

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Ротанов С.В.^{1,2}, Акиншина Ю.А.¹, Гашенко Т.Ю.¹

ТЕХНОЛОГИЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ КАРБАПЕНЕМАЗ У ПАТОГЕНОВ ЧЕЛОВЕКА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

¹АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, г. о.Серпухов, п. Оболensk, Россия

Представлены результаты разработки и апробации с клиническими образцами нового отечественного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры». Описаны состав и структура иммунохроматографических тест-полосок, правила их использования. Показаны высокие характеристики клинической чувствительности и специфичности (по 100%) при стабильной воспроизводимости результатов тестирования; аналитическая чувствительность тест-полосок (предел обнаружения) по отношению к определяемым ферментам: к KPC - 600 пг/мл; к OXA - 300 пг/мл; к VIM - 300 пг/мл; к IMP - 200 пг/мл, к NDM - 150 пг/мл. В серии испытаний оценён ряд потенциально интерферирующих веществ и перекрёстно реагирующих культур микроорганизмов, содержащихся в клинических пробах; не установлено их влияния на результаты ИХА исследования. Новый набор может быть рекомендован для широкого применения при оказании медицинской помощи населению и использования с целью эпидемиологического мониторинга резистентных карбапенемаза-продуцирующих штаммов микроорганизмов в популяции.

Ключевые слова: иммунохроматография; клиническая микробиология; карбапенемазы; набор реагентов

Для цитирования: Ротанов С.В., Акиншина Ю.А. Гашенко Т.Ю. Технология определения карбапенемаз у патогенов человека иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (10): 520-529.

DOI: <https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-69-10-520-529>

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, руководитель научно-производственного отдела ИХТС АО «ЭКОлаб»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в соответствии с научным производственным планом предприятия при полном финансировании АО «ЭКОлаб».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.08.2024

Принята к печати 23.08.2024

Опубликовано 00.10.2024

Rotanov S.V.^{1,2}, Akinshina Yu.A.¹, Gashenko T.Yu.¹

TECHNOLOGY FOR DETERMINING CARBAPENEMASES IN HUMAN PATHOGENS BY IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHOD

¹JSC «EKOLab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²Federal budgetary institution of Science «State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology of Rospotrebnadzor (FSBI «SSC PMB» of Rospotrebnadzor), 142279, Serpukhov, Obolensk, Russia

There are presented the results of the development and testing with clinical samples of a new domestic kit of reagents «ICA-CARBA-5». Immunochromatographic test system for the qualitative determination carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM in a bacterial colony from culture. The composite composition and structure of immunochromatographic test strips, as well as the rules for their use, are described. High characteristics of clinical sensitivity and specificity (100% each) with stable reproducibility of test results were shown; analytical sensitivity of test strips (detection limit) in relation to the enzymes being determined: to KPC - 600 pg/ml; to OXA - 300 pg/ml; to VIM - 300 pg/ml; to IMP - 200 pg/ml and to NDM - 150 pg/ml. A series of tests assessed a number of potentially interfering substances and cross-reacting cultures of microorganisms contained in clinical samples on the results of ICA testing. The new kit can be recommended for widespread use in providing medical care to the population and for use for epidemiological monitoring of carbapenemase-resistant strains in the population.

Key words: immunochromatography; clinical microbiology; carbapenemases; kit of reagents

For citation: Rotanov S.V., Akinshina Yu.A., Gashenko T.Yu. Technology for determining carbapenemases in human pathogens using the immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (10): 520-529. (in Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.15620/0869-2084-2024-69-10-520-529>

For correspondence: Akinshina Yulia Aleksandrovna, specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOLab»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Information about authors:

Rotanov S. V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>;

Akinshina Yu. A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>;

Gashenko T.Yu., <https://orcid.org/0000-0001-6768-2251>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 17.08.2024

Accepted 23.08.2024

Published 00.10.2024

Введение. Одной из наиболее эффективных групп современных антимикробных препаратов (АМП) являются карбапенемы: имипенем, меропенем, эртапенем, дорипенем и др. Карбапенемы назначают больным тяжелыми нозокомиальными инфекциями и инфекциями, вызванными смешанной микрофлорой, поскольку широкий спектр активности этих АМП включает грамположительные, грамотрицательные и анаэробные микроорганизмы; указанные АМП характеризуется низкой цитотоксичностью и хорошими фармакокинетическими параметрами (распределением в организме, обеспечением высоких терапевтических концентраций в его тканях и жидкостях, проникновением через гематоэнцефалический барьер в спинномозговую жидкость). Карбапенемы слабо разрушаются в тканях организма, они выводятся с мочой преимущественно в неизменённом виде [1-3].

Карбапенемы относят к β -лактамам, поскольку структура молекулы этих АМП включает гетероциклическое кольцо, состоящее из трёх атомов углерода и одного атома азота (β -лактамамное кольцо). Выраженное бактерицидное действие карбапенемов обусловлено нарушением под их воздействием механизмов синтеза клеточной стенки бактерий. В сравнении с пенициллинами, цефалоспоридами, монобактамами, карбапенемы выгодно отличаются большей устойчивостью к разрушающему (гидролизующему) действию со стороны природных бактериальных ферментов - β -лактамаз, что определяет показания и порядок их назначения пациентам, при выявлении у них устойчивой микрофлоры [1-2].

По структуре первичной аминокислотной последовательности β -лактамазы классифицируют (по R. P. Ambler, 1980) на четыре молекулярных класса – А, В, С, D. Ферменты А, С, D классов относятся к гидролазам серинового типа (поскольку в состав их молекул входит аминокислота серин); активные центры ферментов класса В включают один или два атома цинка, что послужило основанием к их номинации металло- β -лактамазами (МБЛ) [3, 5]. Успешное применение карбапенемов с течением времени стало ограничиваться тем, что в результате мутаций и межклеточного горизонтального обмена генетическим материалом (в плазидах и транспозонах) бактерии стали проявлять способность уклоняться от воздействия этих АМП. Начиная с 90-х годов XX века в научных публикациях появились сообщения о карбапенемазустойчивых штаммах патогенов человека; и описан механизм уклонения их от действия новых разработанных АМП путём выработки более совершенных гидролаз – карбапенемаз, способных расщеплять не только ранее разработанные типы β -лактамных АМП, но и используемые в медицине карбапенемы.

