

ינואר 2022

## מדריך לעבודה עם וקטור נגיף לנטי

**נגיף לנטי (Lenti Virus)** הוא נגיף ממשפחת ה-Retroviridae המאופיין בתקופת אינקובציה ממושכת. נגיפי לנטי (HIV, SIV, FIV) כולם פתוגניים לאדם. נגיפים אלו יכולים להעביר כמות משמעותית של תוכן גנטי לתוך ה-DNA של תא המטרה, הן לתוך תא בחלוקה והן לתא שאינו בחלוקה (בניגוד לנגיפי רטרו המדביקים תאים מתחלקים בלבד).

המעטפת הטבעית של נגיף לנטי (HIV-1) מכילה גליקופרוטאין Gp120 הספציפי ל T-cells על מנת להרחיב את טווח תאי המטרה של הוקטור הנגיפי, הוכנס לו גליקופרוטאין של Vesicular stomatitis virus (VSVG). תכונות אלו הופכות את השימוש בנגיף הלנטי לשיטה היעילה ביותר להחדרת חומר גנטי לתא, להחלפת חומר גנטי פגום או חסר בריפוי גנטי וכן במחקר בסיסי להכנסת גנים משתיקים למערכות שונות. שיטה זו טובה מאוד לטרנספקציה יעילה, לסימון in vivo לחיות טרנסגניות ועוד. השימוש בוקטור המבוסס על נגיף לנטי מעורר סוגיות של בטיחות לעובד ולסביבה. קבוצת הסיכון הם העובדים עם הוקטורים.

### חדירת נגיף לגוף יכולה להתרחש:

- דרך העור – על ידי דקירה או ספיגה דרך חתך, פצע או גרוי בעור.
- דרך הריריות – עיניים, אף, פה.

### יישום קפדני של ההוראות המובאות להלן ימנעו חשיפת העובדים

העיקרון הבסיסי הינו הימנעות מזיהום באמצעות טיפות/תרסיס/דקירה מחפצים חדים. לפיכך למניעת חשיפה:

1. כל העבודה תתבצע בכלים שאינם חדים (פיפטות עשויות פלסטיק, מחט קטומה)
2. סינון יבוצע באמצעות ממברנה המורכבת במערכת תת לחץ.
3. העבודה תתבצע במנדף ביולוגי.

עפ"י נהלי הטכניון העבודה עם וקטור לנטי תתבצע בחדר תרבויות יעודי של קבוצת המחקר או בחדר וירוסים פקולטי אשר רמתו Biosafety Level 2+

אנו ממליצים להשתמש בפלסמידים מהדור השלישי המאפשרים יצירת נגיף חסר יכולת התרבות, למשל Invitrogen ViraPower המומלץ על ידי מכוני הבריאות האמריקאים. מערכת זו כוללת מספר אמצעי בטיחות למניעת כמעט כל אפשרות לקבלת נגיף שיכול להתרבות:

- הגן tat אינו מבוטא במערכת זו.
- הוקטור עובר השבתה עצמית מפעולה עקב חסר ב 3'LTR (U3)
- הגנים המקודדים לחלבונים מבניים וחיוניים הוצאו ומוספים באופן זמני באמצעות פלסמידים.
- הפלסמידים המוספים: gag-pol (בפלסמיד אחד), rev פלסמיד שני. הפלסמיד השלישי VSV-G (מאפשר הכרה ע"י מרבית סוגי התאים).

המערכת הבטיחותית ביותר הינה של הדור השלישי (ארבעה מרכיבים: שלושה פלסמידים + וקטור) העובדים עם לנטי דור 2 (לא מומלץ) חייבים לבדוק בכל הפקה חדשה כי וקטור הלנטי אינו בר התרבות (פרטים ביחידת הבטיחות).

