

Von Dr. med. Andreas Matusch,¹ Prof. Dr. Rudolf Matusch,^{1,2} Prof. Dr. rer. nat. Ralf Weiskirchen³

1) MIO e.V., Am Hasenküppel 18a, 35041 Marburg, a.matusch@googlemail.com

2) Institut für Pharmazeutische Chemie, Philipps-Universität, Marbacher Weg 6-10, 35032 Marburg

3) Institut für Molekulare Pathobiochemie, Experimentelle Gentherapie und Klinische Chemie
(IFMPEGKC), Uniklinik RWTH Aachen, Pauwelsstraße 30, 52074 Aachen

Semmelweis-Reflex im Landwirtschaftsministerium oder etwas mehr Chemie in der Hygiene wagen

Zur Stellungnahme der Zentralen Kommission für die Biologische Sicherheit (ZKBS) Az. 6790-10-49¹

„zu Hände- und Flächendesinfektionsmaßnahmen bei gentechnischen Arbeiten mit Viren bis Sicherheitsstufe 4“ vom November 2023“:

Auf 8 Seiten Text verweist die ZKBS hier zunächst allgemein auf einschlägige Desinfektionsmittel-Listen. Die einzige spezifische Aussage zu bestimmten Virus-Spezies betrifft Adeno-assoziierte Viren (AAV) in Abschnitt 2.2.1

„Hände- und Flächendesinfektion bei gentechnischen Arbeiten mit Parvoviren - Parvoviren, wie die häufig zum Gentransfer verwendeten Adeno-assoziierten Viren (AAV, Risikogruppe 1 oder 2), sind sehr unempfindlich gegenüber Alkohol-basierten Desinfektionsmitteln [11].“

Zumindest für Arbeiten mit AAV in S1 und S2-Bereichen ließe sich hierzu recht einfach zusammenfassen:

Einzig Verbindung, welche bislang erwiesenermaßen AAV in vitro wirksam inaktiviert, ist Natriumhypochlorit (NaOCl): Flächendesinfektion erfolgt mit NaOCl 0,5% oder 1,0% über 10-30 min. Beliebiger Haushalts- oder Industrie-Chlorreiniger (Eau de Javel im französischen Sprachraum) wird entsprechend frisch verdünnt. Der Verbund für Angewandte Hygiene (VAH) listet z.B. Danklorix mit 2,8% NaOCl (erhältlich z.B. bei Edeka, REWE, Kaufland, Netto, DM, Rossmann), Brilliance medical 0,94% oder DEFEAT Konzentrat 0,5%.

Speziell die Dekontamination bzw. Desinfektion von Händen mit Test-Anschmutzungen aus AAV wurde noch nicht systematisch untersucht, etwa nach EN1500. Die höchste Keimzahlreduktion wird man sich auch hier durch NaOCl versprechen. Da reine NaOCl-Lösung (wie auch die Formulierungen zur Flächendesinfektion) zu alkalisch ist, wird sie zur besseren Hautverträglichkeit auf pH 9,8 gepuffert, bekannt als *Dakin's solution*. Als Fertigprodukt steht aus Belgien oder Frankreich für Desinfektion und Antisepsis von Haut und Wunden „*Dakin Cooper Stabilisé 0,5%*“ zur Verfügung. Alternativ können diese und ggf. höhere Konzentrationen NaOCl bis 3% von Ärzten patienten-individuell oder von Apothekeninhabern als Rezeptur aus arzneimitteltauglichen Ausgangskonzentrationen hergestellt werden. Einwirkzeit je 2-5 min. Die Dekontamination/Desinfektion mit Dakin kann gründliches Händewaschen nicht ersetzen und stellt eine zusätzliche Maßnahme dar. Stattdessen wird der Wirkstoff Chlor aus NaOCl und NaCl kein einziges Mal erwähnt. Doch im Einzelnen: AAV erfreuen sich als gentechnische Werkzeuge („Genfähren“) in der biomedizinischen Forschung zunehmender Beliebtheit. Einige nicht replizierende AAV-Konstrukte sind in der EU bereits als Arzneimittel für die Therapie beim Menschen in zugelassen und auf dem Markt.²⁻⁶

Hauptaufgabe der ZKBS ist die Risikobewertung etablierter gentechnischer Verfahren oder gentechnisch veränderter Organismen und deren Einstufung in die Sicherheitsstufen S1 bis S4 (§§ 6,7 GenTSV, ZKBS-Verordnung). Früher war die ZKBS beim RKI angesiedelt, seit einigen Jahren am Bundeslandwirtschaftsministerium und untergeordnet Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL), obwohl es seit 2013 keine Freilandversuche mit gentechnisch veränderten Pflanzen mehr gibt, auf Betreiben u.a. von Jörg Bergstedt. Entwürfe für die Stellungnahmen der ZKBS werden eigenen Angaben zufolge vielfach im Referat 402 des BVL ausgearbeitet. So ist auch gegenständliche Stellungnahme mit dem Dienstkürzel „*BVL_FO_05_4100_402_V1.6*“ versehen. Im Gegensatz zur guten wissenschaftlichen Praxis im RKI werden die Autoren bei den Stellungnahmen der ZKBS überhaupt nicht angegeben. Nun geben solche nicht genannten Autoren Hinweise zur Hand- und Flächenhygiene für gentechnische Forschungslabore. Dies berührt erheblich den Bereich der Krankenhaushygiene, da die entsprechenden Forschungslabore häufig in Uniklinika angesiedelt sind und dort viel Personal sowohl

in der Forschung, als auch in der Patientenversorgung tätig ist. Es ist auch Zweck dieser in erheblichen Teilen anwendungsorientierten Forschung, nicht zuletzt im Rahmen klinischer Studien, gentherapeutische Verfahren aus dem Labor an das Krankenbett zu bringen („from bench to bedside“).

Die Krankenhaushygiene fußt seit Semmelweis 1847 auf einem extrem breiten Schatz an Praxiserfahrung und harten empirischen Daten. Sie ist fachübergreifend extrem breit konsentiert. Dies manifestiert sich z.B. in der stets aktualisierten Leitlinie auf dem Signifikanz-/Evidenzlevel 2 von 3 der Arbeitsgemeinschaft wissenschaftlicher medizinischer Fachgesellschaften unter Federführung der Arbeitsgemeinschaft für Krankenhaushygiene,⁷ den Empfehlungen der KRINKO beim RKI,⁸ den Leitlinien der WHO oder etwa der Society for Healthcare Epidemiology of America (SHEA), der Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology (APIC), der Centers for Disease Control and Prevention (CDC), der UK Health Security Agency (UKHSA). Dabei ist stets die Händedesinfektion vor reinen Tätigkeiten, vor und nach Patientenkontakt, sowie nach Haut- oder Handschuhkontakt mit potentiell infektiösem oder transduktionsfähigem Material prioritär. Hierzulande fällt die Handhygiene primär in den Zuständigkeitsbereich der ärztlichen Selbstverwaltung (einschließlich Tier- und Zahnärzte) und des Gesundheitsministeriums mit RKI, ferner in den Bereich des Arbeitsministeriums mit Bundesanstalt für Arbeitsschutz und Arbeitsmedizin, darin des Ausschuss für biologische Arbeitsstoffe (ABAS), welcher die Technischen Richtlinien für Biologische Arbeitsstoffe herausgibt, einschlägig hier TRBA-100 und -250, beim Landwirtschaftsministerium selbst in die Bereiche des Friedrich-Loeffler-Instituts (FLI) und Julius Kühn-Instituts (JKI). Sofern es um „pandemic preparedness“ geht, ist auch das Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe (BBK) im Geschäftsbereich des Innenministeriums tangiert. Schließlich haben nicht zuletzt die Apothekerschaft und die Pharmaindustrie sowohl in ihrer Eigenschaft als Hersteller von Desinfektionsmitteln wie auch als Anwender mit höchsten Sicherheitsanforderungen belastbares know-how einzubringen.

