

5. Liu B., Marks J.D. Applying phage antibodies to proteomics: Selecting single chain Fv antibodies to antigens blotted on nitrocellulose // *Anal. Biochem.* - 2000. - V. 286. - P. 119-128.
6. Stich N., Gandhum A., Matyushin V., Raats J., Mayer C., Alguel Y., Schalkhammer T. Phage display antibody-based proteomic device using resonanace-enhanced detection // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2002. - V. 2 - P. 375-381.
7. Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H.R. Making antibodies by phage display technique // *Ann. Rev. Immunol.* - 1994. - V. 12. - P. 433-455.
8. Smith G.P., Petrenko V.A. Phage display // *Chem. Rev.* - 1997. - V. 97. - P. 391-410.
9. Willats W.G.T. Phage display: Practicalities and prospects // *Plant Mol. Biol.* - 2002. - V. 50. - P. 837-854.
10. Clark M. V gene selection *in vitro* (phage libraries) – making assembled repertoires of antibody heavy and light chain variable domains // In: John Humphrey Advanced Lecture Series in Immunology: Immunology in Health and Disease / Eds. Asherson G., McMichael A.F.R.S., Nesmeyanov V. - London, Moscow, 2002.
11. Yau K.Y.F., Lee H., Hall J.C. Emerging trends in the synthesis and improvement of hapten-specific recombinant antibodies // *Biotechnol. Adv.* - 2003. - V. 21. - P. 599-637.
12. Тикунова Н.В., Морозова В.В. Фаговый дисплей на основе нитчатых бактериофагов: применение для отбора рекомбинантных антител // *Acta Naturae.* - 2009. - № 3. - С. 22-31.
13. Azzazy H., Highsmith W. Phage display technology: clinical applications and recent innovations // *Clin. Biochem.* - 2002. - V. 35. - P. 425-445.

ANTIBODY PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY

Dykman L.A.

Key words: *phage display, filamentous bacteriophage, combinatorial libraries, biopanning*
The article presents the current data on the use of antibody phage display in biomedical research.

УДК 619:616-07

БОКСЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ. ОСНОВЫ ЭКСПЛУАТАЦИИ И ОБСЛУЖИВАНИЯ.

*Ененко А.А., начальник аналитической лаборатории
ЗАО «Ламинарные системы», г.Миасс
Тел. +7(3513)54-47-44*

Деятельность химических, радиологических, бактериологических и других лабораторий связана с использованием различного рода защитного лабораторного оборудования. Традиционным было использование активной вытяжной системы, которая, до определенного времени, была единственным средством удаления и контроля распространения аэрозолей агентов, образующихся в процессе работы. Однако на сегодняшний день только вытяжной вентиляции недостаточно для обеспечения безопасной работы персонала, и защиты окружающей среды. Помимо этого остро стоит вопрос об организации области пространства с чистой воздушной

средой, необходимой для предупреждения попадания на продукт аэрозольных загрязнений из окружающей среды.

Современный рынок защитного лабораторного оборудования представляет широкий спектр продуктов, относящихся к лабораторной безопасности, которые, однако, можно разделить на 3 основные группы: химические вытяжные шкафы; ламинарные укрытия (или ламинарные боксы), и боксы микробиологической безопасности.

Химические вытяжные шкафы (рис. 1, а) по сути, представляют собой улучшенную версию вытяжных зонтов, подключаемых к активной вытяжной системе. Принцип работы шкафа заключается в удалении паров вредных веществ из рабочей камеры в жестко подключенную активную систему вытяжной вентиляции, с помощью направленного внутрь шкафа через рабочий проем воздушного потока. Вытяжной шкаф обеспечивает только защиту оператора от паров и аэрозолей вредных веществ, с которыми производится работа.

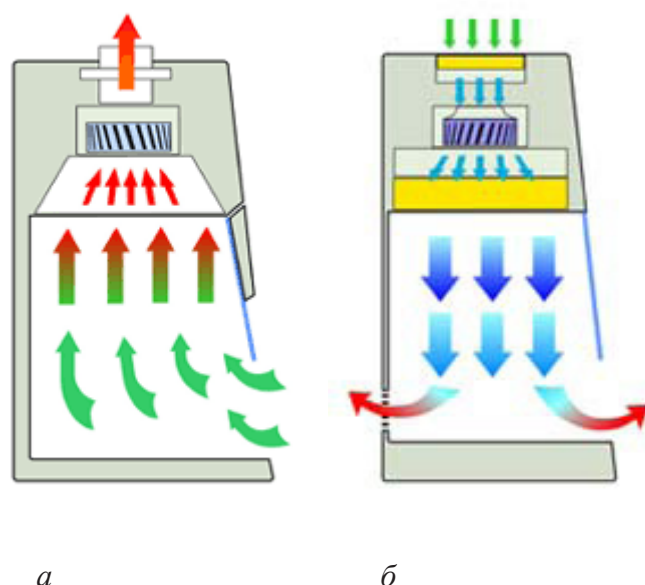


Рис. 1. а – химический вытяжной шкаф, б – ламинарное укрытие.

