# Operating instructions for biological substances

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Organisation:** | Heidelberg UniversityInstitute of Neurobiology | **Rooms:** | INF 366, rooms 141, 150, and 151; INF345, room 244 |  |
| **Research Groups:** | Bading, Ciccolini, Mauceri, Oliveira, Wölfl | **Activities:** | Production and purification of rAAVs; Infection with rAAVs of cultivated mammalian cells; *in vivo* intraocular, intraspinal, and intracranial injection of rAAVs into mice and rats, storage of rAAVs |
| **Responsible Person:** | Prof. Dr. Hilmar Bading | **Created by:** | Dr. Anna M. H. Hertle | **Date:** | 31.01.2024 |
|  |  |  |  |  |  |

**Description**

# Recombinant Adeno-Associated Viral Particles

Replication-defective, recombinant adeno-associated viral particles (AAVs) are small (22 nm), non-enveloped, single-stranded DNA viruses with an icosahedral protein capsid. They are members of the Parvoviridae family. Recombinant AAV vectors in which the Rep gene has been deleted have lost the property of site-specific integration exhibited by wild-type AAV. is not remained. Instead, persistent expression of vector sequences may occur from extra-chromosomal (episomal) sequences and, in lower frequency, from randomly integrated sequences. AAVs are coined as such because they are most often found in cells that are simultaneously infected with adenovirus. Wild typed adenovirus or herpesvirus must be present for AAV to replicate. Co-infection with helper virus triggers a lytic infection cycle. AAV has a broad host range and produces little to no immune response. There are at least 11 natural serotypes of AAV. AAV2 is the basis for most recombinant AAV vectors, but it is usually pseudotyped. AAV vectors are non-pathogenic and can infect dividing and non- dividing (quiescent) cells making them preferred viral vectors for many applications.

For most cases, work with AAVs may be performed in an S1 area.

Work must be performed in an S2 area in the following cases:

* When a known helper virus is present or the host animal or host cells may potentially contain virus that could act as a helper (e.g., mice replete with retroviruses).
* For recombinant AAVs generated using helper viruses: because residual helper virus may not be completely inactivated during AAV purification, helper virus may be present.
* When the AAV vector drives the expression of highly biologically active molecules such as oncogenes (including si/shRNA to a tumor suppressor), allergens, cytokines, or toxins

Possible routes of exposure include inhalation of aerosols, ingestion, contact with mucous membranes (including eyes), via accidental injection, and via damaged skin.

## Hazards for humans and the environment

There are no known health hazards associated with AAVs. It is not known to cause direct disease in humans; however, AAVs may be associated with insertional mutagenesis and cancer, thereby making AAVs possibly not as safe as previously thought. The low immunogenicity of AAVs leads to long-term gene expression, the effects of which are not entirely understood. The infective dose is unknown.

AAVs expressing oncogenic transgenes have oncogenic/mutagenic potential. Infection with AAVs expressing toxic transgenes, allergens, or cytokines may induce reactions consistent with the specific expression construct. *A risk assessment must be made for each transgene individually*, for instance via the oncogene databases of the Central Committee on Biological Safety from the German Federal Office of Consumer Protection and Food Safety ([www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/Datenbanken/datenbanken\_node.html](http://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/Datenbanken/datenbanken_node.html)), the Internation Cancer Genome Consortium (<https://dcc.icgc.org/>) the Bushman lab (allOnco; <http://www.bushmanlab.org/links/genelists>), the Zhao lab (<https://ongene.bioinfo-minzhao.org/index.html>), or Jake Lever and colleagues (<http://bionlp.bcgsc.ca/cancermine/>). It is advisable to search multiple databases.