Zumal bei solchen Querschnittsthemen wie der Hände- und Flächenhygiene sieht die ZKBS-Verordnung in § 4 selbstverständlich die Beteiligung anderer Personen und Stellen vor.

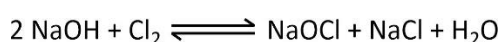
In der ZKBS-Stellungnahme von November 2023¹ behaupten die Autoren nun, es seien ausschließlich alkohol-basierte Mittel zur Händedesinfektion zugelassen, es gäbe somit keine gegen Parvoviren und damit auch gegen die Familienmitglieder AAV wirksame Händedesinfektionsmittel. Daher seien die Hände nach Arbeiten mit AAV nur zu waschen.

Ferner seien zur Flächendesinfektion nach Arbeiten mit AAV „*Mittel auszuwählen, deren Wirksamkeit auch gegen Parvoviren überprüft wurde.*“

Dieselben Aussagen finden sich bereits als Hinweis 6 auf Seite 4 der Stellungnahme Az. 6790-10-73 von Oktober 2021.⁹

Zunächst ist die Empfindlichkeit der verschiedenen Parvoviren gegenüber Desinfektionsverfahren unterschiedlich und schwer verallgemeinerbar. Dies liegt u.a. daran, dass von Spezies zu Spezies in der Aminosäuresequenz der Hüllproteine sehr unterschiedliche freie Schleifen aus der von β -Faltblattsträngen gebildeten ikosaedrischen Capsid-Kapsel herausragen. Dadurch unterscheiden sich die Verteilung polarer, saurer und basischer Funktionen auf der Oberfläche, isoelektrischer Punkt und die Aggregationsfähigkeit der Partikel. In einigen Fällen – wie z.B. für das Parvovirus B19 und das humane Bocaparvovirus beschrieben, jedoch nicht für AAV - wird der ca. 5 KB lange DNA-Einzelstrang auch unvollständig verpackt und ragt aus der Kapsel heraus.¹⁰ Gänzlich entgangen sind den Autoren die Publikationen Nr. 11-13.¹¹⁻¹³ 70% Ethanol, 1,5% H₂O₂, und 0,25% Peroxyessigsäure (PAA) erwiesen sich als unwirksam gegen AAV2 und AAV5, 0,45% Kaliumperoxymonosulfat zudem als unwirksam gegen AAV5. Dagegen denaturierten 0,5% Natriumhypochlorit (NaOCl) bereits nach 1 min Capsid und Untereinheiten des Virus.¹¹ Bereits 0.06% NaOCl verringerten die Infektiosität von AAV1, AAV2, AAV8 und AAV9.¹² Nach 5 min 0,7% NaOCl waren AAV1 nicht mehr transfektionsfähig.¹³

Technisch wird NaOCl durch Einleiten von Chlorgas in Natronlauge gewonnen. Dabei disproportioniert Cl mit der Oxidationszahl Null im Cl₂ zu Cl mit der Oxidationszahl +1 im (OCl)⁻ und Cl mit der Oxidationszahl -1 im Cl⁻. Im Bleichlauge (bleech) genannten Produkt liegen NaOCl und NaCl äquimolar vor. Unter Einwirkung von Säure läuft diese Reaktion auf den zu desinfizierenden Oberflächen wieder rückwärts, Cl⁺ und Cl⁻ symproportionieren zu Chlor in *statu nascendi* (Cl_{nasc.}).



Im Handschweiß bei pH 5 -6¹⁴ bzw. nach Einwirkung von laborüblichen Flüssigseifen bei pH 6,2 – 6,5,¹⁴ sowie unter Einwirkung von Kohlensäure aus CO₂ aus der Luft sind diese Bedingungen hinreichend gegeben. Die vorherige Einwirkung alkalischer Kernseife hingegen wird die Wirksamkeit von NaOCl verzögern. Die Massenprozentangaben (z.B. „10% Bleichlauge“) beziehen sich auf verfügbares Chlor. Ein Mol NaOCl à 74,5 g wird vollständig zu 1 Mol Cl₂ à 70,9 g umgesetzt. Die o.g. Abfolge der Wirksamkeit verwundert nicht, weil Hypochlorit bzw. Cl_{nasc} sowohl polare Reaktionskanäle des formalen Cl⁺ wie auch thermisch oder photochemisch induzierte radikalische Chemie des Cl^{*} eröffnen. Das können Peroxide nur, wenn sie mit stark elektronenziehenden O-Substituenten ausgestattet sind: die Peroxoschwefelsäure wirkt stärker als ihr Kaliumsalz und wesentlich stärker als H₂O₂ oder Peroxomagnesium-Verbindungen.

Weiterhin entgangen sind den Autoren die Hinweise der Anbieter von AAV für die Forschung,¹⁵⁻¹⁸ aus klinischen Prüfungen von AAV,¹⁹ und die Hygienepläne einer Fülle universitärer Anwender von AAV in den USA²⁰⁻³⁰ und Kanada.^{31,32} Sämtlich empfehlen diese 0,5% NaOCl über 5 min bis 30 min^{15, 17, 18, 21, 26, 27,29,30} bzw. ohne Zeitangabe^{16,19,20,22-25, 28, 32} oder 1,0% NaOCl^{17, 23, 31} über 10 min¹⁷ und 15 min.³¹ Entgangen sind den Autoren auch die Hinweise aus den Fachinformationen für als Arzneimittel zugelassene AAV-Präparate, welche 0,1% NaOCl für ein AAV5-Konstrukt², NaOCl ohne Angabe der Konzentration für ein AAV1-³, ein AAV5-⁴ bzw. ein AAV9-Konstrukt⁵ und 1% NaOCl für ein AAV2-Konstrukt⁶ immerhin zur Flächendekontamination vorsehen. Mitunter wird Hautirritation durch NaOCl befürchtet, meist pauschal ohne Angabe von Einwirkzeit, Konzentration und pH-Wert der Lösung³³ allerdings mit erstaunlich schmaler Datenlage zur Hautschädigung³⁴ bei erstaunlich breiter Datenlage zur Keimtötung auf sehr breitem Spektrum.³⁵

Hintergrund für die Wirklucke alkoholischer Desinfektionsmittel mit neutralem pH ist die Zusammenlagerung der Parvoviren zu kristallartigen Aggregaten. Im Säuren wie auch im Alkalischen zerfallen diese offenbar.³⁶ So enthält „Skinman complete pure“ Milchsäure zusätzlich zu 89% Ethanol, hat seine Wirksamkeit lt. Herstellerangaben gegen einen Prüfstamm – üblicherweise das murine Parvovirus – Minute virus of mice (MVM) – aber nicht gegen AAV bewiesen.

