

אל: עובדי המעבדות הביולוגיות ועובדי בית החיות

מאת: יחידת הבטיחות

תאריך: 21.07.10

הנדון: הוראות עבודה עם וקטור *Lenti virus*

הקדמה:

לנטי-וירוס (*Lenti virus*), שייך למשפחת ה-*Retroviridae* ומאופיין בתקופת אינקובציה ממושכת, ומכאן שמו *lenti* = איטי. הוקטורים של לנטי-וירוס בהם משתמשים במעבדות התקבלו כתוצאה ממודיפיקציות שנעשו על וקטורים כמו: FIV (feline immunodeficiency virus), SIV (Simian immunodeficiency virus), EIAV (equine infectious anemia virus) ועוד ובעיקר על HIV (human immunodeficiency virus). רוב הוקטורים המקוריים נחשבים כפתוגנים לאדם. הוקטור הנגיפי, המשמש למחקר, עטוף במעטפת חלבונית שמקורה בוירוס VSV-G (Vesicular stomatitis virus G) במקום המעטפת המקורית של HIV. מעטפת חלבונית זו מאפשרת לו להתקיף טווח נרחב של תאים בניגוד ל-HIV. בנוסף, הוקטור יכול להכנס דרך הפורות במעטפת הגרעין ולעבור אינטגרציה ל-DNA וזאת בניגוד לרטרו-וירוסים שלא חודרים את ממברנת הגרעין וחייבים לחכות לחלוקת התא. תכונות אלו הופכות את הלנטי-וירוס לכלי אטרקטיבי במעבדות מחקר המשמש כשיטה יעילה להחדרת חומר גנטי לתא, החלפת חומר גנטי פגום או חסר. בעזרת הלנטי-וירוס ניתן לבצע טרנספקציות יעילות, לסמן *in-vivo*, ליצור בע"ח טרנסגניים ועוד. השימוש בוקטור לנטי-וירוס מעורר סוגיות של בטיחות לעובד ולסביבה. הסיכונים העיקריים בעבודה עם וקטורים מסוג לנטי-וירוס הם:

- יצירה של נגיפים בעלי יכולת התרבות - replication-competent lentivirus (RCL).
- יכולת לגרום להתמרה סרטנית של תאים.
- Vector mobilization.

חדירת הנגיף לגוף יכולה להתרחש:

- דרך העור – ע"י דקירה או ספיגה דרך חתך, פצע או גירוי בעור.
- דרך הריריות – עיניים, אף, פה.

מתוך כל אלה, מוגדר הלנטי-וירוס ברמת בטיחות BSL2+. כלומר עבודה ברמה BSL2 עם אימוץ נהלי עבודה של רמה BSL3. המטרה העיקרית של הוראות אלה למנוע זיהום של העובד ו/או הסביבה ע"י הלנטי-וירוס באמצעות טיפות או תרסיס. לכן, **כל עבודה עם לנטי-וירוס תתבצע במנדף ביולוגי, בחדר המוגדר ברמה BSL2+.**

- אנו ממליצים להשתמש בפלסמידים מהדור השלישי לפחות (מערכת המכילה ארבעה פלסמידים).
פלסמידים מהדור השלישי מאפשרים יצירת נגיף חסר יכולת התרבות, למשל Virapower from Invitrogen המומלץ ע"י מכוני הבריאות האמריקאים. מערכת זו כוללת מספר יתרונות:
- משתמשים רק בשלושה גנים במערכת הוקטור – gag, pol – על פלסמיד אחד ו- rev על השני. הגן tat אינו מבוטא במערכת זו.
 - HIV-1 env מוחלף ע"י הגן VSV-G.
 - הוקטור וגנים מבניים חיוניים אחרים מופרדים לארבעה פלסמידים ומוספים באופן ארעי.
 - הוקטור עובר השבתה עצמית מפעולה עקב חסר ב- 3'LTR (U3).