В настоящее время известно большое разнообразие вариантов карбапенемаз; по своей молекулярной структуре их относят к трём из четырёх известных классов β -лактамаз:

в классе А сериновых карбапенемаз описаны КРС,

GES-5, IMI, NMCA, SME;

в классе В металло- β -лактамаз - VIM, NDM, IMP, SIM, GIM, SPM;

в классе D сериновых карбапенемазы представлены ОХА (-48, -58, -23 и др.) [6-9].

Перечисленные буквенные обозначения карбапенемаз чаще всего производны от видового наименования бактерий, у которых они первоначально выявлены или географического региона обнаружения, цифровые индексы уточняют особенности их строения или порядковый номер опубликования. Мониторинг лабораторного определения и идентификации карбапенемаз позволяет оценивать их распространение в популяции разных регионов мира и циркуляцию в отдельных учреждениях здравоохранения. В большинстве стран мира у патогенных для человека резистентных энтеробактерий наибольшее распространение к настоящему времени получили сериновые карбапенемазы молекулярных типов КРС (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) и ОХА (the oxacillinase-type beta-lactamase – оксациллиназа), металло- β -лактамазы типов NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase - Нью Дели металло- β -лактамаза), VIM (Verona Integron-encoded Metallo-beta-lactamase - Верона интегрон-кодированная металло- β -лактамаза, или Verona Imipenemase - Верона имипенемаза), и в несколько меньшей степени IMP (imipenemase – имипенемаза) [7-10].

Признание антибиотикорезистентности в качестве реальной современной глобальной угрозы для всей системы здравоохранения (при оказании медицинской помощи больным инфекционного и хирургического профиля) консолидировало усилия ВОЗ, Европейского комитета по определению чувствительности микроорганизмов к АМП (EUCAST) и Национальных центров по контролю заболеваемости (CDC) по разработке комплекса практических мероприятий по изучению и мониторингу устойчивых к АМП патогенов человека [7, 11, 12].

Для выявления карбапенемаз разработаны и внедрены в рутинную практику лабораторий клинической микробиологии различные лабораторные технологии: прежде всего, фенотипические и аналитические тесты выявления карбапенемаз грамотрицательных бактерий, и молекулярно-генетические исследования генов.

Среди фенотипических тестов более распространена технология определения у энтеробактерий минимальной подавляющей концентрации (МПК) диско-диффузионным методом, методом серийных разведений или с помощью автоматизированных станций в отношении меропенема, имипенема, эртапенема; устойчивыми согласно рекомендациям Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) считаются штаммы с МИК более 2 мг/л [12], их следует дополнительно тестировать на наличие и установление типа карбапенемаз.

Для выявления металло- β -лактамаз (МБЛ) используют хелатинирующие агенты (такие как этилендиаминотетраацетат – ЭДТА, дипиколиновая или меркаптопропионовая кислоты), способные связывать ионы

цинка в составе активного центра фермента и, таким образом, подавлять его гидролизующую активность в отношении АМП. На практике эта методика реализуется в виде культивирования исследуемой суспензионной культуры на плотной питательной среде с использованием двойных дисков с ЭДТА. Увеличение зоны подавления роста культуры на агаре между дисками с АМП и с ЭДТА является свидетельством синтеза изучаемой культурой МБЛ. Модификации этого метода: использование комбинированных дисков, содержащих одновременно ЭДТА и АМП или двойного Е-теста, одна половина которого помимо градиента концентрации АМП содержит постоянную концентрацию ЭДТА. При сравнении величины зон подавления роста вокруг дисков или полосок Е-теста только с АМП и АМП+ЭДТА в случае синтеза металло-β-лактамаз наблюдают более широкие зоны подавления роста культуры (не менее дополнительных 7 мм при методе комбинированных дисков или 8-кратного увеличения значения МИК с использованием Е-теста) [10, 13].

Для выявления сериновых карбапенемаз класса А в качестве ингибитора активности служит аминоксидная кислота (АФБК); при этом техника постановки лабораторного исследования с двойными или комбинированными дисками аналогична вышеописанной для МБЛ. Кроме описанного метода рекомендуется применение модифицированного теста Ходжа, принцип которого заключается в посеве на чашке Петри с агаром Мюллера-Хинтона контрольного штамма *E. coli* ATCC 25922, помещении в центральную часть диска с карбапенемным АМП и штриховом посеве от диска к периферии изучаемой культуры. В случае продукции карбапенемаз изучаемым изолятом происходит гидролиз карбапенемного АМП и появляется рост контрольного штамма *E. coli*.

Интерпретация фенотипических методов определения карбапенемаз может быть затруднена в случаях одновременного синтеза ферментов разных молекулярных классов. Фенотипические тесты не позволяют установить тип выявленной карбапенемазы [13]. Для определения ферментов ОХА-типа фенотипические тесты практически не используются.

Точными методами определения карбапенемаз являются молекулярно-генетические исследования. Разработаны методики мультиплексной полимеразной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) с последующей идентификацией продуктов амплификации и метод гибридационного анализа на ДНК-чипах [9, 10, 13].

Одной из наиболее быстрых по выполнению и обладающей высокой точностью результатов является иммунохроматографическая (ИХ) технология определения карбапенемаз, которую ряд исследователей относят не к фенотипическим, а аналитическим тестам. Диагностическим преимуществом ИХ является то обстоятельство, что наряду с высокой чувствительностью, специфичностью и скоростью получения результата, ИХ позволяет определить тип выявленного фермента. Разработаны варианты практического воплощения ИХ-теста с одновременным определением нескольких (2-5) типов известных карбапенемаз [9, 13-15]. Ограничением в использовании этой технологии является невозможность применения для поиска новых, ранее не описанных типов карбапенемаз.

Из публикаций в материалах научных и коммерческих изданий нам стали известны зарубежные и отечественные аналоги ИХ наборов реагентов для одновременного качественного определения в культурах *in vitro* нескольких типов наиболее распространенных карбапенемаз (КРС, ОХА, VIM, IMP, NDM): «NG-Test CARBA 5» (фирма «NG Biotech Z.A.», Франция) и «CARBA5-ИМБИАН-ИХА» (фирма ООО «ИМБИАН», Новосибирская обл., Россия) [13-15].