Im Laboralltag kommen vorwiegend und in der Gentherapie ausschließlich nicht replizierende AAV-Konstrukte zum Einsatz, welche weder das Gen für Hüllproteine (*Cap*) noch dasjenige für Replikationsenzyme (*Rep*) enthalten. Sofern sich aus dem konkreten Konstrukt nichts anderes ergibt, wurden auch replizierende AAV1-3, 3b, 5, 6, 8, 9 und AAV-rh10 als S1, sowie AAV4, 7, 10-13 als S2 eingestuft. Bei AAV1-3, 5-9 und AAV-rh10 zählt jedoch der Mensch zum Wirtsspektrum, für AAV4, 10-13 sei dies noch unklar. Es sei bislang keine durch AAV ausgelöste Krankheit bekannt, die Seroprävalenz wird bei 38%-70% angegeben.⁹ Gerade die gute Transduktionseffizienz sogar auf ruhende Zellen im Menschen und lange Persistenz der Genexpression machte AAV zu guten Kandidaten für gentherapeutische Vehikel.¹⁰

Die noch in ZKBS-Stellungnahme von 10/2020⁹ getroffene Aussage „*Trotz der ubiquitären Verbreitung der AAV und der hohen Durchseuchung sind zum heutigen Tage weder beim Menschen noch beim Tier AAV-assoziierte Erkrankungen bekannt, weshalb man davon ausgeht, dass AAV apathogen sind [2; 6; 7].*“ ist spätestens seit März 2023 so nicht mehr haltbar. Im Frühjahr 2022 kam es vor allem in Großbritannien und den USA zu einer Serie von Hepatitis bei Kleinkindern mit damals unbekannter Ursache. Weltweit belief sich die Fallzahl auf mindestens 1 010. Drei Arbeitsgruppen wiesen nunmehr unabhängig voneinander AAV2 als höchstwahrscheinliche Ursache nach. Jeweils konnte AAV2 aus Lebergewebe, Blut- und Abstrichproben durchsequenziert werden. Als nächste AAV2-Sequenz-verwandte wurden in allen 3 Arbeiten dieselben französischen Isolate aus den Jahren 2004-2015 identifiziert.³⁷⁻³⁹ Ho und Kollegen detektierten mittels RT-qPCR im Plasma von 32 Patienten zwischen 10^4 und 10^7 (Median 70 000) Kopien AAV2 pro mL versus Werten unterhalb der Nachweisgrenze von 3.200/mL bei Kontrollen. Humanes Adenovirus HAdV-F41 bzw. HAdV-C wurden als damals breit und synchron mit den Hepatitis-Fällen zirkulierende Helferviren identifiziert, in einzelnen Fällen alternativ oder zusätzlich Humanes Herpesvirus HHV6. In vier Fällen waren Leberbiopsien verfügbar. Diese zeigten das Bild einer Virushepatitis mit aufgedunsenen vakuolenreichen Hepatozyten, Störung des Epithels der Lebersinusoide, Infiltrat inflammatorischer T4-Zellen und Nachweis von AAV-RNA mittels *in situ*-Hybridisierung als Zeichen aktiver Replikation in Hepatozyten und Endothelzellen. Dieses Bild entsprach ausdrücklich nicht dem einer klassischen

Autoimmunhepatitis. Dennoch legte der vorgefundene HLA-DRB1*04:01-Haplotyp eine Rolle immunvermittelter Pathomechanismen nahe. In diesen 4 und 5 weiteren Fällen wurden Plasma-, Leber- und Abstrichproben einem Screening auf unbekannte Viren mittels Metagenomanalyse, auch „Tiefensequenzierung“ genannt, unterzogen. DNA-Extrakte bzw. revers transkribierte RNA-Extrakte wurden zunächst amplifiziert. Mittels eines Sortiments aus oberflächengebundenen Sonden wurden selektiv virale Amplifikate aus den Probenextrakten gefischt (target enrichment, TE, VirCapSeq-VERT Capture-System). Das Sortiment umfasste hochkonservierte virale Sequenzen aus 207 Taxa von Vertebraten-Viren. Das so angereicherte Virus-Genom bzw. -Transkriptom wurde erneut amplifiziert und sequenziert. Mit diesem Verfahren wurde kein anderes möglicherweise krankheitsursächliches Virus gefunden.³⁷

Mit vergleichbaren Tiefensequenzierungsverfahren wurde AAV2 in 13 von 14 Hepatitis-Fällen bei Kindern mit gleichzeitiger Adenovirus-Infektion in den USA nachgewiesen. Gegenüber dem AAV2-Referenzgenom enthielt die Variante 35 Substitutionen von Aminosäuren, von denen 25 aus den britischen AAV2-Isolaten bekannt waren.³⁸ Morfopoulou und Kollegen schließlich wiesen AAV2-DNA und -RNA in 5 von 5 Leberexplantaten und Blutproben aus 5 weiteren Hepatitis-Fällen unbekannter Ursache bei Kindern mittels metagenomischer Sequenzierung nach. Die bestätigende qPCR ergab C_t-Werte von 17-21 in den Leber- und von 19-25 in den Blutproben. Von weiteren 9 Leberproben war PCR-Analytik verfügbar, jeweils mit Nachweis von AAV2-DNA bei C_t-Werten von 23-25 trotz Formalin-Fixierung. Das histopathologische Bild war vergleichbar mit dem oben beschriebenen, mit einer Zerstörung der Bälkchen- und Kanälchen-Architektur, wobei CD8- statt CD4-Lymphozyten das Infiltrat dominierten. Ein Nachweis von AAV2-Virusprotein mittels Immunhistochemie bzw. Proteomics oder von Viruspartikeln mittels Elektronenmikroskopie gelang nicht, ebenso wenig von HAdV, aber immerhin derjenige von HHV6-Proteinen. In weiteren 13 von 14 Fällen wurden mindestens AAV2-DNA, z.T. auch -RNA in Blut- und Abstrichproben mittels PCR nachgewiesen, und zwar in Mengen, die deutlich über dem Niveau von 87 Kontroll-Fällen lagen. Es wurden rekombinante AAV2 mit der in einem klinischen Fall vorgefundenen Sequenz hergestellt, welche 11 Aminosäuresubstitutionen im VP1-Hüllprotein beinhaltete. Die Transduktionseffizienz auf

Kulturhepatozyten lag in derselben Größenordnung wie diejenige von AAV2 mit der Referenzsequenz und diejenige eines als hepatotrop geltenden AAV-Konstruktes. Als Helfervirus konnte jeweils HAdV, HHV6 oder beides identifiziert werden.³⁹

In nachfolgenden Studien konnten sowohl in Abwässern von Dublin⁴⁰ als auch von London⁴¹ dieselben AAV2-Sequenzen und dieselben HAdV-F41-Sequenzen detektiert werden. Im kontinuierlichen Abwassermonitoring korrelierten die täglichen Quantitäten von AAV2 und HAdV-F41 hervorragend. Der zeitliche Verlauf war kongruent zum Aufkommen der klinischen Fälle. Dies lässt auf eine erhebliche Anzahl Menschen schließen, in denen aufgrund wahrscheinlich vorwiegend asymptomatischer Co-Infektion AAV2 aktiv repliziert.