## Safety measures and codes of conduct

* Persons with significant skin lesions (open eczema, wounds, and infections) or with pronounced wart formation should not carry out any work with AAVs .
* The use of sharp, pointed or fragile laboratory objects should be avoided wherever possible.
* The laboratory area and all laboratory equipment that comes into contact with AAVs must be carefully cleaned after completion of the activity (see hygiene plan).
* Laboratory waste containing AAVs must be inactivated by autoclaving.
* Work in a well-ventilated area. Conduct work in a class II biological safety cabinet in an S1 or S2 facility and/or over absorbant pads.
* Containers and devices that are removed from the safety cabinet must first be disinfected from the outside with a suitable disinfectant.
* Wear a lab coat, eye goggles, gloves (two pairs), and a face mask. An **FFP3** mask must be worn when handling AAVs with toxic, allergenic, or transformative potential.
* Two pairs of disposable gloves must be worn, with the upper glove being changed frequently.
* Due to the insensitivity of AAVs to alcohol-based disinfectants, there is currently no completely effective hand disinfectant. Washing hands after working in the S2 area is therefore particularly important!
* Disinfect and wash hands prior to leaving the S2 lab.
* Animal housing may be maintained at level S1 (unless helper virus is present).

## Decontamination

AAVs are stable in a wide pH range (3-9) and can resist heating at 56°C for at least 1 hour. 70% ethanol, hydrogen peroxide, and isopropanol are all ineffective for disinfection of AAVs. Due to the high stability of the capsid, AAVs can remain infectious for at least a month at room temperature following simple dessication or lyophilization.

* Disinfect surfaces and work areas with 10% bleach (0.5% sodium hypochlorite) for 5 minutes or 4% Aldasan 2000 for 5 minutes. Follow with water or 70% ethanol.
* Decontaminate reusable glass- and plasticware by autoclaving.
* Decontaminate lab coats by autoclaving.

## Conduct in case of danger

In case of accidents or spills:

* Evacuate the area, remove contaminated PPE, and allow agents to settle for a minimum of 30 minutes. Initiate spill response procedure:
* Cover the spill with absorbent material. Start at the edges and work towards the center.
* Carefully pour disinfectant over the absorbed spill, again starting at the edges and saturating the area with disinfectant.
* Allow a sufficient contact period (minimum 30 minutes) to inactivate the material in the spill.
* Use paper towels to wipe up the spill. Use tongs or forceps to pick up broken plastics, glass or other sharps that could puncture gloves.
* Discard absorbant material in autoclave waste.
* Clean the spill area with fresh paper towels soaked in disinfectant. Thoroughly wet the spill area and allow to disinfect for the required period of time, then wipe up the area with towels.
* Discard all cleanup materials in a chemical waste container and any contaminated PPE in a biohazard bag. Close and secure the bags.
* Place the bag into a second biohazard bag, secure, and disinfect by autoclaving.

Report all incidents to supervisor.

## First aid

* Contact with clothing: remove immediately and rinse affected skin with plenty of water.
* In case of skin contact or injection with AAVs: wash the affected area with soap and water for at least 15 minutes. Consult a physician.
* In case of ingestion: drink plenty of water, then consult a physician immediately.
* In case of inhalation: move to the fresh air, then consult a physician immediately.
* In case of eye exposure: flush with water for at least 15 minutes. Consult a physician.
* Report all incidents to supervisor and make a record in the first-aid book.

## Proper waste disposal

* Dispose of all solid waste in an autoclave bag. Close the bag with autoclave tape. Place the bag into a second bag, tape it shut, and disinfect by autoclaving (> 1 hour at 121°C).
* Dispose of all liquid waste in an autoclave jug. Close the jug and decontaminate the outside with disinfectant. Disinfect the contaminated liquid by autoclaving (> 1 hour at 121°C).

I hereby confirm that I have read the S1 and S2 operating procedures, the S1 and S2 hygiene plans, and the above detailed operating procedures for working with AAVs. I further agree to follow these procedures.

