

Abonnieren Sie DeepL Pro, um dieses Dokument zu bearbeiten.
Weitere Informationen finden Sie auf [www.DeepL.com/pro](https://www.deepl.com/pro?cta=edit-document)

# Betriebsanleitung für biologische Stoffe

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Organisation:** | Universität HeidelbergInstitut für Neurobiologie | **Zimmer:** | INF 366, Räume 141, 150 und 151 |  |
| **Forschungsgruppen:** | Bading, Cicciolini, Mauceri, Oliveira, Wölfl | **Aktivitäten:** | Herstellung und Reinigung von rAAVs; Infektion von kultivierten Säugetierzellen mit rAAVs; intraokulare, intraspinale und intrakranielle Injektion von rAAVs in Mäuse und Ratten *in vivo*; Lagerung von rAAVs |
| **Verantwortliche Person:** | Prof. Hilmar Bading | **Erstellt von:** | Dr. Anna M. H. Hertle | **Datum:** | 21.11.2023 |
|  |  |  |  |  |  |

**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 AAVs 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 das Wirtstier oder die Wirtszellen potenziell ein Virus enthalten, das als Helfer fungieren könnte (z. B. Mäuse, die voller Retroviren sind).
* Für rekombinante 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, Verschlucken, Kontakt mit den Schleimhäuten (einschließlich der Augen) und versehentliche Injektion.

## 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 mit dem spezifischen Expressionskonstrukt in Einklang stehen. *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 [(](http://www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/Datenbanken/datenbanken_node.html)www.zkbs-online.de/ZKBS/DE/Datenbanken/datenbanken\_node.html), des International Cancer Genome Consortium [(https://dcc.icgc.org/)](https://dcc.icgc.org/), des Bushman-Labors (allOnco; http://www.bushmanlab.org/links/genelists), des Zhao-Labors [(](https://ongene.bioinfo-minzhao.org/index.html)https://ongene.bioinfo-minzhao.org/index.html) oder von Jake Lever und Kollegen [(](http://bionlp.bcgsc.ca/cancermine/)http://bionlp.bcgsc.ca/cancermine/). Es ist ratsam, mehrere Datenbanken zu durchsuchen.

## Sicherheitsmaßnahmen und Verhaltenskodizes

* Arbeiten Sie in einem gut belüfteten Bereich. Arbeiten in einer biologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II in einer S1- oder S2-Einrichtung und/oder über absorbierenden Matten durchführen.
* Tragen Sie einen Laborkittel, eine Schutzbrille, Handschuhe (erwägen Sie doppelte Handschuhe!) und - bei der Arbeit mit S2-AAVs oder beim Umgang mit S2-AAVs oder S2-AAV-haltigen Kulturen außerhalb der Containment-Ausrüstung - eine FFP2-Maske.
* Vor dem Verlassen des S2-Labors sind die Hände zu desinfizieren und zu waschen.
* Die Unterbringung der Tiere kann auf der Stufe S1 beibehalten werden (sofern kein Helfervirus vorhanden ist).

## Dekontamination

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

* Oberflächen und Arbeitsbereiche mit einem der folgenden Mittel desinfizieren: 10%ige Bleiche (0,5% Natriumhypochlorit) für 5 Minuten, 1%iges Virkon S für 10 Minuten oder 4%iges Aldasan 2000 für 5 Minuten. Anschließend mit Wasser oder 70%igem Ethanol nachspülen.
* Dekontaminieren Sie wiederverwendbare Glas- und Kunststoffgeräte, indem Sie sie mindestens vier Stunden lang in 4%igem Aldasan 2000 einweichen und anschließend autoklavieren.
* Dekontaminieren Sie Labormäntel durch Autoklavieren.

## Verhalten im Falle einer Gefahr

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:
* Decken Sie die verschüttete Flüssigkeit mit absorbierendem Material ab. Beginnen Sie an den Rändern und arbeiten Sie sich zur Mitte hin vor.
* Gießen Sie das Desinfektionsmittel vorsichtig über die verschüttete Flüssigkeit, wobei Sie wiederum an den Rändern beginnen und den Bereich mit dem Desinfektionsmittel sättigen.
* Lassen Sie eine ausreichende Einwirkzeit (mindestens 30 Minuten) verstreichen, 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, mit Desinfektionsmittel getränkten Papiertüchern. Den verschütteten Bereich gründlich befeuchten und für die erforderliche Zeit desinfizieren lassen, dann den Bereich mit Handtüchern abwischen.
* 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 Berührung mit der Kleidung: Sofort ausziehen und die betroffene Haut mit viel Wasser abspülen.
* Bei Hautkontakt oder Injektion mit AAVs: Waschen Sie die betroffene Stelle mindestens 15 Minuten lang mit Wasser und Seife. Konsultieren Sie einen Arzt.
* Bei Verschlucken: viel Wasser trinken, dann sofort einen Arzt aufsuchen.
* Bei Einatmen: An die frische Luft gehen, dann sofort einen Arzt aufsuchen.
* Bei Augenkontakt: Mindestens 15 Minuten lang mit Wasser spülen. Einen Arzt aufsuchen.
* 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 und sichern Sie den Beutel. Legen Sie den Beutel in einen zweiten Beutel, sichern Sie ihn und desinfizieren Sie ihn durch Autoklavieren (> 1 Stunde bei 121°C).
* Entsorgen Sie alle flüssigen Abfälle in einem Autoklavenkrug. Verschließen Sie den Krug 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:\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

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