Gängige AAV-Vektoren hingegen sind quasi „vollständig entkernt“ (s.o.). Auch im gesamten Produktionsprozess kommt niemals ein replikationsfähiges AAV zum Einsatz, die Sequenzinformation für die 2 Gene wird dort in humanen Kulturzell- (HEK293) Systemen über Plasmide oder seltener in Insektenzellsystemen über Baculoviren bereitgestellt. Die Information für die Replikationsfaktoren des Helfervirus ist auf Wirtszelle und ein weiteres Plasmid verteilt. Ist aber ein Mensch zufällig gerade mit dem homologen Wildtyp-AAV und geeignetem Helfervirus (Adenovirus, Humanes Herpesvirus 6, Epstein-Barr-Virus, Cytomegalievirus) ko-infiziert, dürfte das Konstrukt parallel mit dem Wildtyp repliziert werden, wenn es als nunmehr dritter Virustyp in eine ko-infizierte Zelle gelangt.

Auch ganz ohne Replikation kommt mit AAV ein erheblicher Verstärkungseffekt zustande, da von einer DNA viele mRNA transkribiert und diese vielfach in Proteine translatiert werden. Die Dosis-Wirkungsbeziehung nicht replizierender DNA-Viren ist flacher zu erwarten als die klassischer Infektionserreger, aber steiler als die z.B. von mRNA oder gar von Proteinen. Neben AAV2 scheint auch AAV5 einen gewissen Hepatotropismus zu besitzen, denn AAV5-Konstrukte wurde eigens zur Transduktion von Hepatozyten ausgewählt.^{2,4} Die intravenöse Verabreichung freilich enormer Dosen (ca. $1,4 \times 10^{15} = 2 \text{ nM}$ AAV5-Vektoren entsprechend ca. 10 mg) zur im Übrigen äußerst erfolgreichen Therapie löste eine im Mittel nach 80 Tagen Cortikoidgabe rückläufige Begleithepatitis aus.²

Einige Mechanismen sind denkbar, wie auch ohne Replikation schon eher kleinere Dosen von AAV-Vektorkonstrukten schaden könnten. Die ZKBS hatte hier bislang als Sonderfall solche Konstruk-

te aufgeführt, die wirksam Onkogene übertragen.⁴² Drei weitere Mechanismen dürften von Belang sein. Erstens sind AAV gut plazentagängig.^{10,43} Die zitierten Sicherheitsinformationen einiger US-Universitäten weisen darauf hin.^{21,24,25,30} Auch nach § 17 IV 4 GenTSV ist der Projektleiter gehalten, Beschäftigte über mögliche Gefahren während der Schwangerschaft zu unterrichten. Nicht nur komme Embryotoxizität in Frage, sondern wurden AAV auch mit Fällen vorzeitiger Wehen und Amnionruptur, Früh- und Fehlgeburten und unzureichender Ausbildung der Plazenta in Verbindung gebracht.^{21,24,25,30,43} 5 Studien an 311 Fällen sahen einen solchen Zusammenhang, 2 Studien an 119 Fällen nicht.¹⁰ Zweitens könnten bei Personen mit geeigneten HLA-Haplotypen Autoimmunreaktionen ausgelöst werden. Ein solcher Mechanismus wurde für den Verwandten Parvovirus B19 diskutiert, welcher (Poly-)arthritis auslösen könne. Schließlich steht Drittens ein gewisses Restrisiko der Genotoxizität im Raum, da ein kleiner Anteil Virus-DNA nicht episomal verbleibt, sondern chromosomal integriert wird.⁴ Beim Wildtyp geschieht dies hochspezifisch am wohldefinierten *Locus* AAVS1 in Chromosom 19q13. Bei gängigen Vektor-Konstrukten ist die Integrationsrate zwar niedriger.⁴⁴ Ohne den AAV-Replikationsfaktor *Rep78* mit DNA-Helicase-Aktivität geht jedoch die Spezifität der Insertion verloren. Je nach Konstrukt wurden AAV-Insertionen an über 1000 unterschiedlichen Stellen im Mäuse-Genom⁴⁴ und an über 100 Stellen in allen 23 Chromosomen des menschlichen Genoms⁴⁵ beschrieben. Bevorzugt wurden die Initiator-Regionen für die Gentranskription, CpolyG- und GC-reiche Regionen. Ein vorausgehender DNA-Doppelstrangbruch war notwendige Voraussetzung für die Insertion durch wirtszell-eigene DNA-Reparatursysteme. Aus diesen Befunden und Erwägungen ergibt sich eine mögliche synergistische Co-Toxizität mit sonstigen mutagenen Noxen wie ionisierender Strahlung oder chemischen Cancerogenen. Denkbar wäre so eine Onkogenese z.B. bei Insertion in die Regulator-Regionen von Onkogenen oder Tumorsuppressorgenen. Tatsächlich lösten mindestens 14 verschiedene AAV-Konstrukte in Mäusen teilweise reproduzierbar Leberzellkarzinome und andere Krebsarten aus, obwohl sie weder ein für ein Onkogen kodierten, noch anderweitig mit der Onkogenese in Verbindung gebracht wurden.^{45,46} Für ein Konstrukt zur experimentellen Gentherapie der Mukopolysaccharidose VII konnte der Zusammenhang der Onkogenese mit genomischer Integration in eine 6-kB-Region auf Chromosom 12 gezeigt werden.⁴⁵ Für die genomische Insertion kommt es auf

die Art der im Konstrukt enthaltenen Enhancer/Promotor-Elemente an. Fehlte etwa auch eine terminale 46-Nukleotid Enhancer/Promotor-Region aus dem Wildtyp AAV2, kamen weniger Insertionen zustande.⁴⁶ Beim Menschen zeigten 2 Studien an Biopsiematerial von 193 und 1461 Fällen eine Assoziation von AAV2 und Leberkarzinom, mit Integration der AAV2-DNA in die Regulatorregionen der Onkogene CCNA2, CCNF1, TERT und TNFSF10.¹⁰ Welches onkogene Restrisiko ohne den terminalen 46-Nukleotid Enhancer/Promotor verbleibt, ist nicht geklärt.

Rekombinante AAV-Konstrukte können auch gezielt so gebaut werden, dass sie sequenzspezifisch (homolog) ins Genom insertieren, man spricht von insertionaler Mutagenese.⁴⁵

Somit lassen sich vulnerable Personengruppen identifizieren: 1. Schwangere, 2. Menschen mit aktueller Co-Infektion durch homologen Wildtyp-AAV und geeignetem Helfervirus, 3. Menschen ohne neutralisierende Antikörper gegen den verwendeten AAV-Serotypen (unterschiedliche Subtypen lassen sich ggf. zu gemeinsamen Serotypen zusammenfassen); 4. Immunsupprimierte (z.B. Einnahme von Cortikoiden); 5. evtl. Menschen mit ggf. gehäuften Autoimmunerkrankungen.

Der Experimentator möchte auch einfach die Verschleppung von AAV-Material z.B. in Negativkontrollen vermeiden. Dies alles spricht dafür, die Kontaminationsdosis zu reduzieren, zumal wenn dies einfach und kostengünstig möglich ist, wie mit NaOCl.

