

Freie Universität Berlin, Fachbereich Biologie, Chemie,
Pharmazie, Altensteinstr. 23a, 14195 Berlin

Das Präsidium
Rechtsamt der Freien Universität Berlin (RA)
Referat RA I 2
z.H. Frau Born
Kaiserswerther Str. 16-18
14195 Berlin

**Fachbereich Biologie, Chemie,
Pharmazie
Institut für Chemie und Biochemie
Forschungsgebäude SupraFAB**

Dr. Katharina Achazi
Altensteinstr. 23a
14195 Berlin

Telefon +49 30 838-59145

Fax +49 30 838-459145

E-Mail katharina.achazi@fu-berlin.de

Internet <https://www.bcp.fu-berlin.de/achazi>

**Bearb.-Zeichen
Bearbeiter/in**

Berlin, 15.12.2023

Gen-Anlage 92/14

Betreiber: Freie Universität Berlin –Das Präsidium– (Körperschaft des öffentl. Rechts)

Standort: FB BIO/CH/PHA, Institut für Chemie & Biochemie, SupraFAB
Altensteinstr. 23a, 14195 Berlin

PL: Dr. Katharina Achazi, Dr. Stefanie Wedepohl, Dr. Daniel Lauster, Prof. Dr.
Christian Freund, Dr. Dennis Nürnberg, Dr. Marta Maglione

BBS: Dr. Bernhard Loll

AG Leiter: Univ.-Prof. Dr. Rainer Haag

Antrag chemisches Inaktivierungsverfahren für die Gen-Anlage 92/14 (S2)

Sehr geehrte Frau Born,

wie telefonisch besprochen, möchte ich für Arbeiten in der Gen-Anlage 92/14 ein chemisches Inaktivierungsverfahren zusätzlich zum Autoklavieren beantragen. Dieses ist mit den weiteren Projektleitern sowie dem Beauftragten für Biologische Sicherheit der Gen-Anlage 92/14 abgesprochen.

Im Rahmen der genehmigten gentechnischen Arbeiten mit rekombinanten Influenza A Viren (IAV), Humanem Herpesvirus 1 (HHV-1) und *Escherichia coli* Stämmen führen wir Studien durch, bei denen Interaktionen der Organismen mit Polymeren und anderen Nanomaterialien auch in Zellkultur untersucht werden. Ziel dieser Arbeiten ist es Bindungen zwischen Pathogenen und den Wirtszellen besser zu verstehen und dadurch neue anti-virale und anti-bakterielle Verbindungen bzw. Beschichtungen zu identifizieren. Hierbei sollen auch mikroskopische, spektroskopische und andere Verfahren zum Einsatz kommen. Nicht alle diese Verfahren können im S2-Bereich bzw. unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt werden. Zudem werden für die



Bestimmung der Interaktionen bzw. die Auswertung von anti-viralen Verbindungen auch Plaque-Assays verwendet, welche für eine ausführliche Auswertung und Dokumentation ebenfalls ohne autoklavieren nach chemischer Inaktivierung den S2-Bereich verlassen sollen. Daher wollen wir für diese speziellen Untersuchungen die in den Proben enthaltenen Organismen ausnahmsweise durch ein alternatives Verfahren mit Formaldehyd inaktivieren, da durch Autoklavieren die Bindungseigenschaften der Organismen zerstört werden und so eine nachfolgende Analyse nicht möglich ist. Dieses Inaktivierungsverfahren soll nicht regulär zum Einsatz kommen. In Zukunft soll dieses Inaktivierungsverfahren nicht nur für rekombinante IAV, HHV-1 und *E. coli* Stämme unserer bereits genehmigten S2/S1- Arbeiten, sondern auch für weitere Viren und Bakterien der Risikogruppe (RG) 2, sowohl Wildtyp als auch gentechnisch verändert, angewendet werden. Beispiele hierfür sind Betacoronaviren, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* und *Bacillus subtilis* und *Bacillus cereus* sowie weitere *E. coli* Stämme der RG1 und RG2.