Name:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Date:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Signature:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

# Betriebsanleitung für biologische Stoffe

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Organisation:** | Universität HeidelbergInstitute für Neurobiology | **Räume:** | INF 366, Räume 141, 150 und 151 |  |
| **Forschungsgruppen:** | Bading, Ciccolini, Mauceri, Oliveira, Wölfl | **Aktivitäten:** | Production and purification of rAAVs; Infection with rAAVs of cultivated mammalian cells; *in vivo* intraocular, intraspinal, and intracranial injection of rAAVs into mice and rats, storage of rAAVs |
| **Verantwortlicher:** | Prof. Dr. Hilmar Bading | **Erstellt von:** | Dr. Anna M. H. Hertle | **Datum:** | 29.12.2023 |

**Beschreibung**

# Rekombinante Adeno-assoziierte virale Partikel

Replikationsdefekte, rekombinante adeno-assoziierte virale Partikel (AAV) sind kleine (22 nm), unbehüllte, einzelsträngige DNA-Viren mit einem ikosaedrischen Proteinkapsid. Sie gehören zur Familie der Parvoviridae. Rekombinante AAV-Vektoren, bei denen das Rep-Gen deletiert wurde, haben die Eigenschaft der ortsspezifischen Integration verloren, die Wildtyp-AAVs aufweisen. Stattdessen kann die anhaltende Expression von Vektorsequenzen durch extrachromosomale (episomale) Sequenzen und, in geringerer Häufigkeit, durch zufällig integrierte Sequenzen erfolgen. AAVs werden als solche bezeichnet, weil sie am häufigsten in Zellen vorkommen, die gleichzeitig mit Adenoviren infiziert sind. Damit sich AAV replizieren können, muss ein wildtypisiertes Adenovirus oder Herpesvirus vorhanden sein. Die Koinfektion mit einem Helfervirus löst einen lytischen Infektionszyklus aus. AAV hat ein breites Wirtsspektrum und erzeugt wenig bis keine Immunreaktion. Es gibt mindestens 11 natürliche Serotypen von AAV. AAV2 bildet die Grundlage für die meisten rekombinanten AAV-Vektoren, ist jedoch in der Regel pseudotypisiert. AAV-Vektoren sind nicht pathogen und können sich teilende und nicht teilende (ruhende) Zellen infizieren, was sie zu bevorzugten viralen Vektoren für viele Anwendungen macht.

In den meisten Fällen kann die Arbeit mit AAV in einem S1-Bereich durchgeführt werden.

In den folgenden Fällen müssen die Arbeiten in einem S2-Bereich durchgeführt werden:

* Wenn ein bekanntes Helfervirus vorhanden ist oder wenn das Wirtstier oder die Wirtszellen potenziell Viren enthalten, die als Helfer fungieren könnten (z. B. Mäuse, die voll mit Retroviren sind).
* Bei rekombinanten AAVs, die unter Verwendung von Helper-Viren erzeugt wurden: Da restliche Helper-Viren während der AAV-Reinigung möglicherweise nicht vollständig inaktiviert werden, können Helper-Viren vorhanden sein.
* Wenn der AAV-Vektor die Expression hochgradig biologisch aktiver Moleküle wie Onkogene (einschließlich si/shRNA für einen Tumorsuppressor), Allergene, Zytokine oder Toxine bewirkt.

Mögliche Expositionswege sind das Einatmen von Aerosolen, das Verschlucken, der Kontakt mit Schleimhäuten (einschließlich der Augen) die versehentliche Injektion und über verletzte Haut.

## Gefahren für Mensch und Umwelt

Es sind keine Gesundheitsgefahren im Zusammenhang mit AAV bekannt. Es ist nicht bekannt, dass sie beim Menschen direkt Krankheiten verursachen; allerdings können AAVs mit Insertionsmutagenese und Krebs in Verbindung gebracht werden, so dass AAVs möglicherweise nicht so sicher sind wie bisher angenommen. Die geringe Immunogenität von AAVs führt zu einer langfristigen Genexpression, deren Auswirkungen nicht vollständig geklärt sind. Die Infektionsdosis ist unbekannt.