## נוהל עבודה עם לנטי וירוס

### ציוד ונהלי עבודה

1. ציוד חיוני בחדר בו מבוצעת עבודה בווקטורי לנטי:

- מנדף ביולוגי (class II)
- צנטריפוגה ביוהזארד
- מיקרוסקופ
- אינקובטור
- ציוד לפסולת ביולוגית
- מערכת מיקרו פיפטורים
- ערכת טיפול בשפך הכוללת מגן פנים וערדליים

2. כניסה לחדר:

- הגבלת הכניסה למורשים בלבד
- על דלת החדר יוצב שילוט המציין: עבודה עם נגיף לנטי

3. לפני תחילת העבודה:

• לבש חלוק מעבדה חד פעמי על חלוק המעבדה ושני זוגות כפפות. את הכפפות החיצוניות יש להניח על שרוול החלוק על מנת להגן על אזור חיבור האמה לכף היד. ניתן ללבוש מעל החלוק שרוול חד פעמי עמיד למים.

• הכן תמיסת חיטוי (ראה סעיף חיטוי)

• הכן שקית "ביוהזרד" בתוך המנדף ושקית נוספת בתוך דלי פסולת "ביוהזרד".

• שמור על דלת חדר התרבות סגורה כל זמן העבודה עם נגיף לנטי.

• במהלך העבודה ציוד המיגון האישי יכלול: חלוק חד פעמי, 2 זוגות כפפות ומסכת פנים (surgical face mask).

ציוד מגן זה נקבע על סמך סקר סיכונים ובמטרה למנוע חשיפה דרך הריריות. כאשר מתבצעת עבודה עם הוירוס כגון: איסוף/סינון/סרכוז/הדבקת תאים במנדף ביולוגי וכאשר הסיכון הוא זיהום הריריות באמצעות הידיים.

• עבודה היוצרת אירוסולים ואין אפשרות לבצעה במנדף: יש להתייעץ עם יחידת הבטיחות על מנת לבצע סקר סיכונים ובמקרה הצורך להוסיף ציוד מגן אישי נוסף.

4. יש להשתמש בטיפים ופיפטות בעלי פילטר. יש לאסוף את הטיפים המשומשים לתוך בקבוק פלסטיק (בקבוק מדיום ריק ונקי) ולפנות את הבקבוק הסגור לשקית פסולת ביולוגית.
5. אין להכניס וקטורים או נגיפים אחרים למנדף כל זמן העבודה עם נגיף לנטי.
6. אין להשאיר תמיסות המכילות נגיף, במנדף או בצנטריפוגה, ללא השגחה.
7. אין לעבור ממעבדת לנטי למעבדה אחרת עם החלוק בו עבדתם עם הנגיף. ניתן להשאיר את החלוק החד פעמי בחדר הלנטי.
8. במידה שבחדר עובדים גם עם תרביות תאים, יש להציב את צלחות הלנטי במדף התחתון של האינקובטור כשהם נתונים במגש (כגון מכסה צלחת גדולה) זאת במטרה להכיל שפך לא מתוכנן באינקובטור.
9. סרכז יבוצע בצנטריפוגת ביוהזארד או במבחנות סגורות עם אטם למניעת היווצרות תרסיס.
10. עם סיום העבודה במנדף יש להחליף כפפות חיצוניות. אין לגעת בציוד ומשטחים מחוץ למנדף בכפפות מזוהמות.
11. שימוש באולטרה צנטריפוגה יבוצע על פי ההוראות הבאות:
  - מלא את מבחנות הפלסטיק לא מעבר ל-75% מנפח המבחנה.
  - אזן את המבחנות ע"פ נפח בתוך המנדף בחדר הלנטי.
  - הנח בזהירות את המבחנות בתוך מיכלי המתכת.
  - סגור את מיכלי המתכת בעזרת פקק מתכת מתאים (מכיל אטם).
  - נקה את החלק החיצוני של המיכל עם אתנול 70%, החלף לכפפות נקיות.
  - בתום הצנטריפוגציה, פתח את המבחנות בתוך המנדף.
  - חטא את מיכלי הצנטריפוגה, הרוטור וקיר הצנטריפוגה עם אתנול 70%, גם אם לא הבחנת בשפך.
12. הוצאת תאים מודבקים מחדר הווירוסים - הוצאת תאים שעברו טרנספקציה וירלית, לצורך בצוע תהליך הכולל שימוש במכשור המוצב מחוץ לחדר תרביות/לנטי, או עבודה במעבדה במכשירים כדוגמת FACS מיקרוסקופיה, תתאפשר בהינתן שהתקיימו 2 התנאים הבאים:
  - 12.1 חלפו לפחות 48 שעות מתם הטרנספקציה הווירלית.
  - 12.2 בוצעו לפחות ארבע החלפות מדיום/שטיפות לתאים (בעדינות ע"מ לא לאבד תאים). שטיפה זו מבטיחה שמספר הווירוסים הנותרים בצלחת הינו פחות מהמנה הנדרשת להדבקה. כמו כן יש לנגב את שולי הכלי עם ניר סופג ב 70% אתנול. (לנטי דור 2, לפחות 4 שטיפות לנטי דור 3, לפחות 3 שטיפות)
13. הוצאת וירוסים מהחדר: מבחנה עם וירוס (פקק מוברג) יש לכסות עם פרפילם, לחטא עם 70% אתנול, להכניס לשקית השמדה שולחנית, לסגור את השקית, לחטא שוב עם 70% אתנול, להכניס לשקית השמדה שולחנית שניה ונקיה, לסגור את השקית, ורק אז להוציא מחדר הווירוסים. לחילופין מבחנה עם וירוס (פקק מוברג) יש לכסות עם פרפילם, לחטא עם 70% אתנול, להכניס לקופסא אטומה לנוזלים וסגורה, לחטא מבחוץ וכך להוציא מהחדר.