Существующие санкционные ограничения со стороны Европейской экономической системы и США не позволяют на регулярной основе использовать разработанные западными странами ИХ наборы реагентов в микробиологических лабораториях России для выявления и мониторинга карбапенемаза-продуцирующих штаммов микроорганизмов.

Цель исследования - разработка нового оригинального отечественного набора реагентов в формате иммунохроматографической тест-кассеты для одновременного диагностического дифференцированного определения нескольких (от 3 до 5) наиболее часто встречающихся в популяции бактериальных карбапенемаз из культуры энтеробактерий, полученных из биоматериала обследуемого больного, и расширенная клиническая оценка нового разработанного медицинского изделия.

Материал и методы. При разработке дизайна новой тестовой ИХ кассеты использован научный подход и практические наработки создания композитных ИХ мембран, содержащих целевые маркеры по отношению к нескольким определяемым анализам одновременно, что позволяет выполнять диагностическое исследование за одну лабораторную постановку [8, 16-21]; решался вопрос о возможности практического размещения и эффективного использования варианта нескольких полос детекции на одной ИХ тест-полосе [15, 18, 21].

Одной из решаемых задач при выполнении работы явились адаптация и стандартизация условий микробиологического культивирования испытуемых биологических образцов от пациента, полученных на разных видах плотных питательных сред и содержащих в испытуемой пробе примеси этих агаризованных сред, и небольшие включения наиболее часто встречающихся сопутствующих микроорганизмов.

В работе использованы разные виды биологического материала человека: венозная кровь, раневое гнойное и серозно-геморрагическое отделяемое, пунктаты из полостей и кист, соскобы с изъязвлений на коже и слизистых оболочках, моча, фекалии, другие биологические жидкости, направляемые клиникой на исследование.

В соответствии с устоявшейся технологией конструирования ИХ стрипов, размещаемых в удобные для использования в клинических лабораториях пластиковые кассеты, применена техника создания многослойного разнородного композита:

- для создания подложки из полилита брали бумагу силиконизированную 0,2-0,6 мм толщиной (фирма ООО «ПКФ Современные технологии», Россия, кат. № ИНА-100);

- для иммуносорбента, обеспечивающего качественное иммунохимическое взаимодействие антигенов и антител, использована нитроцеллюлозная мем-

брана с большой пропускной способностью и способностью удерживать нанесённые на неё тестовые линии с антителами к карбапенемазам, - толщиной 185 мкм ± 20% (фирма «MDI», Индия, Type CNPC-SS12, 15 мкм);

- стрип комплектовали мембраной для нанесения необходимых конъюгатов антител к карбапенемазам (фирма «MDI», Индия, Type PT-R1);

- включали впитывающую мембрану для нанесения образца с наибольшей толщиной 0,6-0,8 мм и плотностью 270±20 г/м², обеспечивающими фильтрацию образца от крупных включений (фирма «MDI», Индия, Type GFB-R7L);

- добавляли завершающую процесс исследования мембрану для адсорбции жидкой фазы с растворенными не вступившими в реакцию веществами - толщиной 0,2-0,5 мм, плотностью 179±5 г/м² (фирма «MDI», Индия, Type AP110).

Для нанесения и иммобилизации на иммуносорбенте пять тестовых линий готовили растворы соответствующих антител к пяти изучаемым карбапенемазам (фирма «Jiangsu East-Mab Biomedical Technology Co., Ltd.», Китай, кат. №№ DZMK012, DZMK013, C07502, HA 226-2M, DZMK017 соответственно):

- KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase);

- IMP (Imipenemase);

- NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase);

- VIM (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase);

- OXA (The oxacillinase-type beta-lactamase).

Необходимую в исследовании контрольную линию (С) на иммуносорбенте создавали раствором козьих антител к иммуноглобулинам (IgG) мыши в концентрации ≥1 мг/мл в фосфатном буфере (pH 7,4), (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 264.4).

На мембрану для конъюгатов, наносили рабочие растворы конъюгатов антител к карбапенемазам KPC, IMP, NDM, VIM, OXA (Jiangsu East-Mab Biomedical Technology Co., Ltd., Китай, кат. №№ DZMK011, DZMK021, DZMK015, C07503, 02MK022 соответственно) с наночастицами коллоидного золота (НЧ-КЗ) размером 30-80 нм, полученными из золотохлористоводородной кислоты - Gold (III) chloride hydrate (фирма «Aldrich», кат. № 254169-500MG); однородность размеров НЧ-КЗ проверяли с помощью просвечивающей электронной микроскопии и спектрофотометрии.

Процессы приготовления необходимых растворов и отмывания продуктов разработки обеспечивали деионизованной водой (установка «Simplicity System», фирмы «Millipore», США), с удельным сопротивлением 18,2 Ом·м при 25 °С. Стерилизующую фильтрацию неионизированной воды и солевых растворов обеспечивали пропусканием через стандартный набор: пред-фильтр и фильтры с калиброванной величиной пор - 0,45 и 0,22 мкм (фирмы «Millipore», США).

Разработанный композит ИХ стрипа после сборки помещали в пластиковую кассету (контейнер из пластика размером 70х20 мм, с отверстиями для внесения исследуемого образца и для аналитической зоны) и упаковывали с силикагелем в индивидуальную упаковку из фольги алюминиевой 120х70 мм (ООО «ПКФ Современные технологии», Россия).

Для обеспечения лабораторного процесса диагностического исследования в разработанный набор реа-

гентов включили необходимые комплектующие:

- флакон-капельницу с буферным раствором (БР) для приготовления исследуемой бактериальной взвеси (ООО «Меридиан», Россия), содержащую 5,0 мл 0,01 М фосфатного буфера (pH-7,4-7,6) с твин-20 2,5% (фирмы «ROTH», Германия, кат. № 9127.2) и азидом натрия 0,1% (фирмы ДИА-М, Россия, кат. № 3402);

- пипетку Пастера одноразовую неградуированную для переноса жидкостей («Нинбо Гритмед Медикал Инструментес Ко., Лтд.», Китай, РУ № ФСЗ 2012/11857);

- микропробирку одноразовую пластиковую объёмом 0,5 мл (тип Эппендорф) для подготовки исследуемого образца, РУ № ФСЗ 2012/12495);

- картонную подставку под микропробирки (АО «ЭКОлаб, Россия, кат. № 43.8).