Ламинарные укрытия (или ламинарные боксы) (рис. 1, б) предназначены для создания беспылевой абактериальной воздушной среды и применяются при оснащении отдельных рабочих мест медицинских, фармацевтических и других учреждений с высокими требованиями к чистоте воздуха в рабочей зоне. Бокс используется при работе с препаратами и бактериальными культурами, не представляющими угрозы здоровью оператора, когда необходима защита рабочего материала от загрязнения из окружающей среды, или работа с объектом требует стерильной рабочей зоны. Воздух из помещения проходит через HEPA фильтр и подается в рабочую камеру однонаправленным вертикальным ниспадающим потоком. Из рабочей зоны воздух попадает обратно в помещение. Следует отметить, что ламинарное укрытие не обеспечивает защиты ни оператора, ни окружающей среды.

Наиболее востребованным типом защитного лабораторного оборудования сегодня являются **боксы микробиологической безопасности**. Даже среди специалистов в области инженерного обеспечения биологической безопасности существует путаница в терминах, касающихся БМБ. Это связано с тем, что на сегодняшний день в РФ не существует единой согласованной системы нормативно технической документации, определяющей минимум технических и эксплуатационных характеристики БМБ, а также регламентирующий порядок экс-

плутации и проведения проверок.

С 1 декабря 2011 года в силу вступил новый российский стандарт ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности», который является прямым переводом европейской нормы EN 12469-2000. Данный документ определяет технические требования, конструкцию БМБ, а так же состав, периодичность и методики проверок эксплуатационных характеристик БМБ. Согласно новому стандарту отличительной особенностью всех боксов микробиологической безопасности является возможность работы с потенциально опасными и опасными микроорганизмами. Также стандарт разделяет все БМБ на три класса.

БМБ I класса (по ГОСТ Р ЕН 12469-2010) – это БМБ с рабочим проемом, через который оператор может проводить манипуляции внутри бокса. Бокс должен быть сконструирован таким образом, что бы обеспечивать защиту оператора от выброса диспергированных контаминированных частиц, образовавшихся внутри бокса. Это достигается с помощью направленного внутрь бокса через рабочий проем воздушного потока, с последующей его фильтрацией и удаления из бокса.

Таким образом, БМБ I класса предназначен для обеспечения защиты оператора и окружающей среды при работе с вредными для здоровья человека агентами. Действие бокса основано на принудительном удалении опасных веществ из рабочей зоны через HEPA фильтр и выбросе их обратно в помещение или во внешнюю вытяжную систему. При работе с двумя агентами исключается их перекрестная контаминация за счет создания восходящего потока воздуха. Схема потоков воздуха БМБ I класса приведена на рис.2,а.

