tegevusluba taotletakse

Uuringutes kasutatakse erinevaid klass 2 ohutase patogeene nagu *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* j.n.e. Teadustöö eesmärgiks on uurida ravi (näiteks antimikroobsete ainete kasutamise) mõju nakkusmudelil, seepärast on oluline kasutada mikroorganismide selliseid tüvesid, mis on võimelised nakkust tekitama. Erinevate patogeenide kasutamine on oluline seetõttu, et nii nende poolt põhjustatavad nakkused kui ka tundlikkus erinevatele antimikroobsetele ainetele on erinevad.

Uuringud jaotuvad kahte laiemasse gruppi:

I Infektsioon koekultuuri mudelis, kus eukarüotseid koekultuuri rakke nakatatakse patogeenide mikroobidega (ohutase klass 2). Sealjuures viiakse läbi järgmisi töid:

- 1.1. Mikroobide kasvatamine
- 1.2. Koekultuuri rakkude nakatamine
- 1.3. Nakkuse kulu jälgimine ja/või ravi antibiootikumidega
- 1.4. Mikroobide arvukuse määramine

1.5. Mitte-nakkuslike proovide (fikseeritud rakud, puhastatud RNA või valgud jne) ettevalmistamine edasiseks analüüsiks

II Infektsioon loom-mudelid, kus hiiri või rotte nakatatakse patogeensete mikroobidega. Sealjuures viiakse läbi järgmisi töid:

- 2.1. Mikroobide kasvatamine
- 2.2. Katseloomade ettevalmistamine nakkuse tekitamiseks (nt. kateetri paigaldamine uroinfektsiooni tekitamiseks)
- 2.3. Katseloomade nakatamine
- 2.4. Nakkuse kulu jälgimine ja/või ravi antibiootikumidega
- 2.5. Katseloomade hukkamine ja organite-kudede eemaldamine
- 2.6. Mitte-nakkuslike proovide (fikseeritud rakud, puhastatud RNA või valgud jne) ettevalmistamine edasiseks analüüsiks

Kõik klass 2 ohutaseme baktereid hõlmavad tööd viiakse läbi laminaaride all. Elusaid baktereid sisaldavad plaadid, tassi või kolvid suletakse ja pakendatakse laminaari all, enne kui need paigutatakse samas ruumis asuvasse inkubaatorisse.

Algsete ja/või geneetiliselt muundatud mikroorganismidega viiakse Tartu Ülikooli tehnoloogiainstituudi bioohutuse tuumiklaboris läbi koekultuuride ja/või katseloomade nakatamise katseid. Loomkatseteks vajalikud load vormistatakse vastavalt kehtivale korrale ning katsed viiakse läbi vastava komisjoni poolt kinnitatud lubade alusel.

Kasutusele tulevad mikroorganismid (ohuklassi esialgne määrang)

Valdav enamus kasutatavatest tüvedest on tellitud kommertsiaalsetest algallikatest nagu ATCC (American Type Culture Collection) või DSMZ (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures). Osad tüved on laekunud koostööprojektide raames partnerluses olevatest teiste Euroopa riikide ja USA teadusliku uurimise laboritest. Kõigi kasutatud tüvede puhul on olemas nende algne ohutaseme määrang. Juhul kui tekib vajadus töötada uute kliiniliste tüvedega, tehakse seda ainult juhul kui ohutaset on võimalik olemasolevate andmete põhjal määrata. Selleks on vaja nii patogeeni poolt põhjustatud nakkuse kirjeldust kui ka antibiogrammi, et veenduda, et tegemist ei ole multiresistentse tüvega.

Kõik kasutatavad bioohutus klass 2. mikroorganismid on põhimõtteliselt võimelised tekitama inimesel kergeid haigusi, mida on võimalik ravida. Nakkuse tekitamiseks peavad mikroobid sattuma inimese organismi suures koguses. Kõik kasutatavad mikroorganismid on võimelised tekitama haigusi ka hiirtes või rottides ning selleks on vajalik väga suur nakkuskoormus.

Kasutatavates mikroobide tüvedes puuduvad iseeneslikud ravimi-resistentsust põhjustavad geneetilised piirkonnad.

Mikroorganismid on võimelised säilima ja paljunema väljaspool peremeesorganismi, seetõttu on äärmiselt oluline vältida nende sattumist keskkonda.

Kasutatavad mikroorganismid on tundlikud tavalistele desinfektsioonivahenditele. Neid on võimalik hävitada kasutades 10% naatriumhüpokloriidi lahust, 70% etanooli, 2% formaldehüüdi ja 1% Virkon S või 1% Streptisept lahust.

Töös kasutatakse mikroorganismide geneetiliseks muundamiseks molekulaarbioloogia valdkonnas tavapäraseid muundamise meetodeid, kus võõr-DNA viiakse rakkudesse elektroporatsiooniga.