AAVs, die onkogene Transgene exprimieren, haben ein onkogenes/mutagenes Potenzial. Die Infektion mit AAVs, die toxische Transgene, Allergene oder Zytokine exprimieren, kann Reaktionen hervorrufen, die dem spezifischen Expressionskonstrukt entsprechen. Eine Risikobewertung muss für jedes Transgen einzeln vorgenommen werden, zum Beispiel über die Onkogen-Datenbanken der Zentralen Kommission für Biologische Sicherheit beim Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit ([www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/Datenbanken/datenbanken\_node.html](http://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/Datenbanken/datenbanken_node.html)), des International Cancer Genome Consortium (<https://dcc.icgc.org/>), des Bushman-Labors (allOnco; <http://www.bushmanlab.org/links/genelists>), des Zhao-Labors (<https://ongene.bioinfo-minzhao.org/index.html>) oder von Jake Lever und Kollegen (<http://bionlp.bcgsc.ca/cancermine/>). Es ist ratsam, mehrere Datenbanken zu durchsuchen.

## Sicherheitsmaßnahmen und Verhaltensregeln

* Arbeiten Sie in einem gut belüfteten Bereich. Arbeiten Sie in einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II in einer S1- oder S2-Einrichtung und/oder über absorbierenden Matten.
* Tragen Sie einen Laborkittel, eine Schutzbrille, Handschuhe (zwei Paar) und eine Mund-Nasen-Schutzmaske.
* Personen mit erheblichen Hautverletzungen (offene Ekzeme, Wunden und Infektionen) oder mit ausgeprägter Warzenbildung sollten keine Arbeiten mit AAVs durchführen.
* Die Verwendung von scharfen, spitzen oder zerbrechlichen Laborobjekten sollte nach Möglichkeit vermieden werden.
* Der Laborbereich und alle Laborgeräte, die mit AAVs in Berührung kommen, müssen nach Beendigung der Tätigkeit sorgfältig gereinigt werden.
* Laborabfälle, die AAVs enthalten, müssen autoklaviert oder chemisch denaturiert oder inaktiviert werden.
* Behältnisse und Geräte, die aus der Sicherheitswerkbank entnommen werden, müssen zuvor von außen mit einem geeigneten Desinfektionsmittel desinfiziert werden.
* Beim Umgang mit AAVs mit toxischem, allergenem oder transformativem Potenzial muss eine FFP3-Maske getragen werden.
* Es sind zwei Paar Einmalhandschuhe zu tragen wobei der obere Handschuh häufig zu wechseln ist.
* Aufgrund der Unempfindlichkeit von AAVs gegenüber Desinfektionsmitteln auf Alkoholbasis gibt es derzeit kein vollständig wirksames Händedesinfektionsmittel. Händewaschen nach der Arbeit im S2-Bereich ist daher besonders wichtig!
* Desinfizieren und waschen Sie sich die Hände, bevor Sie das S2-Labor verlassen.
* Die Unterbringung der Tiere kann auf Stufe S1 beibehalten werden (sofern kein Helfervirus vorhanden ist).

## Dekontamination

AAVs sind in einem weiten pH-Bereich (3-9) stabil und widerstehen einer Erhitzung auf 56°C für mindestens 1 Stunde. 70%iges Ethanol, Wasserstoffperoxid und Isopropanol sind für die Desinfektion von AAVs unwirksam. Aufgrund der hohen Stabilität des Kapsids können AAVs nach einfacher Desinfektion oder Lyophilisierung bei Raumtemperatur mindestens einen Monat lang infektiös bleiben.

* Oberflächen und Arbeitsbereiche mit 10%iger Bleiche (0,5%iges Natriumhypochlorit) für 5 Minuten oder 4%igem Aldasan 2000 für 5 Minuten desinfizieren. Anschließend mit Wasser oder 70%igem Ethanol nachspülen.
* Dekontaminieren Sie wiederverwendbare Glas- und Kunststoffgeräte, indem Sie sie mindestens vier Stunden lang in 4 % Aldasan 2000 einweichen und anschließend autoklavieren.
* Dekontaminieren Sie Labormäntel durch Autoklavieren.