Daher möchte und muss man nach GenTSV Anlage 2 A I. b 15 bzw. II b Nr. 18 zumindest für den Kontaminationsfall ein wirksames Flächendesinfektionsmittel bereithalten. Hier kommt eine Fülle in jedem Drogeriemarkt erhältlicher Haushalts-Chlorreiniger in Frage.

U.a. Danklorix ist sogar VAH-gelistet. Um 0,5% NaOCl zu erhalten, muss das fabrikfrisch 2,8%-Konzentrat 1 : 5 (z.B. 100 ml Konzentrat + 400 ml Wasser) verdünnt werden. Aufgrund von Na_2CO_3 im Konzentrat hat die Verdünnung einen pH von 12,8.¹⁴ Selbst das 2,8% Konzentrat schädigte nach 12h Einwirkzeit Edelstahl visuell-optisch nicht.¹⁴ Korrosionseffekte sind bei Kombination mit Säuren zu befürchten. Da sich OCl^- mit der Zeit pH- und konzentrationsabhängig zersetzt, nimmt der Wirkstoffgehalt im Laufe der Zeit ab. Bei obigem Verdünnungsvorschlag sind 7% Sicherheitszulage enthalten. Die Originallösungen im dicht verschlossenen Behälter sind etwa 30 Monate stabil, Verdünnungen im offenen Gefäß etwa 15-30 Tage, da hier CO_2 zutreten und Cl_2 entweichen

können.⁴⁷ In der pharmazeutischen Industrie wird 0,5% NaOCl offenbar gerne zur Desinfektion der Reinraum-Produktionsanlagen verwendet.

Labor- und krankenhausübliche Einmalhandschuhe reduzierten im Falle einer Kontamination die Keimzahl auf der Hand um den Faktor 100 – 10 000 und konnten in 13% der Anwendungsfälle bei Medizinpersonal eine nachweisbare Kontamination der Hände nicht vermeiden.⁴⁸ Daher, möchte und muss man nach GenTSV Anlage 2 A I. b 15 zumindest für die Hautdekontamination ein Handdesinfektionsmittel bereithalten, zum Einsatz zusätzlich vor dem Händewaschen. Dies gilt zumal zugunsten von Mitarbeitern, die sich ausdrücklich etwas mehr schützen wollen als von der ZKBS empfohlen, insbesondere wenn es sich um AAV-Konstrukte mit onkogenem Potential handelt.⁴² 1847 führte Semmelweis die Händedesinfektion in der Geburtshilfe mit 4% Chlorkalk, ($3 \text{ CaCl}(\text{OCl}) \cdot \text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ entsprechend 1,6% verfügbarem Cl), ein.⁴⁹ Heute nutzt man 3% NaOCl -Lösung für Wurzelspülungen⁵⁰, 0,08% zur Mundhöhlenantiseptik⁵¹ und 0,005% Bäder zur Behandlung bestimmter Ekzeme (z.B. NCT01996150). NaOCl ist nach Biozidverordnung zur Händedesinfektion zugelassen, in Deutschland vermarktete Formulierungen mit 0,18% (Perfectpur HD plus, Ökopur HD plus) aber für AAV zu niedrig konzentriert. Unter dem Namen Dakin-Lösung (Dakin's solution) ist 0,5% NaOCl auf pH 9,8 isotonisch gepuffert zur Haut- und Wunddesinfektion und –antiseptis weltweit seit seiner Entwicklung durch gleichnamigen medizinischen Chemiker 1916 geläufig. In Frankreich und Belgien ist es als Fertigpräparat (*Dakin Cooper Stabilisé 0,5%* von der Coopération Pharmaceutique Française)^{52,53} zugelassen und erhältlich. Die hier geprüfte Charge 018498/B, erworben 12-2023 haltbar bis 04-2025, hatte durch den KMnO_4 -Zusatz einen blass rosa Farbton, einen pH von 10,0 und war auf der Haut angenehm und ohne Abwaschen perfekt verträglich.¹⁴ Zu NaOCl-Lösungen gibt es Monographien im Deutschen Arzneimittelcodex (lieferbar z.B. 1% PZN 1705613, 8917318, 17922985, 0,5% Polodent), sie sind zudem nach Biozidverordnung für die menschliche Hygiene verkehrsfähig (EU 2017/1273).

Auch wenn die Wirksamkeit von NaOCl bzw. Cl_{nasc} die ZKBS (noch) nicht zu überzeugen vermochte und NaOCl (noch) nicht nach EN1500 für die Handdesinfektion von AAV getestet wurde, wird man sich nach obiger Datenlage eine Keimzahlreduktion um einen Faktor eher über 200 als unter 2

erwarten. Wer Dakin Cooper Stabilisé, 250 ml nicht aus Frankreich für 2€66, bzw. aus Belgien für 6€90 bekommt, hat noch zwei weitere Bezugsmöglichkeiten für 0,5% NaOCl als Arzneimittel zur externen Anwendung. Da in sehr vielen wissenschaftlichen S1 und S2-Laboratorien approbierte Ärzte mitarbeiten, können diese durchweg den wenigen namentlich bekannten Mitarbeitern, die mit AAV arbeiten, 0,5% NaOCl individuell zum Zwecke der persönlichen Anwendung herstellen (§ 13 IIb 1 AMG). Ebenso darf jeder Inhaber einer Apotheke 0,5% NaOCl einzeln herstellen, da der Wirkstoff Natriumhypochlorit nicht verschreibungspflichtig ist (§ 48 AMG, nicht in Anlage 1 Arzneimittelverschreibungsverordnung gelistet, Wirkung allgemein bekannt, Pharmakopöe, s.o.), sogar ohne Verordnung (§ 7 Apothekenbetriebsordnung). Die Rezeptur für 1 Liter Dakin-Lösung ist: NaOCl auf fast 0,5% verdünnen, 15 g $\text{NaHCO}_3 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ (identisch mit Backpulver) zugeben, pH auf 9,8 einstellen, Endverdünnung herstellen, 10 mg KMnO_4 zur Stabilisierung gegenüber UV-Licht zugeben, Lagerung vor starkem Sonnenlicht geschützt.⁵⁴ Jeweils wären so auch höhere Konzentrationen als 0,5% zugänglich, falls sich 0,5% noch als unzureichend erweisen sollten. Ungepuffert, ohne jeglichen Zusatz ist ein pH im Bereich 11-12 zu erwarten.