הוראות עבודה במעבדה עם וקטור לנטי-וירוס:

1. כל עבודה עם לנטי-וירוס תתבצע בחדר המוגדר ברמה BSL2+.
2. ציוד חיוני בחדר הייעודי:
 - * מנדף ביולוגי (Class II).
 - * צנטריפוגה אטומה ומבחנות צנטריפוגה סגורות.
 - * מיקרוסקופ.
 - * אינקובטור.
 - * מאזניים.
 - * ציוד לפסולת ביולוגית (פחים, שקיות biohazard וכו').
 - * ציוד לחיטוי (אקונומיקה, בקבוק ספריי, מגבות נייר וכו').
 - * מערכת פיפטורים.
3. שילוט על דלת הכניסה חייב לציין:
 - * עבודה עם לנטי-וירוס.
 - * הגבלת הכניסה למורשים בלבד.
4. לפני תחילת העבודה:
 - * לבש חלוק מעבדה (עדיף חד פעמי) ושני זוגות כפפות.
 - * הכן תמיסת חיטוי (ראה סעיף חיטוי).
 - * הכן שקית biohazard בתוך המנדף ושקית נוספת בתוך דלי פסולת biohazard.
 - * מומלץ לא להשתמש בכלים חדים, אך אם אינך יכול להמנע מכך הכן מיכל יעודי לפינוי בתוך המנדף.
5. יש להעביר את כל הציוד החד פעמי כגון פיפטות, בקבוקים, צלחות ועוד לשקית biohazard. אין להשאיר פסולת של לנטי-וירוס בחדר לאחר סיום העבודה.

6. השתמש בטיפים ופיפטות בעלי פילטר. אסוף את הטיפים המשומשים לתוך שקית אשפה שולחנית בתוך המנדף, אותה יש לעטוף בשקית נוספת ולהעביר לשקית biohazard גדולה.
7. שמור על דלת חדר התרביות סגורה כל זמן העבודה עם הלנטי-וירוס.
8. אין להכניס וקטורים או נגיפים אחרים למנדף כל זמן העבודה עם נגיף הלנטי.
9. אין להשאיר תמיסות המכילות נגיף, במנדף או בצנטריפוגה, ללא השגחה.
10. ציוד המיגון האישי, חלוק חד פעמי וכפפות, יש לשים בשקית הפסולת biohazard.
11. במידה ולבשת חלוק בד ולא חלוק חד פעמי, יש להכניס את חלוק הבד לשקית biohazard נקייה ולהעביר באוטוקלאב בטמפ' של 121°C למשך 30 דקות. רק אחרי תהליך העיקור ניתן להשתמש בחלוק זה, או לחלופין להשליכו לכביסה.
12. אין לעבור ממעבדת לנטי למעבדה אחרת בלבוש בו עבדתם עם הנגיף. מותר לצאת מהמעבדה רק עם חלוק בד נקי וכפפות נקיות.
13. עדיף לגדל תאים המיועדים להדבקה עם הנגיף בבקבוקים ולא בצלחות.
14. יש לשים על גבי מגש את הצלחות ו/או הבקבוקים המיועדים להכנס לאינקובטור.
15. שים לב להימנע מהתזה ויצירת תרסיס.
16. בתום העבודה במנדף החלף את הכפפות בכפפות חדשות. אין לגעת בציוד ומשטחים מחוץ למנדף בכפפות ששימשו לעבודה במנדף.
17. על מנת לבחון את התאים תחת המיקרוסקופ:
 - * סגור את הבקבוק.
 - * נקה את החלק החיצוני של הבקבוק בעזרת נייר ספוג ב- 70% אתנול.
 - * עם תום העבודה נקה את משטח המיקרוסקופ עם אתנול 70%.
18. שקיות biohazard יש לסגור (אין לאטום) לפני העברה לשקית ה- biohazard אשר בדלי הייעודי. את השקית החיצונית יש לסגור גם כן ולהעביר ל:
 - * מיכל איסוף של פסולת ביולוגית – במידה ויש בפקולטה השמדות מרוכזות באוטוקלאב.
 - * השמדה עצמאית באוטוקלאב.
19. נפחים קטנים (פחות מ- 500 מ"ל) של פסולת נוזלית ניתן לחטא בתוך המנדף, בבקבוקי פלסטיק (בקבוק מדיום 500 מ"ל) אותם יש למלא בחמישית מהנפח של נוזל הפסולת, עם אקונומיקה ביתית המכילה 3%-5% היפוכלורייט (ריכוז סופי של ההיפוכלורייט צריך להיות 0.5%). המתן שעה ושפוף את הנוזל שעבר חיטוי לכיור שבחדר (באחריות מנהל חדר הוירוסים).
20. נפחים גדולים של פסולת נוזלית יש לחטא תוך שימוש במלכודות כפולות. בקבוק האיסוף יכול אקונומיקה ביתית המכילה היפוכלורייט. הרכוז הסופי של ההיפוכלורייט בבקבוק המלא יהיה 0.5%.