Процесс разработки и проведение внутренних клинических испытаний по оценке диагностических показателей чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов исследования с разработанным набором реагентов обеспечен панелью клинических образцов разных биологических материалов, полученных в соответствии с договорами о сотрудничестве, из нескольких медицинских организаций: ГБУЗ «Орехово-Зуевская станция переливания крови» (лицензия ЛО-50-01-005260 от 02.04.14 г.), ООО «ИНВИТРО» (лицензия ЛО-77-01-012556 от 22.06.2016 г.), Диагностического Центра «El'Clinic» АО «ЭКОлаб» (лицензия № Л041-01162-50/00365571 от 08.04.15 г.). Всего применено 254 клинических образца, в том числе: 106 - содержавших и 148 образцов, не содержавших карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP, NDM в бактериальной колонии культуры, выращенных на различных плотных питательных средах.

Для моделирования возможной интерференции на результаты исследования приготовлены 54 образца культур микроорганизмов, продуцирующих и не продуцирующих карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP, NDM типов, и содержавшие плотную питательную среду (в концентрации до 100 мг/мл), цельную кровь (50 мкг/мл), слюну (50 мкг/мл), мочу (50 мкг/мл), АМП (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем в концентрациях до 10 мкг/мл) или цефтриаксон (в концентрации до 500 мкг/мл).

Изучение вероятной перекрёстной реактивности с сопутствующей микрофлорой выполнено с 36 клиническими образцами, продуцирующими и не продуцирующими карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP, NDM типов с добавлением в пробу *E. coli* (в концентрации 1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Klebsiella pneumoniae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Enterobacter cloacae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Pseudomonas aeruginosa* (1,0×10⁶ КОЕ/мл), *Acinetobacter baumannii* (1,0×10⁶ КОЕ/мл) или *Staphylococcus aureus* (1,0×10² КОЕ/мл).

Для обеспечения проведения внутренних доклинических испытаний в производственных условиях по разработанному ТУ 21.20.23-368-70423725-2024 в производственных условиях, выпущены 4 опытные серии разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5»: сер. 1 и 2 со сроком годности до 09.06.26 г. и сер. 3 и 4 со сроком годности до 10.06.26 г.

Необходимая в исследовании тест-система сравнения: «NG-Test CARBA 5» Экспресс-тест для определе-

ния карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» (фирма «NGBiotech», Франция), серии 190323-01, годный до 2025-11, РУ № РЗН 2022/16818 от 05.04.2022 приобретена через торговую фирму-посредник.

В качестве референсной системы для решения спорных результатов ИХ исследований использованы результаты ПЦР-РВ по выявлению генов карбапенемаз: «АмплиСенс® MDR MBL-FL». Набор реагентов для выявления генов металло-β-лактамаз групп VIM, IMP и NDM методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией», РУ № РЗН 2013/729 от 13.03.2019, серия 15.12.23 годный до 2024-09-15 и «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL». Набор реагентов для выявления генов карбапенемаз групп KPC и OXA-48 в биологическом материале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией», РУ № РЗН 2013/879 от 13.03.2019, серия 17.12.23 годный до 2024-09-17.

Все лабораторные исследования выполнены с точным соблюдением указаний, содержащихся в прилагаемых к наборам и приборам инструкциям по применению.

Результаты и обсуждение. Одновременно с началом работ по конструированию новой ИХ композитной тест-мембраны организована и проведена разработка панели биологических образцов микроорганизмов, содержащих и не содержащих изучаемые гидролизующие ферменты в охарактеризованных количественных соотношениях – создана и утверждена на АО «ЭКОлаб» стандартная панель образцов предприятия - СОП-368. Эта панель предназначена для применения на различных этапах разработки и последующего производ-

ства иммуноактивных компонентов нового набора, при выпускающем и последующем контроле качества и специфической активности производственных серий в пределах их сроков годности. Комплект СОП-368 включал:

- образец № 1 (не содержащий карбапенемаз);
- образцы № 2-№ 6 (содержащие определяемые ферменты в концентрациях порогового определения ИХ набора: образец № 2 - KPC в концентрации 600 пг/мл, образец № 3 - OXA в концентрации 300 пг/мл, образец № 4 - VIM в концентрации 300 пг/мл, образец № 5 - IMP в концентрации 200 пг/мл, образец № 6 - NDM в концентрации 150 пг/мл);
- образцы № 7-№ 11 (содержащие изучаемые карбапенемазы в избыточных концентрациях - 100 мкг/мл; № 7 - KPC, № 8 -OXA, № 9 -VIM, № 10 - IMP, № 11 - NDM, соответственно).

Опираясь на опыт зарубежных разработчиков прототипа ИХ набора для определения карбапенемаз [14] и собственные исследования и наработки [18, 21], решено использовать одну удлиненную композитную мембрану с последовательным размещением на ней пяти тестовых зон (OXA, VIM, NDM, IMP, KPC) и зоны общего контроля (С); проведенные натурные испытания подтвердили правильность выбранного решения (рис. 1). Собранные и высушенные ИХ тест-полоски монтировались в пластиковые кассеты, имеющие открытые участки (окна) для внесения исследуемого образца (маркировка литерой S - Sample) и для учёта результатов исследования (маркировка литерами O, V, N, I, K - начальные буквы наименований определяемых ферментов и С - Control). Собранная пластиковая тест-кассета является неразборной, тестовые и контрольные линии на мембране визуально не определяются.

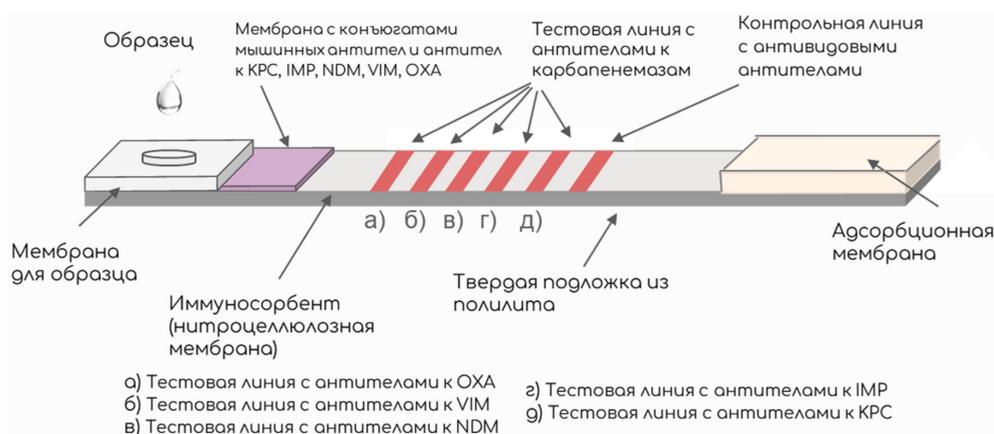


Рис. 1. Схема размещения мембран и нанесения иммунных реагентов на композитную иммунологическую тест-полоску в составе набора реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