Die ZKBS steht mit ihrer - nach derzeitigem Stand der Literatur - unzutreffenden Verallgemeinerung von anderen Parvo- auf Adeno-assoziierte-Viren nicht allein. Die VAH führte mit Mitteilung vom 25.02.2023 eine neue Wirksamkeitsstufe „viruzid PLUS“ ein, welche anhand des neu ins marktübliche Prüfsortiment aufgenommen Minute virus of mice, MVM, als Surrogat nachzuweisen sei. U.a. heißt es dort: *„Das murine Parvovirus dient als Surrogatvirus speziell für die Wirksamkeit gegenüber Parvoviridae einschließlich Adeno-Assoziierter Viren (u.a. in der Gentherapie verwendet).“* und *„Ist die Desinfektion zur Verhinderung der Übertragung besonders Desinfektions-mitteltoleranter Viren wie HAV, HEV, Parvoviridae – einschließlich Adeno-Assoziierter Viren sowie onkolytische Parvoviren in der Gentherapie – notwendig, muss auch der Nachweis der Wirksamkeit gegen Parvoviren geführt werden und der neue Wirkbereich viruzid PLUS gewählt werden.“*⁵⁵

Neben MVM sind weitere murine Parvoviren wie MPV1-5, porcine (PPV), canine und feline Parvoviren in der Veterinärmedizin geläufig. MVM und PPV waren empfindlich gegen 1+1 Wofasteril SC super = Peroxy-essigsäure (PAA). Bereits die 0,2% - Konzentration bewirkte nach 10 min eine

Keimzahlreduktion um 10^6 bei PPV und $10^{4,2}$ bei MVM.⁵⁶ Es ist in der 0,5%-Konzentration über 1 min RKI-gelistetes Händedesinfektionsverfahren. Auch für Skinman complete pure 30 s (s.o.) oder F10 Hand Srub von Meadow's animal healthcare (0,35% Biguanide) 3 min beanspruchen die Hersteller Wirksamkeit gegen Parvoviren. 0,25% NaOCl über 1 min reduzierte die Keimzahl von MVM um den Faktor 1000, von PPV um 4. Mit 2,5% NaOCl wurden Faktor von $10^{5,4}$ bzw. $>10^{4,4}$ erreicht.⁵⁶

In vielen gentechnischen Laboren wird zur Flächendesinfektion nach Arbeiten mit Viren Magnesiummonoperoxyphthalat (z.B. Dismozon) vorgesehen. Eine Wirksamkeit gegen Parvoviren wird hier nicht einmal vom Hersteller beansprucht.

Im Gegensatz zur ausgesprochenen Resistenz gegenüber Chemikalien sind AAV – gemessen etwa an Sporen oder Prionen – vergleichsweise hitzeempfindlich. Bestimmte hydrophobe Fluoreszenz-Indikatoren eignen sich zum Monitoring der Denaturierung der Capsid-Hülle. Dabei geht die Freilegung hydrophober Taschen mit einem sprunghaften Anstieg der Fluoreszenz einher. Unter Ausnutzung der langsamen Aufheizfunktion und der Fluorimetrie-Funktion handelsüblicher qPCR-Geräte lassen sich exakte „Schmelzkurven“ aufzeichnen, und diskrete „Schmelzpunkte“ bestimmen. Diese lagen für AAV2 bei 72°C, für AAV8 bei 73°C, für AAV1 bei 84°C und für AAV5 bei 91°C. Durch einen 3-minütigen Hitzepuls von 95°C wurden sämtliche AAV in der Probe vollständig und zuverlässig denaturiert. Ebenfalls wurde die Denaturierung von AAV2 und AAV8 nach 3 min bei 75°C bzw. von AAV1 nach 3 min bei 85°C elektronenmikroskopisch bestätigt.⁵⁷

Unter dem Gesichtspunkt biologische Gefahrenabwehr ist es ausgesprochen wünschenswert, in der Breite unter den einsatzbereiten Schutzmitteln auch Desinfektionsmittel und Dekontaminationsmittel verfügbar zu haben, welche auch Lücken im gängigen Spektrum wie Sporen, Oozysten und beständige unbehüllte Viren abdecken. Von dort (siehe „dreckiges Dutzend“ usw.) geht Gefahr aus und eher weniger von wohletablierten AAV-Konstrukten in geregelter ziviler (prä-)klinischer Forschung. Ausreichend konzentrierte Chlor-abspaltende Verbindungen schließen diese Lücke^{47, 58-61} in hervorragender Weise angesichts ihres unschlagbar günstigen Preises und Jahrhunderte langer Erfahrung bei sehr guter Umwelt- und vergleichsweise guter Hautverträglichkeit. Sauerstoff-abspaltende Verbindungen schnitten auf Flächen ebenso gut und an den Händen etwas schlechter

ab. Für Haut- und Hände erfüllen auch noch Iod-abspaltende Verbindungen bei etwas schlechterer Sporozidie diese Kriterien. Ein Vertreter, Braunol, ist sogar RKI-gelistet und 7,5% Povidon-Iod-Seife in Frankreich Standard für die chirurgische Händedesinfektion. Die Gentechniksicherheit sollte daher nicht als lästige und im S1-Bereich mitunter übertrieben anmutende rein bürokratische Pflicht verstanden werden, sondern als willkommener Anknüpfungspunkt, um Zivilschutz, pandemic preparedness und Resilienz der Zivilgesellschaft durch Anwendungsnähe und Praxistauglichkeit zu stärken.

- 1) [https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/01_Allgemeine%20Stellungnahmen/07_Sicherheitsmassnahmen/TechnischOrganisatorisch/H%C3%A4ndedesinfektion bei gent. Arbeiten mit Viren bis RG4 akt.%202023.pdf?__blob=publicationFile&v=7](https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/01_Allgemeine%20Stellungnahmen/07_Sicherheitsmassnahmen/TechnischOrganisatorisch/H%C3%A4ndedesinfektion%20bei%20gent.Arbeiten.mit.Viren.bis.RG4.akt.%202023.pdf?__blob=publicationFile&v=7)
- 2) https://www.cslbehring.de/-/media/cslb-germany/documents/produktliste-fachinformationen/de_fi_hemgenix.pdf
- 3) https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/glybera-epar-product-information_en.pdf
- 4) https://www.roctavian.de/wp-content/uploads/2022/12/Fachinformation_Stand.pdf
- 5) Zolgensma, <https://www.fachinfo.de/pdf/023042>
- 6) <https://klinischeforschung.novartis.de/dokumente/fachinformationen-luxturna-5-x-1012-vektorgenome-ml-konzentrat-und-loesungsmittel-zur-herstellung-einer-injektionsloesung/>
- 7) S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Krankenhaushygiene in Zusammenarbeit mit 29 Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften Stand 03.02.2023. https://www.krankenhaushygiene.de/pdffdata/275_310_DGKH_S2k-LL%20HD%20und%20HH_HM_11_23.pdf
- 8) Empfehlung der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) Händehygiene in Einrichtungen des Gesundheitswesens Bundesgesundheitsbl 2016 · 59:1189–1220.
- 9) https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/01_Allgemeine%20Stellungnahmen/10_Viren/Adeno-assoziierte_Viren_aus_Primaten_und_abgeleitete_Vektoren_akt_2021.pdf?__blob=publicationFile&v=6
- 10) Sant'Anna TB, Araujo NM. Adeno-associated virus infection and its impact in human health: an overview. Virol J. 2022 Oct 31;19(1):173.
- 11) Korte J, Mienert J, Hennigs JK, Körbelin J. Inactivation of Adeno-Associated Viral Vectors by Oxidant-Based Disinfectants. Hum Gene Ther. 2021 Jul;32(13-14):771-781.
- 12) Tomono T, Hirai Y, Chono H, Mineno J, Ishii A, Onodera M, Tamaoka A, Okada T. Infectivity Assessment of Recombinant Adeno-Associated Virus and Wild-Type Adeno-Associated Virus Exposed to Various Diluents and Environmental Conditions. Hum Gene Ther Methods. 2019 Aug;30(4):137-143.
- 13) Howard DB, Harvey BK. Assaying the Stability and Inactivation of AAV Serotype 1 Vectors. Hum Gene Ther Methods. 2017 Feb;28(1):39-48.
- 14) 46) Eigene Messung und Anwendungsbeobachtung.
- 15) 0,5% NaOCl für 30 min Charles River <https://plasmid-viral-vector.criver.com/wp-content/uploads/2019/02/MSDS-AAV-Vigene.pdf>
- 16) 0,5% NaOCl <https://www.addgene.org/biosafety/>
- 17) 1,0% NaOCl für 10 min <https://www.virovek.com/wp-content/uploads/2019/06/Virovek-AAV-Safety-Data-Sheet.pdf>
- 18) 0,5% NaOCl über 30 min ThermoFisher scientific https://www.thermofisher.cn/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.cn/TFS-Assets%2FMSG%2Fmanuals%2FMAN0026650-CTS-AAV-MAX-HelperFreeAAV-ProductionSys_UG.pdf
- 19) 0,5% NaOCl https://www.epa.ie/publications/licensing--permitting/genetically-modified-organisms/B_IE_22_01-021.pdf.
- 20) 0,5% NaOCl <https://vnl.princeton.edu/safety-and-handling>.
- 21) 0,5% NaOCl für 20 min https://ibc.utah.edu/resources/documents/fact-sheets-and-sops/recombinant-adeno-associated-viral-vectors_fact-sheet.pdf
- 22) 0,5% NaOCl University of Kentucky https://ehs.uky.edu/docs/pdf/bio_viral_vectors_0001.pdf
- 23) 1,0% NaOCl <https://ehs.stanford.edu/reference/adeno-associated-virus-fact-sheet>