14. טיפול בפסולת מוצקה: יש לחטא ציוד חד פעמי כגון טיפים ופיפטות לפני העברתם לשקית הפסולת – העלאה והורדה של תמיסת 0.5% סודיום היפוכלורית.

15. טיפול בפסולת נוזלית – כל הפסולת הנוזלית תועבר לעיקור באוטוקלב. \*פסולת נוזלית בכמות קטנה של עד 1 מ"ל - יש לחטא עם 0.5% סודיום היפוכלורית ולאסוף את הפסולת הנוזלית לבקבוק פלסטיק עם פקק מתברג, לסגור את הבקבוק ולהעבירו לשקית הפסולת ( כמפורט בסעיף 14).

16. עם סיום העבודה יש:

- לנקות את משטחי העבודה והציוד ב 70% אתנול.
- לפנות את הפסולת הנוזלית כמפורט מעלה.
- לסגור את שקית הפסולת המוצקה ולפנותה למיכל הפסולת המחלקתי.
- לנקות את המנדף ואת ידיי האינקובטור באתנול 70%.
- לשטוף ידיים עם סבון ומים (עשרים שניות).

### חיטוי וטיפול בשפך המכיל לנטי

חיטוי:

אמצעי החיטוי המקובל הוא סודיום היפוכלורית, שמצוי במחסן הכימיקלים כתמיסת 11% סודיום היפוכלורית, מספר קטלוגי 020015987.

- שמור במנדף בקבוק המכיל תמיסה טרייה של 0.5% סודיום היפוכלורית (נשמר למשך חודש בלבד).
- הכן בקבוק המכיל אתנול 70%.

### טיפול בשפך קטן

כסה את השפך בנייר מגבת ובזהירות שפוך על הנייר תמיסת 1% סודיום היפוכלורית. אסוף את הנייר לתוך שקית ביוהזרד.

### טיפול בשפך גדול

כסה את נעליך בערדליים וחבוש מגן פנים למניעת התזה תוך כדי תהליך הטיהור. כסה את השפך בנייר מגבת ובזהירות שפוך על הנייר תמיסת 1% סודיום היפוכלורית. אסוף את הנייר לתוך שקית ביוהזרד לאחר מכן חטא את המקום פעם נוספת עם 1% תמיסת סודיום היפוכלורית. במקרה הצורך חייג 2222 לקבלת עזרה.

### טיפול בנתזים

כסה את השטח עם נייר מגבת, שפוך תמיסת 0.1% סודיום היפוכלורית או אתנול 70%. אסוף את נייר המגבת לתוך שקית ביוהזרד נגב את השטח פעם נוספת עם תמיסת החיטוי.