Серии выполненных лабораторных исследований позволили оттитровать концентрации рабочих растворов для производства ИХ тест-полоски набора:

для нанесения поперечных линий на иммуносорбенте:

- раствор антител $\geq 0,5$ мг/мл к определяемым карбапенемазам (тестовые линии O, V, N, I, K соответственно) в фосфатном буфере (pH 7,4);

- козьи антитела к иммуноглобулинам IgG мыши ≥ 1 мг/мл (контрольная линия С) в фосфатном буфере (pH 7,4) (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 264.4);
- для пропитывания мембраны с конъюгатами:
- конъюгаты антител к карбапенемазам ≥ 1 мг/мл в трисовом буфере (pH 7,4);
- конъюгаты НЧ-КЗ с мышинными иммуноглобу-

линами $IgG \geq 0,5$ мг/мл в трисовом буфере (рН 7,4) (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. № 264.4).

Дополнительная серия постановок включала титрование концентраций растворов реагентов для проведения лабораторного исследования.

Изучение специфической активности всех компонентов опытно-производственных серий наборов при их хранении в условиях контролируемой повышенной температуры (условиях искусственного старения) позволило установить гарантируемый срок годности набора, который составил 25 месяцев.

Завершение лабораторных испытаний и написание нормативных технических документов (технических условий и инструкции по применению) знаменовало завершение процесса создания нового медицинского изделия «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз КРС, ОХА, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024.

Разработанные наборы «ИХА-CARBA-5» характеризовались следующими нормативными показателями аналитической чувствительности (предел обнаружения) по отношению к определяемым карбапенемазам: к КРС - от 600 пг/мл и выше; к ОХА - от 300 пг/мл и выше; к VIM - от 300 пг/мл и выше; к IMP - от 200 пг/мл и выше, к NDM - от 150 пг/мл и выше.

Принцип проведения иммунохроматографического теста. Тест представляет собой вариант классического иммунохимического взаимодействия антигенов и антител: в качестве антигенов служат специфические эпитопы выявляемых карбапенемаз, в качестве антител - меченные коллоидным золотом конъюгаты (НЧ-КЗ + моноклональные антитела). Образец тестируемой культуры микроорганизмов вносят через специальную лунку (S) кассеты на поверхность тест-полоски, где, смачивая мембрану тест-полоски, он взаимодействует со смесью меченых НЧ-КЗ моноклональными антителами к различным карбапенемазам, выбирая для образования сложного иммунного комплекса наиболее соответствующие себе. Образовавшиеся сложные иммунные комплексы продвигаются за счёт капиллярных сил в толще нитроцеллюлозной подложки и достигают поперечных линий из иммобилизованных моноклональных антител к каждому из определяемых ферментов; здесь они специфически взаимодействуют и заяко-

реваются в продвижении.

Если в исследуемой пробе содержались микроорганизмы, продуцирующие карбапенемазы, то по окончании исследования они концентрируются в области соответствующих тест-линий иммуносорбента, образуя за счёт частиц золота окрашенные в розовый цвет полосы. При отсутствии карбапенемаз окрашивается только контрольная линия, свидетельствующая о правильном выполнении всех этапов исследования и валидности использованной тест-системы.

Порядок подготовительных процедур и проведения исследования.

Подготовка культур к исследованию. Для исследования применяют разнообразные анализы, полученные от человека с соблюдением стерильных условий: фекалии, раневое отделяемое, биологические жидкости: амниотическая жидкость, гной, кровь лимфа, мокрота, желчь, молозиво, моча, секрет предстательной железы, слизь со слизистых оболочек, синовиальная жидкость, сперма, спинномозговая жидкость, тканевая жидкость, плевральная жидкость, носовая слизь, пот, трансудат, ушная сера или экссудат. Каждый образец высевают на плотные питательные среды и культивируют с целью получения изолированных колоний. Разработаны рекомендации по использованию определённых типов питательных сред для последующего определения карбапенемаз: ХРОМагар™МСуперКАРБАгм, агар Мюллер-Хинтона, УРИселект™4, Триптиказо-соевый агар, 5% Колумбийский агар лошадиной крови, Хромогенный агар Chromid ESBL, Хромогенный агар Chromid CARBA smart, агар Дригальского, Лурия бульон и Лурия агар.

Процедуры отбора биологических проб, посева и культивирования обеспечиваются соблюдением условий стерильности в соответствии со стандартными процедурами. По завершении периода культивирования через 18-24 часа при 37 °С на поверхности агара выявляют выросшие изолированные колонии микроорганизмов.

Подготовка образцов. Из флаконов в микропробирку (типа Эппендорф) вносят 5 капель (~200 мкл) экстракционного буферного раствора (входит в состав набора реагентов). С помощью бактериологической петли выбранную колонию культуры снимают с плотной питательной среды и переносят в одноразовую микропробирку с буфером; материал суспендируют с целью гомогенизации (рис. 2).