## Verhalten im Gefahrfall

Bei Unfällen oder Verschüttungen:

* Den Bereich evakuieren, die kontaminierte PSA entfernen und die Mittel mindestens 30 Minuten lang absetzen lassen. Verfahren zur Bekämpfung von Verschüttungen einleiten:
* Bedecken Sie den verschütteten Stoff mit absorbierendem Material. Beginnen Sie an den Rändern und arbeiten Sie sich zur Mitte hin vor.
* Gießen Sie das Desinfektionsmittel vorsichtig über den aufgesaugten Fleck, wobei Sie wiederum an den Rändern beginnen und den Bereich mit dem Desinfektionsmittel sättigen.
* Lassen Sie das Desinfektionsmittel ausreichend lange einwirken (mindestens 30 Minuten), um das verschüttete Material zu inaktivieren.
* Verwenden Sie Papiertücher zum Aufwischen der verschütteten Flüssigkeit. Verwenden Sie eine Zange oder Pinzette, um zerbrochenes Plastik, Glas oder andere scharfe Gegenstände aufzusammeln, die Handschuhe durchstechen könnten.
* Entsorgen Sie das absorbierende Material im Autoklavenabfall.
* Reinigen Sie den verschütteten Bereich mit frischen, in Desinfektionsmittel getränkten Papiertüchern. Befeuchten Sie den verschütteten Bereich gründlich und lassen Sie ihn für die erforderliche Zeit desinfizieren, dann wischen Sie den Bereich mit Handtüchern auf.
* Entsorgen Sie alle Reinigungsmaterialien in einem Behälter für chemische Abfälle und alle kontaminierten PSA in einem Biogefährdungsbeutel. Verschließen und sichern Sie die Beutel.
* Legen Sie den Beutel in einen zweiten Biogefährdungsbeutel, sichern Sie ihn und desinfizieren Sie ihn durch Autoklavieren.

Melden Sie alle Vorfälle dem Vorgesetzten.

## Erste Hilfe

* Bei Kontakt mit der Kleidung: Sofort ausziehen und die betroffene Haut mit reichlich Wasser abspülen.
* Bei Hautkontakt oder Injektion mit AAVs: die betroffene Stelle mindestens 15 Minuten lang mit Wasser und Seife waschen. Einen Arzt aufsuchen.
* Bei Verschlucken: Viel Wasser trinken, dann sofort einen Arzt aufsuchen.
* Bei Einatmung: An die frische Luft gehen, dann sofort einen Arzt aufsuchen.
* Bei Augenkontakt: Mindestens 15 Minuten lang mit Wasser spülen. Einen Arzt konsultieren.
* Melden Sie alle Vorfälle dem Vorgesetzten und tragen Sie sie in das Erste-Hilfe-Buch ein.

## Ordnungsgemäße Abfallentsorgung

* Entsorgen Sie alle festen Abfälle in einem Autoklavenbeutel. Verschließen Sie den Beutel mit Autoklavierband. Legen Sie den Beutel in einen zweiten Beutel, verschließen Sie diesen und desinfizieren Sie ihn durch Autoklavieren (> 1 Stunde bei 121°C).
* Entsorgen Sie alle flüssigen Abfälle in einem Autoklavierflasche. Verschließen Sie die Flasche und dekontaminieren Sie die Außenseite mit einem Desinfektionsmittel. Desinfizieren Sie die kontaminierte Flüssigkeit durch Autoklavieren (> 1 Stunde bei 121°C).

Ich bestätige hiermit, dass ich die Arbeitsanweisungen für die Arbeit mit AAVs gelesen habe, und erkläre mich bereit, diese Anweisungen zu befolgen.

Name:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_ Datum:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

Unterschrift:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_