21. עם סיום השאיבה, שטוף את צינור הגומי בתמיסת היפוכלורייט נקיה.
22. בתום העבודה נקה את המנדף ואת ידידות האינקובטור, וכן כל ציוד אחר שהשתמשת בו עם אתנול 70%.
23. לאחר הסרת הכפפות שטוף ידיים עם סבון ומים.
24. צנטריפוגציה תתבצע במבחנות סגורות למניעת היווצרות תרסיס, בצנטריפוגה בתוך חדר הלנטי-וירוס תוך קיום ההוראות הבאות:
 - * מלא את מבחנות הפלסטיק לא מעבר ל- 75% מנפח המבחנה.
 - * נקה את החלק החיצוני של המבחנות היטב עם אתנול 70%.
 - * און את המבחנות בשקילה. במידה ויש להעביר נוזל ממבחנה למבחנה יש לבצע את הפעילות בתוך המנדף בחדר הלנטי-וירוס. לא לשכוח לנקות שוב את החלק החיצוני של המבחנות לפני הוצאתם מהמנדף הביולוגי.
 - * בתום הצנטריפוגציה, פתח את המבחנות בתוך המנדף הביולוגי בחדר הלנטי-וירוס.
 - * בתום הצנטריפוגציה יש לחטא את הרוטור עם אתנול 70% גם אם לא הבחנת בשפך.
25. אם ברצונך להשתמש באולטרה צנטריפוגה הממוקמת בחדר אחר, עליך לפנות למנהל חדר הוירוסים.

הוראות עבודה בבית החיות עם וקטור לנטי-וירוס:

יש להקפיד על קיום הוראות העבודה, בעבודה עם לנטי-וירוס במעבדה וגם בבית החיות.

התוספות הייחודיות לבית החיות

1. האדם שיבצע את הניסויים בחיות צריך להיות עם אישור שעבר את הקורס "עקרונות במחקר בניסויים בבע"ח".
2. ההזרקות צריכות להתבצע בתוך מנדף ביולוגי ברמה 2 או לחלופין יש להשתמש במסכה מדגם 3M-8835 ובמגן פנים.
3. יש להעדיף מחטים קטומות על פני מחטים רגילות.
4. יש להשתמש באמצעי כליאה לחיות בעת ההזרקה. לפי הצורך (לדוגמה: כאשר אין אפשרות להשתמש במחטים קטומות) יש לשקול הרדמת החיות לפני ההזרקה.
5. **תנאי הגידול של החיות לאחר ההזרקה:**
 - * לאחר ההזרקה יש לחטא היטב את אזור הדקירה. יש לעקוב במשך מספר ימים אחרי החלמת אזור הדקירה (לפי החלטת הוטרינר של בית החיות).
 - * אחרי ההזרקה, **אין** לשמור את העכברים בכלובים עם לחץ אויר חיובי. רצוי לשמור את העכברים בכלובים עם לחץ אויר שלילי. ניתן לשמור את החיות בחדר מבודד עם לחץ אויר שלילי ומנדף BSL2.
 - * לאחר שבוע, אם אזור ההזרקה החלים, ניתן להוציא את החיות מתנאי הבידוד (לאחר החלפת המצע).
6. **הטיפול בכלובים ובמצע:** לפני החלפת מצע הגידול יש להעביר את הכלוב באוטוקלאב, רק אח"כ להשליך את הפסולת ולשטוף את הכלוב. לחלופין, ניתן לפנות את הכלובים בתוך מנדף ביולוגי, כך שהמצע יוכנס ישירות לתוך שקית Biohazard שתעבור עיקור באוטוקלאב. את הכלובים ניתן לנקות עם אקונומיקה מהולה כך שריכוז ההיפוכלורייט יהיה 0.5%, לאחר שהיה של 30 דקות יש לשטוף עם מים. כמובן ששלב הניקוי עם האקונומיקה כדאי שיתקיים במנדף הביולוגי. האדם שינקה את הכלובים חייב ללבוש ציוד מגן הכולל, בנוסף לחלוק, כפפות ומשקפי מגן וגם מגן פנים.
7. יש לציין על הכלובים כי בע"ח הודבק בלנטי-וירוס.
8. יש לשמור על כל כללי העבודה עם ציוד המגן האישי, הפסולת הביולוגית והחיסוי שתוארו בפרק הוראות עבודה במעבדה עם וקטור לנטי-וירוס.
9. הוראות אלו מתייחסות גם למקרים בהם מזריקים לחיה תאים (הומניים או של בע"ח אחר) מודבקים ע"י לנטי-וירוס.
10. האישור כפוף לתאום עם ראש היחידה – ד"ר רונה שופטי.
11. חלק מהוראות אלו יכול להשתנות בהתאם לדור הלנטי-וירוס ולגנים שהוכנסו אליו. במקרים אלו, ינתנו הוראות ספציפיות ע"י ממונה בטיחות ביולוגית.