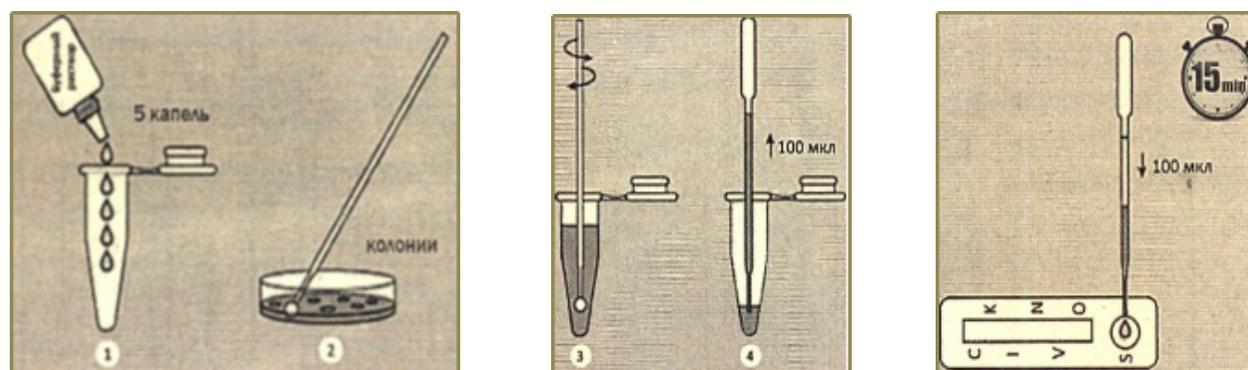


Рис. 2. Порядок подготовки образца и проведения исследования с набором реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

Проведение исследования:

Перед исследованием все компоненты набора и исследуемые образцы доводят до комнатной температуры (18-25 °С), упаковку с тест-кассетой сохраняют при указанной температуре до вскрытия! Все реагенты готовы к применению.

Непосредственно перед проведением анализа тест-кассету извлекают из индивидуальной упаковки, кладут на чистую сухую горизонтальную поверхность лицевой стороной вверх и маркируют.

С помощью пипетки Пастера (в положении вертикально) набирают и переносят 3 капли (~100 мкл) подготовленной ранее исследуемой пробы в лунку тест-кассеты, отмеченную литерой «S»).

Начинают отсчёт времени по секундомеру. Тест-кассету не трогают и не перемещают.

Результат исследования учитывают через 15-20 минут (не позднее 20 минут!).

Интерпретация результатов. Степень окраски розовых линий на ИХ тест-полоске может варьировать в зависимости от концентрации карбапенемаз в исследуемом образце (рис. 3).

Положительный результат оценивают по проявлению двух или более чётких окрашенных линий: одной - в контрольной зоне (С) и другой(других) - в тестовой зоне (I, V, K, N, O).

Отрицательный результат: в контрольной зоне (С) образуется окрашенная линия, в тестовых зонах (I, V, K, N, O) окрашивания не происходит.

Недействительный результат регистрируют в случае, когда в контрольной зоне (С) не появляется окрашенной линии независимо от состояния линий в тестовой зоне (I, V, K, N, O).

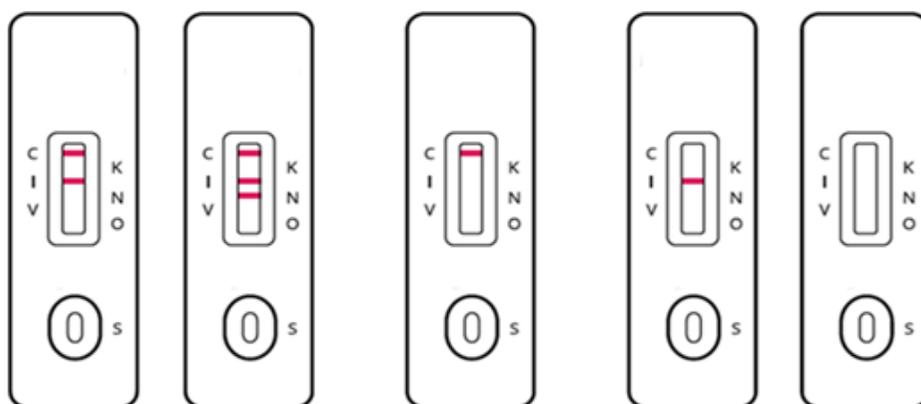


Рис. 3. Интерпретация результатов исследования с набором реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

При получении недействительного результата исследование следует повторить с использованием тест-кассеты из другой серии набора реагентов «ИХА-CARBA-5».

Результаты внутренних доклинических испытаний разработанного набора. В рамках внутренних доклинических испытаний разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» проведено исследование колоний, выросших на плотных питательных средах из 254 клинических образцов от пациентов ЛПУ. Исследования с тремя опытно-производственными сериями разработанного набора реагентов и набором сравнения полностью совпадали по типу выявляемых карбапенемаз: колонии микроорганизмов из 106 образцов содержали карбапенемазы (KPC - в 26 образцах, OXA - в 18, VIM - в 24, IMP - в 13, NDM - в 25 образцах колоний микроорганизмов) и из 148 клинических образцов - их не содержали (см. таблицу). Верифицирующее исследование в ПЦР двумя наборами реагентов подтвердило наличие карбапенемаз как по общему количеству проб, так и по типу кодирующих их экспрессию генов. Проведёнными исследованиями, установлена высокая клиническая чувствительность и специфичность разрабо-

танного нового набора реагентов «ИХА-CARBA-5» (по 100%), стабильность времени получения результатов и отсутствие выраженной межсерийной вариабельности.

Полученные результаты сопоставлены с опубликованными данными, полученными с использованием ИХ наборов «NG-Test CARBA 5» в лаборатории при Сеульском госпитале (Республика Корея). В ходе проведённых клинических исследований выявлены 78 штаммов продуцирующих и 23 штамма, не продуцирующих карбапенемазы (штаммы дополнительно охарактеризованы в ПЦР и в сиквенсе). Авторы аттестуют показатели клинической чувствительности в ИХА в 100% по отношению к KPC, NDM, OXA-48-like, IMP, в то время как при определении VIM - 92,31% (95% CI 63,97-99,81%); при клинической специфичности результатов - 100%. Затраты времени на проведение ИХ исследования давали преимущество ИХ по сравнению с ПЦР (с набором «Xpert Carba-R assay», США), в среднем 24 минуты против 1 часа и 11 минут соответственно [16].

Другая группа внутренних клинико-лабораторных испытаний набора реагентов «ИХА-CARBA-5» выделена для выявления и оценки выраженности возможной вариации результатов ИХ определения карбапене-

маз в присутствии в реакционной среде потенциально интерферирующих веществ: компонентов питательной среды (в концентрации до 100 мг/мл), цельной крови (50 мкг/мл), мочи (50 мкг/мл), слюны (50 мкг/мл), АМП (меропенема, имипенема, дорипенема, эртапенема в концентрациях до 10 мкг/мл и цефтриаксона – до 500 мкг/мл). С этой целью приготовлены образцы, моделирующие потенциальное интерферирующее влияние перечисленных 9 факторов с каждым типом карбапенемаз и без них (9 факторов х 6 типов интерферентов = 54 образца); тестирование выполнено с каждой опытно-производственной серией набора реагентов (4 серии); всего проведено 216 исследований. Не зарегистрировано вариации выраженности позитивного результата в ИХ-исследовании в зависимости от присутствия в реакционной среде изученных потенциальных интерферентов. Не наблюдалось появления ложных положительных результатов в ИХ при отсутствии в среде карбапенемаз, но в присутствии интерферентов.