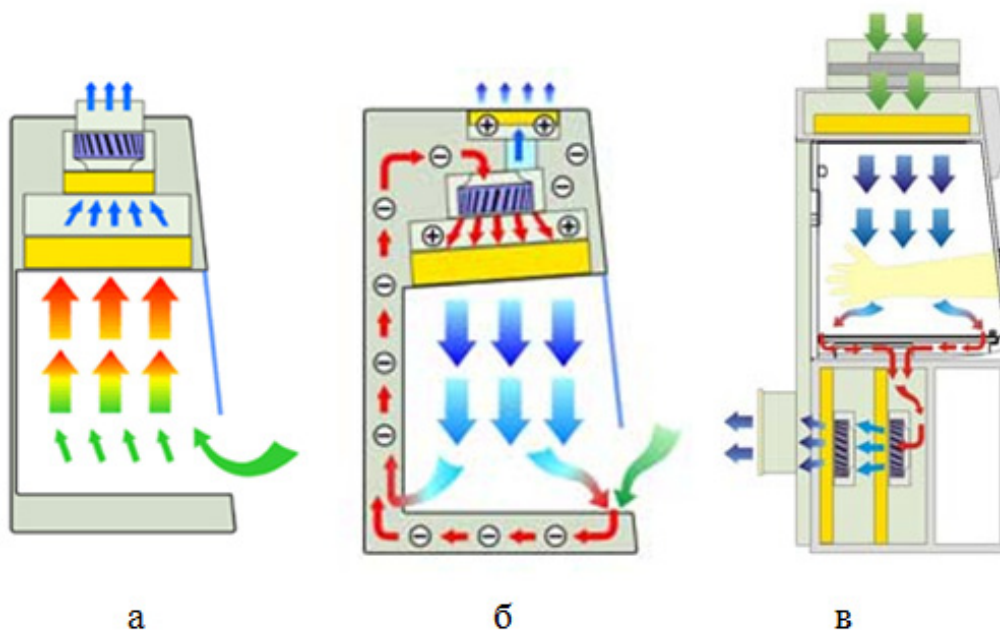


Рис.2 - а – БМБ I класса, б – БМБ II класса, в – БМБ III класса.

БМБ II класса (по ГОСТ Р ЕН 12469-2010) – это БМБ с рабочим проемом, через который оператор может проводить манипуляции внутри бокса. Бокс должен быть сконструирован таким образом, что бы оператор был защищен, риск загрязнения продукта и перекрестного загрязнения низок, а удаление возникающих загрязнений обеспечивалось с помощью профильтрованного воздушного потока, циркулирующего внутри бокса, а также с помощью фильтрации удаляемого из бокса воздуха.

Другими словами, БМБ II класса предназначен для защиты оператора и окружающей

среды от контаминации диспергированными аэрозольными частицами, возникающими при выполнении работ с биологическими агентами и микроорганизмами внутри камеры бокса, а также для защиты рабочих агентов от внешней и перекрестной контаминации.

Принцип действия бокса основан на принудительной рециркуляции части воздуха в замкнутом объеме через НЕРА фильтр. Воздух, проходя через приточный НЕРА фильтр, очищается от аэрогенных загрязнений и подается в рабочую зону однонаправленным нисходящим потоком, тем самым создавая в камере бокса чистую воздушную среду и предотвращая перекрестную контаминацию. Часть нагнетаемого вентилятором в камеру повышенного давления воздуха (обычно около 30%) через выпускной НЕРА фильтр выбрасывается в помещение. Из-за искусственно созданного разрежения происходит подсос воздуха в рабочую камеру через рабочий проем. Благодаря этому устанавливается воздушная завеса, обеспечивающая защиту оператора, см. рис. 2,б.

Наконец **БМБ III класса** (по ГОСТ Р ЕН 12469-2010) – *БМБ, в котором рабочая зона полностью изолирована, а оператор отделен от рабочего места физическим барьером (т.е. перчатки механически соединены с боксом). Профильтрованный воздух постоянно поступает в бокс, а удаляемый из БМБ воздух фильтруется для предотвращения попадания микроорганизмов в окружающую среду.*

Принцип действия бокса основан на принудительной подаче очищенного воздуха в рабочую камеру с последующим удалением контаминированного воздуха через двухступенчатую систему очистки. Воздух, проходя через НЕРА фильтр, очищается от аэрогенных загрязнений и подается в рабочую зону однонаправленным нисходящим потоком. Воздух из рабочей камеры удаляется в помещение или систему вытяжной вентиляции, предварительно пройдя двухступенчатую очистку. Манипуляции с рабочим материалом осуществляются через перчатки.

Важным вопросом, касающимся БМБ, являются проверки эксплуатационных характеристик боксов. Основными документами, обязательными для исполнения и регламентирующими эксплуатацию и минимум проверок БМБ при работе с микроорганизмами различных групп патогенности, являются Санитарные Правила.

СП 1.3.1285-03 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)» и СП 1.3.2322-08 «Безопасность работы с микроорганизмами III-IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней» требуют проводить проверку скорости входящего потока и контроля целостности фильтра боксов микробиологической безопасности II класса. Безусловно, скорость входящего потока является основным фактором, определяющим защиту оператора, однако при этом методика измерения скорости входящего потока СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08 не регламентируется.

Существует распространенное заблуждение, что скорость входящего потока в боксах II класса равномерна вдоль всего рабочего проема. Это не так. Рассмотрим подробнее вопрос определения скорости входящего потока воздуха в БМБ.

