

## נהלי עבודה ובטיחות בעבודה עם לנטי-וירוס

נגיפי הלנטי (FIV,SIV,HIV) הינם פתוגנים לאדם.  
נגיף ה-HIV הוא מסוג : RNA+ חד גדילי , התוקף תאים המציגים על גבי הממברנה שלהם את הרצפטור CD<sub>4</sub> כלומר: מונוציטים תאים דנדריטים ותאי T- helper .  
יכולתם של נגיפי הלנטי להדביק תאים נייחים ומתחלקים כאחד היא זו ההופכת אותם לאטרקטיביים בעבודה עם וקטורים המבוססים על נגיפים אלו.  
כיום מומלץ ומקובל בעולם לעבוד עם פלסמידים מהדור השלישי, המאפשרים יצירת נגיף חסר יכולת התרבות.

מכוני הבריאות האמריקאים ממליצים לעבוד עם מערכת כמו זו של : Invitrogen  
Virapower. מערכת כזו כוללת מספר אמצעי בטיחות:

1. מערכת הוקטור מכילה רק 3 גנים: gag, pol על פלסמיד אחד ו- rev על פלסמיד שני.
2. גן ה- Tat אינו מבוטא במערכת זו (החיוני לרפלקציה של HIV-1 wild-type).
3. HIV- env, מוחלף על ידי הגן- VSV-G (המעטפת הטבעית של HIV-1 הוחלפה על ידי Vesicular Stomatitis Virus על מנת להרחיב את טווח תאי המטרה של הוקטור הנגיפי).
4. הוקטור וגנים מבניים וחיוניים אחרים מופרדים בארבעה פלסמידים ומוספים באופן ארעי.
5. הוקטור חסר יכולת פעולה ( השבתה עצמית), עקב חוסר ה- 3'LTR(U3).

## **הסיכונים בעבודה עם וקטורי-לנטי וירוס**

הסיכונים העיקריים בעבודת עם וקטורי לנטי וירוס המבוססים על HIV הם:

- הפוטנציאל לקבלת חלקיקי לנטי וירוס היכולים להתחלק/ להדביק.
- ופוטנציאל לאונקוגניות .

## **חדירת הנגיף לגוף יכולה להתרחש:**

- דרך העור- כתוצאה מדקירה או פגיעה מכלי חד. חדירה דרך חתך או פצע .
- דרך הריריות –עיניים אף פה.
- דרך/ באמצעות טיפות או תרסיס .

## **נהלי עבודה**

העבודה עם וקטורי לנטי וירוס חייבת להתבצע במעבדה בדרגת בטיחות BSL-2 או BSL-2+ בהתאם להחלטת יחידת הבטיחות האוניברסיטאית . העבודה תתבצע במעבדה מחלקתית ייעודית . מעבדה זו יכולה לשמש גם כחדר תרביות רקמה כללי.

1. חדר תרביות רקמה המיועד לעבודה עם נגיף לנטי חייב להיות מצויד בתשתיות (ראה סעיף 2 להלן) ומאושר על ידי ממונת בטיחות ביולוגית .

### **2. ציוד הכרחי בחדר הייעודי:**

- מנדף ביולוגי ( Class II )
- צנטריפוגה ומבחנות צנטריפוגה סגורות
- אינקובטור
- מיקרוסקופ (רצוי)
- מתקני פסולת ביולוגית

- פיפטות וטיפים עם פילטר
- כלי עבודה שישמשו חדר זה בלבד

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), שתי זוגות כפפות ושרוולים (כדי להגן על האזור שבין החלוק לכפפות).
- משקפי מגן
- נעליים סגורות
- נשמית (מסכה)
- הכן תמיסת חיטוי
- הכן דלי פסולת "ביו-הזארד" עם זוג שקיות ביו-הזארד (האחת בתוך השנייה) וכן שקית "ביו-הזארד" בתוך המנדף.
- מומלץ לא להשתמש בכלים חדים. במידה ואינך יכול להימנע מכך, הכן מיכל לפינוי "חדים".

5. רצוי ומומלץ, בעבודה עם תרביות המכילות את הלנטי-וירוס, לעבוד עם flasks - filtered.

6. השתמש בטיפים ופיפטות בעלי פילטר. אסוף את הטיפים המשומשים לתוך בקבוק פלסטיק (בקבוק מדיום ריק ונקי) והעבר את הבקבוק עם מעט מים ולא סגור הרמטית לשקית הפסולת.

7. כלים חד-פעמיים המזוהמים בפטוגנים, יזרקו לתוך הפח הביולוגי הממוקם בתוך המנדף הביולוגי. הפח הביולוגי המצוי מחוץ למנדף משמש לפסולת שאינה מדבקת.