Третья группа внутренних доклинических испытаний посвящена изучению возможной перекрёстной реактивности на результаты определения ИХ методом наличия и установления типов карбапенемаз в условиях присутствия в исследуемой пробе культур наиболее часто циркулирующих в популяции микроорганизмов (смешанная культура). Для моделирования указанных ситуаций перед исследованием 6 подготовленных проб (5 - содержащих каждый тип карбапенемаз и 1 - их не содержащей) в микропробирки вносили каждую из 6 выбранных культур микроорганизмов: *E. coli* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм O₁₅₇:H₇), *Klebsiella pneumoniae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* ST 3181K-54), *Enterobacter cloacae* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм NCTC 10006), *Pseudomonas aeruginosa* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм ST235), *Acinetobacter baumannii* (1,0×10⁶ КОЕ/мл; штамм *Acinetobacter baumannii* 5720), *Staphylococcus aureus* (1,0×10² КОЕ/мл; штамм CC30); всего изучено 36 проб с 4 сериями разработанных наборов. Независимым лаборантом при учёте результатов 144 исследований с разработанным набором «ИХА-CARBA-5» не определено воздействия (перекрёстной реактивности) испытанных штаммов микроорганизмов в указанной концентрации на результаты ИХ тестов.

Проведенными внутренними доклиническими испытаниями в условиях АО «ЭКОлаб» показана высокая специфичность разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» для иммунохроматографического определения в колониях микроорганизмов ферментов устойчивости карбапенемаз (КРС, OXA, VIM, IMP и NDM).

В процессе испытаний подтверждено, что применение ИХ технологии экономно по времени, не требует дополнительного дорогостоящего оборудования, доступно для применения медицинским персоналом клинической лаборатории.

Систематическое широкое использование ИХ наборов для качественного определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP, NDM при оказании медицинской помощи населению направлено на повышение качества оказания этой услуги, экономное расходование средств на антибактериальные препараты и позволяет осуществлять эпидемиологический мониторинг распространения карбапенемаза-резистентных штаммов в популяции.

Заключение. Сотрудниками АО «ЭКОлаб» при решении задач по импортозамещению и в целях обеспечения учреждений здравоохранения России доступными диагностическими медицинскими изделиями для оказания медицинской помощи населению разработан новый отечественный набор реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024». Проведенными внутренними доклиническими испытаниями с новым ИХ набором реагентов «ИХА-CARBA-5» при исследовании 254 клинических образцов (в том числе 106, содержащих энтеробактерии, синтезирующие карбапенемазы КРС, OXA, VIM, IMP, NDM, и 148 образцов, их не содержащих), установлена высокая клиническая специфичность и чувствительность результатов исследования (по 100%) и отсутствие внутри- и межсерийной варибельности результатов тестирования. Установленные показатели сопоставимы с зарубежным аналогом. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) теста «ИХА-CARBA-5» установлена в отношении определяемых аналитов: КРС - 600 пг/мл; OXA - 300

Результаты клинических испытаний по определению карбапенемаз в реакции иммунохроматографии с разработанными наборами «ИХА-CARBA-5» (серии 1 и 2, годные 09.02.26 и серии 3 и 4, годные до 10.02.26) и тест-системой сравнения «NG-Test CARBA 5» (серия 190323-01, годна до 2025-11) и верифицирующего определения кодирующих генов карбапенемазных групп в ПЦР с наборами реагентов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (серия 15.12.23, годен до 2024-09-15) и «АмплиСенс® MDR КРС/OXA-48-FL» (серия 17.12.23, годен до 2024-09-17)

Аналит	n	Результаты исследований с наборами реагентов													
		«ИХА-CARBA-5»								«NG-Test CARBA 5»		«АмплиСенс® MDR MBL-FL»		«АмплиСенс® MDR КРС/OXA-48-FL»	
		сер. 01		серия 02		серия 03		серия 04		пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.
		пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.	пол.	отр.						
Образцы СОП-368	11	10	1	10	1	10	1	10	1	10	1	-	-	-	-
Колонии из клинических образцов, содержавшие карбапенемазы	106	106	0	106	0	106	0	106	0	106	0	62	0	44	0
Колонии из клинических образцов, не содержавшие карбапенемазы	148	0	148	0	148	0	148	0	148	0	148	0	00	0	0

Примечание. n - количество исследований; пол. – положительный результат; отр. – отрицательный результат.

пг/мл; VIM - 300 пг/мл; IMP - 200 пг/мл и NDM - 150 пг/мл. Изучение клинических образцов, содержащих потенциально интерферирующие вещества (плотную питательную среду, цельную кровь, мочу, слюну, АМП (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем или цефтриаксон) или потенциально перекрестно реагирующие культуры (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*), демонстрирует отсутствие влияния этих факторов на положительные результаты определения карбапенемаз или появление ложных положительных результатов. По завершении государственной регистрации в Российской Федерации в установленном законом порядке Набор реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024» может быть рекомендован для внедрения в практику здравоохранения, что позволит обеспечить своевременное и качественное оказание медицинской помощи населению и осуществлять эпидемиологический мониторинг циркуляции карбапенемазо-продуцирующих штаммов бактерий в популяции.