- 24) 0,5% NaOCl (=10% bleach) Medical university of South Carolina
https://sc.edu/about/offices_and_divisions/ehs/documents/biological_safety/guidance-for-working-with-viral-vectors-final.pdf
- 25) 0,5% NaOCl Florida International University <https://ehs.fiu.edu/assets/docs/biological/adeno-associated-virus-guidelines-for-fiu-laboratories.pdf>
- 26) 0,5% NaOCl (=10% bleach) für 10 min University of North Carolina
<https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectorcore/wp-content/uploads/sites/810/2018/07/unc-vc-raav-msds.pdf>
- 27) 0,5% NaOCl für 5 min Colorado State University https://www.research.colostate.edu/orcc/wp-content/uploads/sites/46/2022/10/AAV_Containment.pdf
- 28) 0,5% NaOCl (=10% bleach) California Institute of Technology, Pasadena <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/246405v2.full.pdf>
- 29) 0,5% NaOCl für 30 min Berkley
<https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&ved=2ahUKEwi0I43x6PuCAxWu-LSlHYhbDgg4HhAWegQlChAB&url=https%3A%2F%2Folac.berkeley.edu%2Fsites%2Fprivate%2FopTemplates%2FAAV%2520in%2520animals%2520SOP.docx&usq=AOvVaw1B4ITKfRmztWdWh6Pjdtwm&opi=89978449>
- 30) 0,5% NaOCl (=10% bleach) 10 min Auburn University, Alabama
<https://cws.auburn.edu/shared/files?id=227&filename=Auburn%20University%20Viral%20Vector%20Reference%20Guide%20-%20AAV%20%26%20rAAV.pdf>
- 31) 1,0% NaOCl für 15 min
<https://www.ulethbridge.ca/sites/default/files/2020/09/Guidelines%20for%20working%20with%20AAV.pdf>
- 32) 0,5% NaOCl Université de Laval, Canada <https://neurophotonics.ca/documents/technical-sheet-aav-vector.pdf>
- 33) https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/Chlorbasierte_Desinfektionsmittel_107_108_VAH_HM_6_20.pdf
- 34) Kubilay et al. Antimicrobial Resistance and Infection Control 2015, 4(Suppl 1):P9
- 35) Hopman et al. Antimicrobial Resistance and Infection Control 2015, 4(Suppl 1):O13
- 36) Ionidis G, Hübscher J, Jack T, Becker B, Bischoff B, Todt D, Hodasa V, Brill FH, Steinmann E, Steinmann J. Development and virucidal activity of a novel alcohol-based hand disinfectant supplemented with urea and citric acid. BMC Infect Dis. 2016 Feb 11;16:77.
- 37) Ho A, Orton R, Tayler R, Asamaphan P, Herder V, Davis C, Tong L, Smollett K, Manali M, Allan J, Rawlik K, McDonald SE, Vink E, Pollock L, Gannon L, Evans C, McMenamin J, Roy K, Marsh K, Divala T, Holden MTG, Lockhart M, Yirrell D, Currie S, O'Leary M, Henderson D, Shepherd SJ, Jackson C, Gunson R, MacLean A, McInnes N, Bradley-Stewart A, Battle R, Hollenbach JA, Henderson P, Odam M, Chikowore P, Oosthuyzen W, Chand M, Hamilton MS, Estrada-Rivadeneira D, Levin M, Avramidis N, Pairo-Castineira E, Vitart V, Wilkie C; DIAMONDS Consortium; ISARIC4C Investigators; Palmarini M, Ray S, Robertson DL, da Silva Filipe A, Willett BJ, Breuer J, Semple MG, Turner D, Baillie JK, Thomson EC. Adeno-associated virus 2 infection in children with non-A-E hepatitis. Nature. 2023 May;617(7961):555-563.
- 38) Servellita V, Sotomayor Gonzalez A, Lamson DM, Foresythe A, Huh HJ, Bazinet AL, Bergman NH, Bull RL, Garcia KY, Goodrich JS, Lovett SP, Parker K, Radune D, Hatada A, Pan CY, Rizzo K, Bertumen JB, Morales C, Oluniyi PE, Nguyen J, Tan J, Stryke D, Jaber R, Leslie MT, Lyons Z, Hedman HD, Parashar U, Sullivan M, Wroblewski K, Oberste MS, Tate JE, Baker JM, Sugerman D, Potts C, Lu X, Chhabra P; Pediatric Hepatitis of Unknown Etiology Working Group; Ingram LA, Shiao H, Britt W, Gutierrez Sanchez LH, Ciric C, Rostad CA, Vinjé J, Kirking HL, Wadford DA, Raborn RT, St George K, Chiu CY. Adeno-associated virus type 2 in US children with acute severe hepatitis. Nature. 2023 May;617(7961):574-580.
- 39) Morfopoulou S, Buddle S, Torres Montaguth OE, Atkinson L, Guerra-Assunção JA, Moradi Marjaneh M, Zennezini Chiozzi R, Storey N, Campos L, Hutchinson JC, Counsell JR, Pollara G, Roy S, Venturini C, Antinao Diaz JF, Siam A, Tappouni LJ, Asgarian Z, Ng J, Hanlon KS, Lennon A, McArdle A, Czap A, Rosenheim J, Andrade C, Anderson G, Lee JCD, Williams R, Williams CA, Tutill H, Bayzid N, Martin Bernal LM, Macpherson H, Montgomery KA, Moore C, Templeton K, Neill C, Holden M, Gunson R, Shepherd SJ, Shah P, Cooray S, Voice M, Steele M, Fink C, Whittaker TE, Santilli G, Gissen P, Kaufer BB, Reich J, Andreani J, Simmonds P, Alrabiah DK, Castellano S, Chikowore P, Odam M, Rampling T, Houlihan C, Hoschler K, Talts T, Celma C, Gonzalez S, Gallagher E, Simmons R, Watson C, Mandal S, Zambon M, Chand M, Hatcher J, De S, Baillie K, Semple MG; DIAMONDS Consortium; PERFORM Consortium; ISARIC 4C Investigators; Martin J, Ushiro-Lumb I, Noursadeghi M, Deheragoda M, Hadzic N, Grammatikopoulos T, Brown R, Kelgeri C, Thalassinou K, Waddington SN, Jacques TS, Thomson E, Levin M, Brown JR, Breuer J. Genomic investigations of unexplained acute hepatitis in children. Nature. 2023 May;617(7961):564-573.
- 40) Martin NA, Gonzalez G, Reynolds LJ, Bennett C, Campbell C, Nolan TM, Byrne A, Fennema S, Holohan N, Kuntamukkula SR, Sarwar N, Sala-Comorera L, Dean J, Urtasun-Elizari JM, Hare D, Liddy E, Joyce E, O'Sullivan JJ, Cuddihy JM, McIntyre AM, Robinson EP, Dahly D, Fletcher NF, Cotter S, Fitzpatrick E, Carr MJ, De Gascun CF, Meijer WG. Adeno-Associated Virus 2 and Human Adenovirus F41 in Wastewater during Outbreak of Severe Acute Hepatitis in Children, Ireland. Emerg Infect Dis. 2023 Apr;29(4):751-760.
- 41) Gates S, Andreani J, Dewar R, Smith DB, Templeton K, Child HT, Breuer J, Golubchik T, Bassano I, Wade MJ, Jeffries AR, Simmonds P, Harvala H. Postpandemic rebound of adeno-associated virus type 2 (AAV2) infections temporally associated with an outbreak of unexplained severe acute hepatitis in children in the United Kingdom. J Med Virol. 2023 Jul;95(7):e28921.