В боксах I класса, как известно, рециркуляция воздуха отсутствует, т.е. весь воздух, проходящий через вентилятор, выбрасывается наружу, предварительно пройдя через НЕРА фильтр. В таких боксах входящий поток образуется из-за создания вентилятором разрежения во всем объеме камеры бокса. Вследствие этого скорость входящего потока примерно одинакова во всем сечении рабочего проема и допускает непосредственные измерения с помощью термоанемометра в плоскости рабочего проема.

В боксах II класса, в отличие от боксов I класса, изоляция оператора от продукта, а также продукта от окружающей среды осуществляется с помощью так называемой воздушной завесы. Эта завеса возникает в результате слияния потоков входящего и нисходящего воздуха

в области рабочего проема. Входящий поток возникает как компенсация той части воздуха, которая выбрасывается из бокса в атмосферу, предварительно пройдя через выпускной НЕРА фильтр (см. рис. 2б). Оставшаяся часть воздуха продолжает циркулировать в боксе. В результате наличия в рабочей камере бокса нисходящего потока, а также в результате конструктивных особенностей, разрежение возникает только вдоль узких зон (перфорации), расположенных в плоскости столешниц. По этой причине распределение скорости потока по высоте рабочего проема имеет крайне неоднородный характер: наибольшая скорость потока наблюдается у нижней границы рабочего проема, наименьшая — у верхней. Прямое измерение скорости потока с помощью термоанемометра, в данном случае, может привести к неправильным результатам, т.к. результат измерения сильно зависит от места расположения чувствительного элемента анемометра при измерении. Для того что бы избежать подобной неопределенности, средняя скорость входящего потока в БМБ II класса определяется как отношение объемного расхода входящего воздуха к полной площади рабочего проема, а оценка средней скорости входящего потока сводится к оценке объемного расхода воздуха. Вследствие того, что входящий и выходящий потоки равны, оценка расхода входящего воздуха может определяться путем оценки расхода выходящего воздуха.

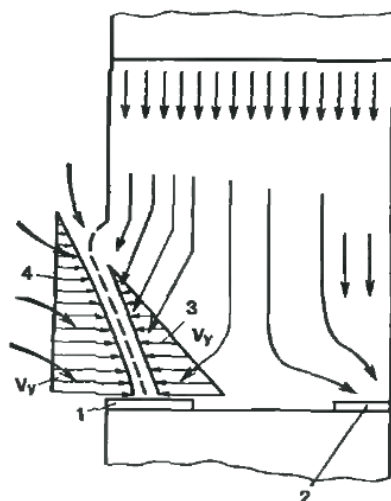


Рис. 3 - Распределение потоков воздуха внутри БМБ II класса. 1, 2 – передняя и задняя перфорации соответственно, 3, 4 – эюры скоростей потоков воздуха с внутренней и наружной стороны рабочего проема (рисунок взят из книги «Чистые помещения. Проблемы, теория, практика.» под ред. А.Е.Федотова).

Помимо обеспечения защиты оператора и окружающей среды, БМБ II класса также обеспечивает защиту рабочего материала от внешней и перекрестной контаминации. Эта защита осуществляется с помощью создания однонаправленного нисходящего потока чистого воздуха, прошедшего через приточный НЕРА фильтр. Требования к скорости нисходящего потока СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08 не предъявляют, в то время как её величина является важным фактором, влияющим на эффективность работы бокса.

ГОСТ Р ЕН 12469-2010 в свою очередь строго регламентирует не только процедуру проверки скорости входящего потока в БМБ I и II классов, но также процедуру проверки скорости и однородности нисходящего потока воздуха в камере бокса, методику исследования целостности НЕРА фильтра и процесс визуализации потоков, создаваемых при работе бокса. Эти проверки формируют необходимый минимум испытаний, пройдя который бокс микробио-

логической безопасности может считаться безопасным для работы.

Характерной особенностью рекомендаций СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08, касающейся применения БМБ, является разделение всех БМБ II класса на типы А и В. Даная классификация боксов производится согласно американскому стандарту NSF/ANSI 49-2009 и появилась в российских документах из рекомендаций ВОЗ. Новый российский стандарт ГОСТ Р ЕН 12469-2010 не производит деления боксов микробиологической безопасности на типы.

В основе разделения боксов на типы А и В лежит их разделение по доле воздуха, рециркулируемого обратно в камеру бокса и помещение установки. В большинстве БМБ II класса только часть воздуха из камеры бокса удаляется через вытяжной НЕРА фильтр. Некоторая часть воздуха, в зависимости от конструкции бокса, продолжает рециркулировать в боксе, проходя через приточный НЕРА фильтр, и подаваясь в камеру бокса. Так, например, в боксах II класса типа А2 процент рециркуляции составляет 70%, в то время как в боксах II класса типа В1 – 30%.