8. שמור על דלת חדר התרביות – סגורה, כל זמן העבודה עם נגיף/וקטור הלנטי.
9. אין להכניס וקטורים או נגיפים אחרים כל זמן העבודה עם הוקטור / נגיף.
10. אין להשאיר תמיסות המכילות נגיף, במנדף או בצנטריפוגה, ללא השגחה.
11. את ציוד המגן האישי, חלוקי חד פעמי, כפפות ושרוולים, יש לשים בשקית הפסולת "ביו-הזארד", בתוך החדר המאושר לעבודה בלנטי.
12. אין לעבור ממעבדת לנטי למעבדה אחרת, בלבוש בו עבדתם עם הנגיף. מותר לצאת את המעבדה רק עם חלוקי בד נקי וכפפות נקיות.
13. את ה- flasks יש לשים בתוך האינקובטור על גבי מגש.
14. שים לב להימנע מהתזה ויצירת תרסיס.
15. בסיום העבודה בתוך המנדף, החלף את הכפפות המזוהמות בכפפות נקיות. אין לגעת בציוד ובמשטחים מחוץ למנדף, בכפפות מזוהמות.
16. בסופה של העבודה, יש לסגור את שקית הפסולת הביולוגית, גם אם אינה מלאה. למחרת עם חידוש העבודה, ניתן לפתוח את השקית שוב עד לכ-2/3 מנפחה, לפני שליחתה לאוטוקלב.

**17. א'. על מנת לבחון את התאים תחת המיקרוסקופ, נקט בצעדים הבאים:**

- סגור היטב את ה- flasks
- הבא את ה- flasks למיקרוסקופ על גבי מגש ייעודי (עם "חיתול" סופג).
- במידה והמיקרוסקופ ממוקם בקומה אחרת או בבניין אחר, יש לאפסן את הדגימות בכלי אטום- בלתי שביר.
- עם תום העבודה, נקה את משטח המיקרוסקופ עם אתנול 70%.

**17 ב'. על מנת לבחון את התאים תחת המיקרוסקופ הקונפוקלי, נקט בצעדים הבאים:**

במידה והאובייקט הנבדק במיקרוסקופ הינו בעל פאזה נוזלית, עם התכנות להמצאות הפתוגן במדיום הנוזלי, אזי :  
בטרם הגעה למיקרוסקופ: יש לאסוף את המדיום, (לשומרו באינקובטור- במידת הצורך), לשטוף את התאים בזהירות 3-4 פעמים עם PBS או מדיום עבודה, ולהחליף את המדיום המכיל את הפתוגן עם מדיום חדש.  
כל האמור לעיל בנוסף לכתוב בסעיף 17 א', כלומר : איפסון הדגימות בכלי בלתי שביר ואטום לצורך התניידות מחוץ למעבדה, מגש עם "חיתול" סופג, "ערכה" לטיפול בשפך וכ"ו.

18. את שקיות הביו-הזארד יש לסגור (לא בחוזק אלא בצורה די רופפת). יש להוסיף מעט מים :

לשקית יבשה יש להוסיף עד 250 מ"ל. את השקית החיצונית יש לסגור גם כן (בצורה רופפת) ולהעביר לטיהור, על ידי אוטוקלב.

19. פסולת נוזלית בנפח של פחות מ- 500 מ"ל ניתן לחטא בתוך המנדף. יש למלא את הבקבוק בעשירית מנפח נוזל הפסולת, עם סודיום היפוכלורייט 10%. יש להמתין 1 שעה, ולאחר מכן ניתן לשפוך את הנוזל שעבר חיטוי לכיור שבחדר, תוך כדי הזרמת מים מהברז.

20. עבור שימוש במערכת השאיבה הקיימת בתוך המנדף, יש להשתמש במלכודת כפולה, היושבת בתוך מאצרת. אין להשתמש בפיפטות זכוכית. מומלץ להשתמש לצורך השאיבה, בטיפ חד- פעמי סטרילי, של 1 מ"ל, המחובר לצינור השאיבה, דרך פיפטת פלסטיק של 5 מ"ל, חתוכה באורך 10 ס"מ. ניתן להשתמש גם בפיפטת פסטר חד- פעמית. בקבוק האיסוף, יכיל תמיסת סודיום היפוכלורייט בריכוז 1%, ביחס 1:10 מנפח הבקבוק.

21. עם סיום השאיבה, שטוף את צינור הגומי בתמיסת היפוכלורייט נקייה.

22. צנטריפוגציה תתבצע במבחנות סגורות, למניעת הוצרות תרסיס. על הצנטריפוגה להימצא בתוך חדר נגיף הלנטי.

23. בתום העבודה: נקה את המנדף ואת ידית האינקובטור וכן את כל הציוד שהשתמשת בו, עם אתנול 70%.