Für die Inaktivierung soll eine Lösung von mindestens einem Massenanteil von 3,7 % Formaldehyd in PBS verwendet werden, was einem Volumenanteil von 4 % Formaldehyd in PBS entspricht. Diese 3,7 % Formaldehydlösung wird üblicherweise auch als „10% neutral gepuffertes Formalin“ bezeichnet. Formaldehyd gilt als bakterizid, sporizid und viruzid und wird seit langem weltweit in Laboren für die chemische Inaktivierung von Pathogenen angewendet. Die Wirkungsweise von Formaldehyd basiert auf der chemischen Quervernetzung von Proteinen, DNA und RNA, was zu Verlust der dynamischen biologischen Funktionen und somit zu einer effektiven Inaktivierung von Organismen führt.^{1,2}

Formaldehyd-basierte Verfahren kommen in anderen Gen-Anlagen in Berlin für vergleichbare Arbeiten zum Einsatz und wurden für diese bereits genehmigt (siehe für rekombinante Alpha-, Beta, Gammainfluenzaviren bis Risikogruppe 2 Geschäftszeichen I C 45 - 141/00-i1, für Betacoronaviren bis Risikogruppe 3 unter Geschäftszeichen IV C 25 - 888/12-i2, und für *Streptococcus pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* bis Risikogruppe 2 Geschäftszeichen I C 42 - 424/01-i1/-i2).

Es gibt zudem zahlreiche internationale Studien zur Verwendung von Formaldehyd zur Inaktivierung der oben genannten Organismen zu diesem Thema. Einige relevante sind hier im Folgenden kurz zusammengefasst:

So wurde gezeigt, dass H5N1 Influenza A Virus Proben mit einer Konzentration von 10^8 EID₅₀/ml (Embryo Infectious Dose) durch eine 15 minütige Inkubation mit 0,6% Formaldehydlösung inaktiviert werden können.³ Auch eine niedrigere Formaldehydkonzentration (0,02 % bzw. 0,04 % Formalin) bei längerer Inkubation und höherer Temperatur (18h bzw. 16h 37 °C) kann Influenza A Viren erfolgreich inaktivieren.^{4, 5} Ebenfalls reicht eine 15-minütige Inkubation von Influenza A Virus



infizierten MDCK-Zellen mit Formalin (4 % Formaldehyd gepuffert), um die Viruspartikel zu inaktivieren.⁶

Für Humanes Herpesvirus 1 wurde gezeigt, dass eine 2 % Formaldehydlösung eine Viruslösung mit 10^9 PFU/mL erfolgreich inaktivieren kann.⁷ Für das Cytomegalovirus (CMV), das ebenfalls zur Familie der Herpesviren gehört, wurde gezeigt, dass eine 15-minütige Inkubation mit Formalin (4 % Formaldehyd gepuffert) ausreicht, um Viruspartikel in MRC-5-Zellen zu inaktivieren.⁸

Für Betacoronaviren gibt durch die SARS-CoV-2 Pandemie zahlreiche Studien, dass diese erfolgreich mit Formaldehyd inaktiviert werden können. Eine 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit einer 3,7% Formaldehydlösung reicht aus, um die Infektion von eukaryontischen Zellen durch SARS-CoV-2 Viren zu inhibieren.⁸

Für Bakterien gibt es ebenfalls Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass Kulturen von sowohl gram-positiven als auch gram-negativen Bakterien - *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* und *Bacillus subtilis* – durch Inkubation mit 4 % Formaldehydlösung bereits nach 5 min erfolgreich inaktiviert werden.⁹ Zudem wurde für *Staphylococcus aureus* gezeigt, dass bei einstündiger Inkubation bereits eine 0.5 % Formaldehydlösung für eine Inaktivierung ausreicht.¹⁰ Ebenso wurde für *Pseudomonas aeruginosa* gezeigt, dass eine 10-minütige Inkubation mit 4 % Formaldehydlösung erfolgreich zu Inaktivierung führt.¹¹

Ich beantrage daher mit diesem Schreiben die Zustimmung zur chemischen Inaktivierung von Probenmaterial und Zellkulturen mit Formaldehydlösung, welche rekombinante Influenza A Viren, Humane Herpes-Viren 1, Betacoronaviren, *Staphylococcus aureus* Stämme, *Streptococcus pneumoniae* Stämme, *Salmonella enterica* Stämme, *Escherichia coli* Stämme, *Pseudomonas aeruginosa* Stämme sowie *Bacillus subtilis* oder *Bacillus cereus* Stämme bis Risikogruppe 2 enthalten.