ЛИТЕРАТУРА (П.П. 2, 3, 5-7, 12, 16 С.М. REFERENCES)

1. Яковлев С.В., Суrowa М.П., Быков А.О. Инфекции, вызванные карбапенемо-резистентными энтеробактериями: эпидемиология, клиническое значение и возможности оптимизации антибактериальной терапии. *Антибиотики и химиотерапия*. 2020; 65: 5-6.
2. Давидович Н.В., Кукалевская Н.Н., Башилова Е.Н., Бажукова Т.А. Основные принципы эволюции антибиотикорезистентности у бактерий (обзор литературы). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(6): 387-93.
3. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(2): 84-90.
4. Полищук А.Г., Якубович Е.И., Полухина О.В., Осовских В.В., Евтушенко В.И. Карбапенемазопродуцирующие грамотрицательные бактерии в специализированном стационаре ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий» Санкт-Петербурга. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017; 19(3): 235-42.
5. Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Медицинский журнал*. 2012; 2: 10-5.
6. Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25.09.2017 г. № 2045-р. "Об утверждении Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года".
7. Попов Д.А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбапенемаз. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2019; 21(2): 125-33.
8. DIALAB medical. Каталог. Экспресс-тест для определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM (NG-Test CARBA5). Электронный ресурс. <http://diallab.ru/product/ngb-car-s23-014-iht-ng-test-carba5-dlya-opred-karba-penemaz-krc-oxa-vim-imp-i-ndm-20-kasset>.
9. Экспресс-тест для качественного иммунохроматографического определения карбапенемаз КРС, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры в биологическом материале "CARBA5-ИМБИАН-ИХА". Электронный ресурс. <https://analitika-med.ru/products/94936/RZH-2023-21446/#home> (Дата обращения 10.06.2024). (in Russian)
10. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А. О количественном определении D-димера в крови иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(2): 91-6. DOI: 10.15620/0869-2084-2022-67-2-91-96.
11. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Малышев В.В., Змеева Т.А. и др. Разработка иммунохроматографического набора реагентов для выявления ротавирусов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (11): 672-9. DOI: 10.51620/0869-2084-2021-68-11-672-679.
12. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. Об иммунохроматографическом выявлении *Helicobacter pylori* у человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (4): 123-30. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130.
13. Ротанов С.В., Марданлы С.Г., Попова Т.В., Акиншина Ю.А. О распространении *Helicobacter pylori* среди населения Павлово-Посадского района Московской области. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (2): 82-9. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-82-89.
14. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Гашенко Т.Ю. Однотипное выявление маркеров возбудителей острых кишечных вирусных инфекций у человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29 (2): 97-106. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-97-106.

REFERENCES

1. Yakovlev S.V., Suvorova M.P., Bykov A.O. Infections caused by Carbapenem-resistant Enterobacterales: Epidemiology, clinical significance, and possibilities for antibiotic therapy optimization. *Antibiotiki i khimioterapiya*. 2020; 65: 5-6. DOI: 10.37489/0235-2990-2020-65-5-6-41-69. (in Russian)
2. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. 2015; 13(1): 42-51.
3. Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A., Steinbakk M., Regmi S., Karkey A. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet*. 2016; 387(10014): 176-87.
4. Davidovich N.V., Kukalevskaya N.N., Bashilova E.N., Bazhukova T.A. Basic principles of the evolution of antibiotic resistance in bacteria (Literature review). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(6): 387-93. DOI: 10.15620/0869-2084-2020-65-6-387-393. (in Russian)
5. Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *The Journal of Infection and Chemotherapy*. 2013; 19(4): 549-59. DOI: 10.1007/s10156-013-0640-7.
6. Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010; 74(3): 417-33.
7. Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. Webcast of Q-A. Session on global report on surveillance, 2014. Web resource: http://apps.who.int/iris/bit-stream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1 (date of the application: 10.07.2024).
8. Kuz'menkov A.Yu., Trushin I.V., Avramenko A.A., Eydelshteyn M.V., Dekhnichev A.V., Kozlov R.S. AMRmap: an online platform for monitoring antibiotic resistance. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(2): 84-90. (in Russian)
9. Polishchuk A.G., Yakubovich E.I., Polukhina O.V., Osovskikh V.V., Evtushenko V.I. Carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in the Russian research center of radiology and surgical technologies. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2017; 19(3): 235-42. (in Russian)
10. Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Medit-sinskiy zhurnal*. 2012; 2: 10-5. (in Russian)
11. Order of the Government of the Russian Federation of September 25, 2017. № 2045-p. Strategy to prevent the spread of antimicrobial resistance in the Russian Federation for the period up to 2030. Web resource: <http://government.ru/docs/29477> (date of the application: 10.06.2024). (in Russian)
12. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0, 2016. Web resource: www.eucast.org.
13. Popov D.A. Comparative review of the modern methods for carbapenemases detection. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimik-*

- robnaya khimioterapiya*. 2019; 21(2): 125-33. DOI: 10.36488/cmac/2019/2/125-133. (in Russian)
14. Electronic resource DIALAB medical. Catalog. Rapid test for the determination of carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM (NG-Test CARBA5). Web resource: <http://diallab.ru/product/ngb-car-s23-014-iht-ng-test-carba5-dlya-opred-karbapenemaz-kpc-oxa-vim-imp-i-ndm-20-kasset> (date of the application 10.06.2024). (in Russian)
 15. Express test for qualitative immunochromatographic determination of carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM in a bacterial colony from a culture in biological material "CARBA5-IMBIAN-IHA" according to TU 21.20.23-051-39271034-2023. Web resource: <https://analitikamed.ru/products/94936/RZH-2023-21446/#home>. (date of the application 10.06.2024.) (in Russian)
 16. Yoon J., Kim C.H., Yoon S.Y., Lim C.S., Lee C.K. Application of a multiplex Application of a multiplex immunochromatographic assay for rapid identification of carbapenemases in a clinical microbiology laboratory: performance and turn-around-time evaluation of NG-test Carba 5. *BMC Microbiology*. 2021; 21: 260.
 17. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Malyshev V.V., Zmeeva T.A. et al. On the quantitative determination of D-dimer in blood by immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(2): 91-6. DOI: 10.15620/0869-2084-2024-67-2-91-96. (in Russian)
 18. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V. On the immunochromatographic detection of *Helicobacter pylori* in humans. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2024; 69 (4): 123-30. DOI: 10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130. (in Russian)
 19. Rotanov S.V., Mardanly S.G., Popova T.V., Akinshina Yu.A. On the spread of *Helicobacter pylori* among the population of the Pavlovo-Posad district of the Moscow region. *Epidemiologiya i infeksionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 82-9. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-82-89. (in Russian)
 20. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Gashenko T.Yu. One-stage detection of markers of causes of acute intestinal viral infection in humans. *Epidemiologiya I infeksionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 97-106. DOI: 10.51620/3034-1981-2024-29-2-97-106. (in Russian)