24. אם ברצונך להשתמש באולטרה צנטריפוגה, הממוקמת בחדר אחר, עלייך לפעול על פי ההוראות הבאות:

- הצג שילוט המציין עבודה עם לנטי-וירוס, משך העבודה, שמך ומספר הטלפון הנייד.
- מלא את מבחנות הפלסטיק לא מעבר ל-75% מנפח המבחנה.
- אזן את המבחנות בשקילה בתוך המנדף בחדר הלנטי.
- הנח בזהירות את המבחנות, בתוך מיכל המתכת, תוך הימנעות מהתזה.
- סגור את מיכל המתכת בעזרת פקק המתכת המתאים.
- נקה את החלק החיצוני של המיכל עם אתנול 70%, החלף לכפפות נקיות ולחלוק נקי (השאר את ציוד המיגון האישי המזוהם בחדר הלנטי).
- הבא את המבחנות הסגורות, לאולטרה צנטריפוגה המחלקתית, בתוך מעמד.
- בתום הצנטריפוגציה, חטא את הרוטור עם אתנול 70%, גם אם לא הבחנת בשפך.
- את המבחנות יש לפתוח בתוך המנדף בחדר הלנטי.
- נקה את מיכלי הצנטריפוגה עם אתנול 70%.

25. בתום העבודה, לאחר הסרת הכפפות, שטוף את הידיים עם סבון ומים.

## טיהור

אמצעי הטיהור המקובל הוא סודיום היפוכלוריט המצוי במחסן הכימיקלים של האוניברסיטה כתמיסת 10%:

10.57	PURE	19330201	BIO-LAB	1LT	LT	SODIUM HYPOCHLORITE SOLUTION 10o/o	00049661
-------	------	----------	---------	-----	----	------------------------------------	----------

- שמור במנדף בקבוק המכיל תמיסה טרייה של 0.6% סודיום היפוכלוריט (מיהול 1:16 מהמקור) - נשמר למשך שבוע.
- הכן בקבוק התזה המכיל 70% אתנול.
- הכן מגן פנים במעבדת הלנטי.

#### **טיהור פסולת נוזלית**

פסולת נוזלית, כמו מדיום ודוגמאות מכילות נגיף, יש לטהר עם סודיום היפוכלוריט כך שריכוזו הסופי בבקבוק הפסולת יהיה : 1% למשך 1 שעה.

#### **טיהור שפך של נפה קטן**

כסה את השפך בנייר סופג / נייר מגבת, ובזהירות שפוך על הנייר תמיסת 0.6% סודיום היפוכלוריט. אסוף את הנייר לתוך שקית ביו-הזארד. חזור על פעולה זו פעם נוספת.

#### **טיהור שפך של נפה גדול**

חבוש מגן פנים למניעת התזה תוך כדי תהליך הטיהור. כסה את השפך בנייר סופג ובזהירות שפוך על הנייר תמיסת 0.6% סודיום היפוכלוריט. אסוף את הנייר לתוך שקית ביו-הזארד וחזור על פעולה זו שנית.

#### **טיהור טיפות התזה**

כסה את השטח בנייר סופג / נייר מגבת, ובזהירות שפוך על הנייר תמיסת 0.6% סודיום היפוכלוריט או אתנול 70%. אסוף את הנייר לתוך שקית ביו- הזארד.

#### **טיהור פסולת מוצקה**

פיפטות משומשות יש לטבול למשך 30 דקות במיכל ייעודי המכיל 0.06% סודיום היפוכלורייט. נפח התמיסה במיכל צריך להספיק לכיסוי קצה הפיפטה. לאחר מכן יש לנער קלות ולהעביר לשקית ביו-הזארד לסילוק כפסולת ביולוגית. צלחות flasks וכו' יש להעביר לשקית ביוהזארד (כפולה) ולשלוח לאוטוקלב.

\*\*\*\*\*

לאחרונה נכנס למחסן האוניברסיטה חומר חיטוי בשם **VIRUSOLVE** חומר החיטוי מגיע בבקבוק תרסיס, כמיכל (5 ליטרים) מוכן לשימוש וכמיכל (5 ליטרים) מרוכז:

מספר פריט	תיאור הפריט	י.ח. מידה	כמות	שם יצרן	מקט יצרן	נקיון	מחיר (ש"ח)
10008317	VIRUSOLVE + TRIGGER SPRAY	Each	750ML	MEDISTOCK	J30TP-1		83.33
10008316	VIRUSOLVE + RTU	Each	5l	MEDISTOCK	J30C		192.29
10008313	VIRUSOLVE+ CONCENTRATE	Each	5l	MEDISTOCK	J29C		384.59

ד"ר אסתר מייקל

ממונת בטיחות ביולוגית

טל. 640-9966

[estermic@post.tau.ac.il](mailto:estermic@post.tau.ac.il)