- 42) https://www.zkbs-online.de/ZKBS/SharedDocs/Downloads/01_Allgemeine%20Stellungnahmen/07_Sicherheitsmassnahmen/TechnischOrganisatorisch/Adenovirale_und_AAV-abgeleitete_Partikel_und_Onkogene_2020.pdf?__blob=publicationFile&v=5
- 43) Burguete T, Rabreau M, Fontanges-Darriet M, Roset E, Hager HD, Köppel A, Bischof P, Schlehofer JR. Evidence for infection of the human embryo with adeno-associated virus in pregnancy. *Hum Reprod.* 1999 Sep;14(9):2396-401.
- 44) Li H, Malani N, Hamilton SR, Schlachterman A, Bussadori G, Edmonson SE, Shah R, Arruda VR, Mingozi F, Wright JF, Bushman FD, High KA. Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood.* 2011 Mar 24;117(12):3311-9.
- 45) Deyle DR, Russell DW. Adeno-associated virus vector integration. *Curr Opin Mol Ther.* 2009 Aug;11(4):442-7.
- 46) Sabatino DE, Bushman FD, Chandler RJ, Crystal RG, Davidson BL, Dolmetsch R, Eggan KC, Gao G, Gil-Farina I, Kay MA, McCarty DM, Montini E, Ndu A, Yuan J; American Society of Gene and Cell Therapy (ASGCT) Working Group on AAV Integration. Evaluating the state of the science for adeno-associated virus integration: An integrated perspective. *Mol Ther.* 2022 Aug 3;30(8):2646-2663.
- 47) https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/hygiene_au_cabinet_medical_-_argumentaire.pdf
- 48) Olsen RJ, Lynch P, Coyle MB, Cummings J, Bokete T, Stamm WE. Examination gloves as barriers to hand contamination in clinical practice. *Jama* 1993;270(3):350-3
- 49) Rotter ML. Semmelweis' sesquicentennial: a little-noted anniversary of handwashing. *Curr Opin Infect Dis.* 1998 Aug;11(4):457-60.
- 50) Stellungnahme der AG Endodontologie und Traumatologie der DGZ, Version 1.0, DZZ 10/2006, C. Barthel, M. Georgi, E. Schäfer, A. Petschelt, S. Flachsenberg, T. Neuber, C. Kockapan, R. Weiger, M. Hülsmann.
- 51) https://www.bzaek.de/fileadmin/PDFs/Berufsaus%C3%BCbung/Hygiene/Hygieneleitfaden_des_Deutschen_Arbeitskreises_f%C3%BCr_Hygiene_in_der_Zahnmedizin.pdf.
- 52) <https://www.vidal.fr/medicaments/dakin-cooper-stabilise-sol-p-appl-loc-en-flacon-4756.html> (der Vidal ist das französische Äquivalent der deutschen Roten Liste)
- 53) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507916/>
- 54) http://lefevre.pc.free.fr/site_4/1sti2d/tp/1sti2dtp13A.pdf
- 55) https://vah-online.de/files/download/vah-mitteilungen/VAH_Mitteilung_ViruzidPlus_Desinfektion_Web_250223.pdf
- 56) Eterpi M, McDonnell G, Thomas V. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J Hosp Infect.* 2009 Sep;73(1):64-70.
- 57) Rayaprolu V, Kruse S, Kant R, Venkatakrishnan B, Movahed N, Brooke D, Lins B, Bennett A, Potter T, McKenna R, Agbandje-McKenna M, Bothner B. Comparative analysis of adeno-associated virus capsid stability and dynamics. *J Virol.* 2013 Dec;87(24):13150-60.
- 58) Edmonds SL, Zapka C, Kasper D, Gerber R, McCormack R, Macinga D, Johnson S, Sambol S, Fricker C, Arbogast J, Gerding DN. Effectiveness of hand hygiene for removal of *Clostridium difficile* spores from hands. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Mar;34(3):302-5. „0,5% bleach“ ist 0,025% NaOCl zu niedrig konzentriert, aber bereits nach 120 s Keimzahlreduktion um den Faktor 10 versus Faktor 6 Wasser und Seife (je 15 s), 0,2% Peressigsäure 30 s Faktor 32
- 59) Deshpande A, Mana TS, Cadnum JL, Jencson AC, Sitzlar B, Fertelli D, Hurless K, Kundrapu S, Sunkesula VC, Donskey CJ. Evaluation of a sporicidal peracetic acid/hydrogen peroxide-based daily disinfectant cleaner. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014 Nov;35(11):1414-6.
- 60) <https://www.ecolab.com/offering/klercide-biocides-and-disinfectants-for-cleanrooms/klercide-sporicidal-active-chlorine>, eine sporozide Wirkung gegen *Clostridium difficile* von 0,55% NaOCl (Klercide) nach 10 min Einwirkzeit wird vom Hersteller angegeben
- 61) Babb JR, Bradley CR, Ayliffe GA. Sporicidal activity of glutaraldehydes and hypochlorites and other factors influencing their selection for the treatment of medical equipment. *J Hosp Infect.* 1980 Mar;1(1):63-75. Die sporozide Aktivität von 0,2% NaOCl war deutlich höher bei pH 7,5 als bei pH 10. Keimzahlreduktion $> 3 \times 10^6$ nach 2 min bzw. 1h. Die physiologischen Säuren der Handoberfläche bedingen eine entsprechend günstige pH-Verschiebung der Dakin-Lösung.