טיהור:

אמצעי הטיהור המקובל לטווח מיקרואורגניזמים נרחב (נגיפים, חיידקים, פטריות ונבגים) הוא היפוכלוריט, החומר הפעיל הנמצא באקונומיקה הביתית. ריכוז ההיפוכלוריט באקונומיקה הוא 3%-5%. ניתן לרכוש אקונומיקה ביתית מהמחסן הכללי.

1. יש לשמור בחדר באופן קבוע בקבוק של אקונומיקה ביתית לא מבושמת.
2. שמור במנדף בקבוק התזה המכיל תמיסה טרייה של 0.5% היפוכלוריט (נשמר למשך שבוע).
3. יש לציין על הבקבוק תאריך הכנת התמיסה המהולה.
4. הכן בקבוק התזה המכיל אתנול 70%.
5. הכן מגן פנים גם במעבדה וגם בבית החיות.

טיהור פסולת נוזלית:

פסולת נוזלית כמו מדיום ודוגמאות מכילות נגיף, יש לטהר ב- 0.5% היפוכלוריט – ריכוז סופי בנפח הפסולת, למשך שעה.

טיהור פסולת מוצקה:

1. פיפטות משומשות יש לטבול במיכל ייעודי המכיל 0.5% היפוכלוריט. נפח התמיסה במיכל צריך להספיק לכיסוי קצה הפיטה. לאחר מכן יש להעביר לשקית biohazard לסילוק כפסולת ביולוגית.
2. צלחות ובקבוקים יש לטהר עם תמיסת 0.5% היפוכלוריט למשך מספר דקות, לאחר מכן להעביר לשקית biohazard לסילוק כפסולת ביולוגית.
3. יש לשים לב, כי לטווח הארוך, הכנסת כלים טבולים בשאריות אקונומיקה לאוטוקלאב עלולה לגרום קורוזיה.

טיהור שפך:

1. יש לכסות את השפך בנייר סופג. יש לפזר חומר חיטוי - אקונומיקה 0.5%, סביב אזור הנתז ועל המשטח הסופג למשך 20 דקות. יש לאסוף במלקטת את תערובת הנתז עם החומר הסופג אל מיכל פסולת מזוהמת. את אזור הנתז יש לנקות בשנית ולהודיע למנהל המעבדה.

מקורות:

1. מדריך ונהלי בטיחות לעבודה עם וקטור נגיף לנטי – מכון וייצמן.
2. Biosafety Considerations for Research with Lentiviral Vectors – NIH
3. Pauwels. K., Gijssbers. R., Toelen. J., Schambach. A., Willard-Gallo, K., Verheust, C., Dedyser, Z. and Herman, P. (2009) **State-of-the-Art Lentiviral Vectors for Research Use: Risk Assessment and Biosafety Recommendations.** *Current Gene Therapy* 9,459-474.

בברכה,



ד"ר אורנה בן-נאים
ממונה בטיחות ביולוגית
יחידת הבטיחות, הטכניון