Sõltuvalt sisestatud DNA-st jääb see peremeesrakus paljunema plasmiidina või integreerub kromosoomi. Geneetilise modifitseerimise käigus viiakse bakterisse plasmiid, mis võimaldab tänu fluorestseeruvate valkude ekspressioonile bakterirakke hilisema analüüsi käigus tuvastada ning iseloomustada nende elulemust ja metaboolset aktiivsust organismis. Plasmiid sisaldab ainult bakteriaalse päritoluga geene, mille poolt kodeeritud valgud i) fluorestseeruv valk, ii) plasmidi replikatsiooniks vajalik valk ning iii) antibiootikumi resistentsust tagav valk pole toksilised. Plasmiidil puudub võime kanduda üle ja paljuneda eukarüootsetes rakkudes.

Plasmiidide puhastamine toimub tehnoloogiainstituudi laboris vastavalt „Geneetiliselt muundatud mikroorganismide suletud keskkonnas kasutamise seadusele“, kus plasmidi paljundamine toimub 1. ohuklassi kuuluvas bakteritüves *E. coli* DH5 α . Plasmidi viimine patogeensesse tüvesse viiakse läbi Tartu Ülikooli ABSL3 laboris (SIME Ravila 14b). Plasmidi sisseviimine elektroportsioon teel tekitab aerosoole, seepärast peab elektroportsiooniks vajalik aparatuur asuma laminaari all. Geneetilise modifitseerimise käigus viiakse bakterisse DNA, mis võimaldab tänu spetsiifilisele järjestusele rekombineerumist bakteri kromosoomi. Plasmiid sisaldab ainult bakteriaalse päritoluga geene, ning mille poolt kodeeritud antibiootikumi resistentsust tagav valk pole toksiline. Lineaarsel DNA-l puudub võime kanduda üle ja paljuneda eukarüootsetes rakkudes. Geneetiline modifitseerimine põhjustab soovitava bakteriaalse geeni katkestuse võimaldades uurida selle mõju infektsioonile ja patogeeni tundlikkust ravile.

Lineaarse DNA produkti ettevalmistamine toimub Tehnoloogiainstituudi laboris vastavalt „Geneetiliselt muundatud mikroorganismide suletud keskkonnas kasutamise seadusele“. DNA viimine patogeensesse tüvesse viiakse läbi Tartu Ülikooli ABSL3 laboris. DNA sisse viimine elektroportsioon teel tekitab aerosoole, seepärast peab elektroportsiooniks vajalik aparatuur asuma laminaari all.

Mikroorganismide populatsioonis, mis on geneetiliselt homogeenne esineb alati loomulik mitmekesisus geeniekspressioonis. Lisaks sellele esineb ka geneetiline varieeruvus, kus mingi piirkond on ampifitseeritud ja geeniekspressioon sellega suurenenud või vastupidiselt punktmutatsiooni tagajärjel vähenenud. Geneetiline modifitseerimine, mis viib rakkudes sellele organismile omaseid geene muudab küll mikroobide omadusi, kuid mitte sellisel määral, et need erineksid looduslikult esinevast varieeruvusest. Geneetiline modifitseerimine, kus muudetakse organismi enda geenide ekspressioonitaset, võib muuta mikroorganismi vastupidavamaks või virulentsemaks, kuid mitte sel määral, et muutuks mikroorganismi ohuklass.

Geneetiline modifitseerimine, mille käigus viiakse mikroorganismi fluorestseeruvat valku ekspresseeriv plasmiid (geene, mis ei ole sellele liigile omased), ei muuda mikroorganismi vastupidavamaks ega virulentsemaks kui varem. Varasematest töödest on teada et fluorestseeruvate valkude ekspressioon isegi vähendab bakterite virulentsust (DOI: 10.1128/IAI.73.10.7027-7031.2005).

Kasutatavates mikroobide tüvedes puuduvad iseeneslikud ravimi-resistentsust põhjustavad geneetilised piirkonnad. Küll aga on resistentsus saavutatav sisseviidava DNA koosseisu kuuluva resistentsusmarkeri abil, mis on selektiivseks tunnuseks. Resistentsusmarkeri valimisel jälgitakse alati, et see ei põhjustaks resistentsust ravimile, mida kasutatakse patogeeni poolt põhjustatud haiguste

raviks. Selle asemel valitakse resistentsusgeen, mille poolt kodeeritud valk annab resistentsuse ravimile, mis pole aktiivselt meditsiinisüsteemis kasutusel.

Plasmiidi sisaldavate modifitseeritud bakterite säilivus väliskeskkonnas võib olla mõnevõrra vähenenud võrreldes algsete tüvede/liinidega, kuna plasmiidi valkude ekspressioon ja replikatsioon on organismile lisakoormuseks. Geeni-katkestusega tüvede puhul võib nende säilivus väljaspool peremeesorganismi olla nii suurenenud kui vähenenud. Seega on jätkuvalt oluline vältida nende sattumist keskkonda, mis on ABSL3 laboris täielikult tagatud.

Koostas:

/allkirjastatud digitaalselt/

Liane Viru
Bioohutuse tuumiklabori administratiivjuhataja
Tehnoloogiainstituut
Tartu Ülikool