Im Detail erfolgt die Inaktivierung wie folgt:

Für die Inaktivierung von mit Viren oder Bakterien infizierten eukaryontischen Zellen wird zuerst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wird eine mindestens 3,7 % Formaldehydlösung zugegeben, so dass die Probe gut bedeckt ist. **Für die Inaktivierung von Virus- oder bakterienhaltiger Lösung**, welche z.B. aus Zellkulturüberstand gewonnen wird, werden die Viren bzw. Bakterien zunächst mittels Zentrifugation aufgereinigt und in PBS resuspendiert. Es werden dann je zu gleichen Teilen Virus- bzw. bakterienhaltige PBS-Lösung mit Formaldehyd-Gebrauchslösung gemischt, so dass mindestens eine 3,7 % Formaldehyd-Konzentration erreicht wird. Nach Inkubation für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur können die Proben für Analysen verwendet werden.

*Die **Inaktivierung von Influenza A Viren**, welche sehr sensitiv gegenüber Formaldehyd sind, kann alternativ auch durch Inkubation mit einer mindestens 0,15 % Formaldehydlösung (0,04 % Formalin) für 16 Stunden bei 37 °C erfolgen.*

*Die benötigte **Formaldehyd-Gebrauchslösung** wird durch eine der zwei folgenden Methoden hergestellt:*

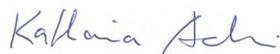
- 1. Verdünnen von 37 % Formaldehydlösung in PBS (Verwendung max. 3 Monate, Herstellungsdatum und Konzentration wird auf Gebrauchslösung vermerkt)*
- 2. Lösen von Paraformaldehyd in PBS (PFA) unter Erhitzen und Zugabe von etwas NaOH nach Cold Spring Harbour Protocols (Verwendung max. 8 Tage oder Lagerung in Aliquoten bei -20 °C)¹²⁻¹⁴*

Alternativ kann eine Fertiglösung mit entsprechender Konzentration von einem kommerziellen Anbieter bezogen werden (Verwendung/Lagerung: entsprechend Herstellerangabe).

Zu Fragen der Entsorgung, Umweltverträglichkeit wurde Herr Mertens von der Stabsstelle Nachhaltigkeit & Energie und zu Fragen der Arbeitssicherheit Herr Hoyer der Dienststelle Arbeitssicherheit zu Beratung konsultiert. Für die Inaktivierung werden nur geringe Mengen benötigt, welche im Labor separat gesammelt und über die Sonderentsorgung der Stabsstelle Nachhaltigkeit & Energie entsorgt werden. Die Herstellung der Gebrauchslösungen und die spätere Entsorgung sowie alle Inkubationsschritte finden unter einem Abzug statt. Bei der Arbeit werden Handschuhe und Kittel und, soweit nicht hinter einer Schutzscheibe gearbeitet wird, eine Schutzbrille getragen.

Die entsprechenden Literaturquellen finden sie am Ende dieses Schreibens. Bei Fragen stehe ich gerne zur Verfügung.