В БМБ II класса типа В2 рециркуляция воздуха в камеру или помещение отсутствует, т.е. 100% воздуха из рабочей камеры бокса, пройдя через НЕРА фильтр, удаляется в атмосферу через вытяжной воздухопровод. Такая организация потоков более безопасна в плане работы с ПБА высокой группы патогенности, а также позволяет вести работу в боксе с небольшими дозами летучих газообразных веществ, которые не задерживаются НЕРА фильтрами. К недостаткам использования БМБ II класса типа В2 можно отнести необходимость организации постоянного притока воздуха в помещение установки бокса для компенсации значительного количества удаляемого воздуха.

Отдельно следует остановиться на проверке целостности НЕРА фильтров и герметичности их уплотнений. НЕРА фильтры играют ключевую роль во всех БМБ. От их качества, а также от качества их установки зависит не только чистота воздуха в камере бокса, т.е. защита продукта от внешней контаминации, но и защита окружающей среды от аэрозолей ПБА. Проверка целостности НЕРА фильтров является важным и ответственным моментом при обеспечении биологической безопасности всего учреждения. Следует отметить, что согласно ГОСТ Р ЕН 12469-2010 все типы боксов микробиологической безопасности должны оснащаться НЕРА фильтрами класса не ниже Н14 по ГОСТ Р ЕН 1822-1. При этом в СП 1.3.1285-03 и СП 1.3.2322-08, регламентирующих использование БМБ в лабораториях, речь идет только о фильтрах тонкой очистки (ФТО), которые, согласно ГОСТ Р 51251-99 «Фильтры очистки воздуха. Классификация. Маркировка.», имеют существенно меньшую эффективность фильтрации по сравнению с НЕРА фильтрами, выделенными в отдельный класс.

Процедура исследования целостности с использованием микробиологических аэрозолей для таких фильтров нецелесообразна по причине того, что средний диаметр частиц микробиологического аэрозоля существенно превышает размер частиц, на которых НЕРА и ULPA фильтры имеют наименьшую эффективность. Для оценки целостности НЕРА фильтров и качества их уплотнений применяются методы с использованием синтетических полидисперсных аэрозолей, например диэтилгексил себацинат (DEHS), диоктилфталат (DOP) или полиальфаолифин (РАО), и дискретных счетчиков частиц либо специальных фотометров аэрозолей. Методики таких проверок изложены во многих мировых стандартах, например в ГОСТ Р ИСО 14644-3-2007 «Чистые помещения и связанные с ними контролируемые среды. Часть 3. Методы испытаний», Приложение В.6. Недостатками этих методов являются относительная сложность предварительных расчетов и дороговизна оборудования, необходимого для проведения проверок.

Важную роль при проверке эксплуатационных характеристик играет т.н. визуализация потоков или дымовой тест. Дымовые тесты позволяют визуально оценить характер движения

потоков воздуха, сильно подверженных внешнему влиянию, в боксе и вблизи него. К примеру, использование нагревательного оборудования внутри бокса может привести к дестабилизации однородного нисходящего потока, тем самым увеличив вероятность перекрестной контаминации. Такие нарушения потока могут быть исследованы только с помощью дымовых тестов.

Основным инструментом, с помощью которого осуществляется проверка и настройка потоков воздуха в боксах микробиологической безопасности, является термоанемометр. Разрешающая способность такого анемометра составляет 0,01 м/с, чего вполне достаточно для проверок эксплуатационных характеристик боксов. Диапазон измерения термоанемометров – от 0 до 20 м/с, а относительная погрешность не превышает 5%. Использование крыльчатых анемометров, а так же трубок Пито для измерения скоростей потоков воздуха в БМБ не допускается в виду их недостаточной точности и разрешающей способности при работе с малыми скоростями потоков.

Использование того или иного типа оборудования предполагает применение своей уникальной методики, каждая из которых имеет свои плюсы и минусы.

Таким образом, БМБ являются первой ступенью в обеспечении инженерного контроля распространения микроорганизмов различных групп патогенности. И при правильной эксплуатации способны эффективно обеспечивать не только защиту окружающей среды, но и защиту оператора от продуктов, с которыми производится работа. Правильная эксплуатация, помимо всего прочего, подразумевает проведение периодических проверок эксплуатационных характеристик боксов. К сожалению, действующие нормативные документы, регламентирующие эксплуатацию боксов, устарели и не содержат достаточной информации об этих проверках. В связи с этим назрела необходимость разработать дополнительные документы, в которых будут четко сформулированы состав и методики проверок боксов микробиологической безопасности.