Mit freundlichen Grüßen



Dr. Katharina Achazi

PL Gen-Anlage 92/14

Literatur

- (1) McDonnell, G.; Russell, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* **1999**, *12* (1), 147-179. DOI: 10.1128/CMR.12.1.147 From NLM Medline.
- (2) Fraenkelconrat, H.; Cooper, M.; Olcott, H. S. The Reaction of Formaldehyde with Proteins. *Journal of the American Chemical Society* **1945**, *67* (6), 950-954. DOI: DOI 10.1021/ja01222a023.
- (3) Shahid, M. A.; Abubakar, M.; Hameed, S.; Hassan, S. Avian influenza virus (H5N1); effects of physico-chemical factors on its survival. *Virol J* **2009**, *6*, 38. DOI: 10.1186/1743-422X-6-38 From NLM Medline.
- (4) Jonges, M.; Liu, W. M.; van der Vries, E.; Jacobi, R.; Pronk, I.; Boog, C.; Koopmans, M.; Meijer, A.; Soethout, E. Influenza virus inactivation for studies of antigenicity and phenotypic neuraminidase inhibitor resistance profiling. *J Clin Microbiol* **2010**, *48* (3), 928-940. DOI: 10.1128/JCM.02045-09 From NLM Medline.
- (5) Pawar, S. D.; Murtadak, V. B.; Kale, S. D.; Shinde, P. V.; Parkhi, S. S. Evaluation of different inactivation methods for high and low pathogenic avian influenza viruses in egg-fluids for antigen preparation. *J Virol Methods* **2015**, *222*, 28-33. DOI: 10.1016/j.jviromet.2015.05.004 From NLM Medline.
- (6) Kap, M.; Arron, G. I.; Loibner, M.; Hausleitner, A.; Siaulyte, G.; Zatloukal, K.; Murk, J. L.; Riegman, P. Inactivation of Influenza A virus, Adenovirus, and Cytomegalovirus with PAXgene tissue fixative and formalin. *Biopreserv Biobank* **2013**, *11* (4), 229-234. DOI: 10.1089/bio.2013.0010 From NLM Medline.
- (7) Pollara, G.; Jones, M.; Handley, M. E.; Rajpopat, M.; Kwan, A.; Coffin, R. S.; Foster, G.; Chain, B.; Katz, D. R. Herpes simplex virus type-1-induced activation of myeloid dendritic cells: the roles of virus cell interaction and paracrine type I IFN secretion. *J Immunol* **2004**, *173* (6), 4108-4119. DOI: 10.4049/jimmunol.173.6.4108 (accessed 12/5/2023). From NLM Medline.
- (8) Seeburg, U.; Urda, L.; Otte, F.; Lett, M. J.; Caimi, S.; Mittelholzer, C.; Klimkait, T. Virus Inactivation by Formaldehyde and Common Lysis Buffers. *Viruses* **2023**, *15* (8). DOI: 10.3390/v15081693 From NLM Medline.
- (9) Zhu, L.; Rajendram, M.; Huang, K. C. Effects of fixation on bacterial cellular dimensions and integrity. *Iscience* **2021**, *24* (4), 102348. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102348 From NLM PubMed-not-MEDLINE.
- (10) Nagasawa, Y.; Kiku, Y.; Sugawara, K.; Hirose, A.; Kai, C.; Kitano, N.; Takahashi, T.; Nochi, T.; Aso, H.; Sawada, S. I.; et al. Staphylococcus aureus-specific IgA antibody in milk suppresses the multiplication of S. aureus in infected bovine udder. *BMC Vet Res* **2019**, *15* (1), 286. DOI: 10.1186/s12917-019-2025-3 From NLM Medline.
- (11) Kolbe, U.; Yi, B.; Poth, T.; Saunders, A.; Boutin, S.; Dalpke, A. H. Early Cytokine Induction Upon Pseudomonas aeruginosa Infection in Murine Precision Cut Lung Slices Depends on Sensing of Bacterial Viability. *Frontiers in immunology* **2020**, *11*, 598636. DOI: 10.3389/fimmu.2020.598636 From NLM Medline.
- (12) Paraformaldehyde (PFA; 4%). *Cold Spring Harbor Protocols* **2009**, *2009* (12), pdb.rec12044. DOI: 10.1101/pdb.rec12044.
- (13) Paraformaldehyde in PBS. *Cold Spring Harbor Protocols* **2006**, *2006* (1), pdb.rec9959. DOI: 10.1101/pdb.rec9959.
- (14) Helander, K. G. Formaldehyde prepared from paraformaldehyde is stable. *Biotech Histochem* **2000**, *75* (1), 19-22. DOI: 10.3109/10520290009047980 From NLM Medline.