Библиографический список

1. Национальный Стандарт Российской Федерации ГОСТ Р ЕН 12469-2010 «Биотехнология. Технические требования к боксам микробиологической безопасности»// Стандартинформ 2010, 48с.
2. Санитарно-эпидемиологические правила. «Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности)»// СП 1.3.1285-03. М.: Госсанэпиднадзор России; 2003, 82с.
3. Санитарно-эпидемиологические правила. «Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней»// СП 1.3.2322-08. М.: Роспотребнадзор; 2008, 76с.
4. Laboratory Biosafety Manual. 3d edition. World Health Organization. Geneva; 2004. 186 p.
5. Тюрин Е.А., Иванов С.А., Маринин Л.И., Дятлов И.А., Ляпин М.Н. Боксирующие устройства, используемые при проведении работ с биологическими агентами I–II групп патогенности//Проблемы особо опасных инфекций. Выпуск 4 (106). С. 23.
6. Biosafety Cabinetry: Design, Constructions, Performance, and Field Certification. NSF/ANSI 49 – 2009. NSF International Standard/ American National Standard. 2009. 148 p.
7. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В, редакторы. Биологическая безопасность. Термины и определения. Саратов: «Приволжское издательство»; 2006. 112 с.

MICROBIOLOGICAL SAFETY CABINETS. OPERATION AND MAINTENANCE BASICS.

Enenko A.

Key words: *bacteriophages, biological safety, microbiological safety cabinets, fume hoods, laminar flow hoods, LAMSYSTEMS, application of microbiological safety cabinets.*

The present article is concerned with the terminology and identification of microbiological safety cabinets, regulatory documents which describe the requirements for microbiological safety cabinets, operation and maintenance regulations of microbiological safety cabinets.

УДК 577.27

ТЕХНОЛОГИЯ ФАГОВОГО ДИСПЛЕЯ И ЕЕ ПРИЛОЖЕНИЯ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ПРОФИЛАКТИКИ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

Ильичев А.А., доктор биологических наук, профессор, ilyichev@vector.nsc.ru

Карпенко Л.И., доктор биологических наук, доцент, karpenko@vector.nsc.ru

Щербакова Н.С., научный сотрудник, тел. 8(383) 363-48-13, nadia_nsk@ngs.ru

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Техника фагового дисплея дает возможность проводить скрининг гигантских репертуаров биологических молекул при помощи конструирования библиотек, которые благодаря формату дисплея, позволяют применять чрезвычайно быструю и эффективную процедуру селекции специфических лигандов. В 1985, Дж. Смит (Smith, 1985) впервые сообщил, что пептиды и полипептиды могут быть экспонированы на поверхности фаговых частиц, при встройке кодирующих последовательностей ДНК в ген поверхностного белка р3 нитчатого бактериофага fd. Аналогичная работа на белке рР8 была выполнена в ГНЦ ВБ «Вектор» (Ильичев и др., 1989). При этом, если место встройки пептида выбрано правильно, то химерная фаговая частица остается инфекционной и может быть размножена в подходящем бактериальном штамме. Кроме того было показано, что фаг, несущий определенный пептид, может быть выделен из большого количества фагов дикого типа при помощи афинной селекции (Parmley & Smith, 1988). Чередование циклов селекции и размножения приводит к образованию фаговой смеси, содержащей большое количество фаговых частиц, экспонирующих тот же самый пептид.

Применение этого принципа привело к конструированию больших коллекций химерных фагов, в которых каждый фаг экспонировал отличный от других пептид, т.е. пептидных фаговых библиотек (Scott & Smith, 1990; Felici et al., 1991). В принципе такие пептидные репертуары могут служить источником лигандов практически для любых рецепторов. После изоляции фагов, несущих нужный лиганд, аминокислотная последовательность отобранных пептидов определяется секвенированием химерных капсидных генов и сравнение аминокислотного состава отобранных пептидов позволяет идентификацию консенсусной последовательности, т.е. консервативных аминокислотных остатков, необходимых для связывания данного рецептора.

В докладе будут рассмотрены предложения технологии фагового дисплея для диагностики и лечения инфекционных и соматических заболеваний человека. Будут доложены результаты работы ФГУН ГНЦ ВБ «Вектор» в данном направлении.