

КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Акиншина Ю.А.¹, Ротанов С.В.^{1,2}, Попова Т.В.³

О ЛАБОРАТОРНОМ КОНТРОЛЕ УСТОЙЧИВОСТИ ЭНТЕРОБАКТЕРИЙ ЧЕЛОВЕКА К АНТИБИОТИКАМ ГРУППЫ КАРБАПЕРЕМОВ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

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

² Федеральное бюджетное учреждение науки «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, Серпухов, Оболенск, Россия;

³ ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, Орехово-Зуево, Россия

Представлены результаты разработки АО «ЭКОлаб» 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» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024. Проведенными внутренними доклиническими испытаниями установлены высокие показатели клинической чувствительности и специфичности (по 100%), отсутствие межсерийной вариабельности результатов. Изучено потенциальное влияние на результаты ИХА исследования ряда потенциально интерферирующих веществ и перекрестно реагирующих культур микроорганизмов.

По завершении процедуры государственной регистрации нового набора в РФ в установленном порядке он может быть рекомендован для широкого использования в медицинских учреждениях при оказании медицинской помощи населению и мониторинга циркуляции карбапенемрезистентных штаммов в популяции.

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

Для цитирования: Акиншина Ю.А., Ротанов С.В., Попова Т.В. О лабораторном контроле устойчивости энтеробактерий человека к антибиотикам группы карбапенемов иммунохроматографическим методом. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2024; 29(3): 161-169.

DOI: <https://doi.org/10.51620/3034-1981-2024-29-3-161-169>

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование выполнено в рамках плана научных исследований при финансировании АО «ЭКОлаб».

Поступила	19.08.2024
Принята к печати	06.09.2024
Опубликовано	01.10.2024

Akinshina Yu.A.¹, Rotanov S.V.^{1,2}, Popova T.V.³

ON LABORATORY MONITORING OF RESISTANCE OF HUMAN ENTEROBACTERIA TO CARBAPENEM ANTIBIOTICS BY IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHOD

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

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

³State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia

The results of the development by EKOlab JSC of a new domestic kit of reagents "IChA-CARBA-5" Immunochromatographic test system for the qualitative determination of carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM in a bacterial colony from culture" according to TU 21.20.23-368-70423725-2024 are presented. Internal preclinical tests have established high rates of clinical sensitivity and specificity (100% each), and the absence of inter-lots variability of results. The potential impact on the results of immunochromatographic studies of a number of potentially interfering substances and cross-reacting cultures of microorganisms was studied.

Upon completion of the procedure for state registration of a new kit in the Russian Federation in the prescribed manner, it can be recommended for widespread use in medical institutions when providing medical care to the population and monitoring the circulation of carbapenem-resistant strains in the population.

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

For citation: Akinshina Ju.A., Rotanov S.V., Popova T.V. On laboratory monitoring of resistance of human enterobacteria to carbapenem antibiotics by immunochromatographic method. *Epidemiologiya I Infektsionnye bolezni (Epidemiology and Infectious Diseases)*. 2024; 29(3): 161-169 (in Russ).

DOI: <https://doi.org/10.51620/3034-1981-2024-29-3-161-169>

For correspondence: Yuliya A. Akinshina, Cand. Sci. (Biol.), specialist of the Innovative Development Department CJSC «EKOlab»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru.

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

Financing. *The study was carried out within the ofscientific research plan and funding from EKOlabor JSC.*

Information about authors:

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

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

Popova T.V., <https://orcid.org/0000-0003-0426-3126>;

Received 19.08.2024

Accepted 06.09.2024

Published 01.10.2024

Введение. Открытие и последующее внедрение в практическое здравоохранение природных антибиотиков позволило разработать и осуществлять этиотропный терапевтический подход в отношении значительного большинства бактериальных инфекций человека и революционно изменить тактику послеоперационного ведения пациентов при оказании хирургической помощи. Однако длительное и, подчас, не обоснованное использование антибиотиков в медицине, наряду с расширением практики их внедрения в пищевую, парфюмерную промышленность, сельское хозяйство и нерегулируемым выделением в окружающую среду биологически активных метаболитов применяемых антимикробных препаратов (АМП) выявило природную способность большинства бактерий развивать устойчивость к действию антибиотиков. Это установленное свойство существенно ограничивает возможность применения ряда лекарственных АМП в практике оказания медицинской помощи [1, 2]. В последние годы проблема антибиотикорезистентности приобрела особенно важное значение. Так, Всемирная организация здравоохранения и Национальные Центры по контролю и предотвращению заболеваний оценивают антибиотикорезистентность в качестве экологической глобальной катастрофы. Распространение устойчивых и особенно мультирезистентных патогенов приводит к росту числа нозокомиальных инфекций в стационарах и распространению возбудителей в популяции [3]. Одновременно в процессе мутаций и горизонтального обмена генетической информацией появляются новые механизмы уклонения бактерий от действия применяемых АМП. Все это снижает эффективность терапевтической помощи, приводя к инвалидизации и летальным случаям.

В процессе эволюции и обеспечения лучших условий своего существования бактериальные патогены развивали и совершенствовали свои механизмы конкуренции с другими микроорганизмами и грибами; в том числе с выделяемыми во внешнюю среду антимикробными веществами. В числе защитных механизмов бактерий от действия АМП нам известны: изменение в процессе мутаций молекулярной структуры мишени воздействия антибиотика, совершенствование механизмов активного его выведения из клетки или исключения возможности проникновения внутрь, образование метаболических шунтов или синтез клеткой ферментов (β -лактамаз), способных разрушать АМП [4-6].

Одним из ведущих механизмов, обеспечивающих в настоящее время появление резистентных штаммов микроорганизмов к действию широко применяемых групп АМП (пенициллинов, цефалоспоринов и монобактамов), является активный синтез ими в процессе жизнедеятельности гидролизующих ферментов - β -лактамаз. Негативное с терапевтических позиций действие таких

ферментов было устранено путем разработки и использования новых групп антибиотиков (защищенных пенициллинов, цефалоспоринов II-IV поколений и карбапенемов), более устойчивых к β -лактамазам. В ответ на это микроорганизмы в свою защиту через некоторое время стали вырабатывать более совершенные ферменты: β -лактамазы расширенного спектра ESBLs, карбапенемазы или металло- β -лактамазы, о чем появились публикации в научной литературе в 90-х годах XX века [3, 6].

В настоящее время известно более 1000 разных типов β -лактамаз. В соответствии с классификацией R.P. Ambler (1980) их подразделяют по своей структуре на две большие группы: сериновые (в центральную группу входит молекула сериновой аминокислоты, молекулярные классы A, C, D) и металло- β -лактамазы - МБЛ (содержат в активном центре атом цинка, молекулярный класс B). Они различаются по механизму гидролитической активности и чувствительности к ингибиторам. Карбапенемазы представлены в трех классах β -лактамаз:

- класс A, сериновые карбапенемазы (KPC, GES-5, IMI, NMCA, SME);
- класс B, металло- β -лактамазы (VIM, NDM, IMP, SIM, GIM, SPM);
- класс D, сериновые карбапенемазы (OXA-48, OXA-58, OXA-23) [7-9].

В большинстве стран мира у патогенных энтеробактерий наибольшее распространены сериновые карбапенемазы молекулярных типов OXA и KPC, а также МБЛ типа NDM, VIM и в меньшей степени IMP [8-10].

В практическом здравоохранении при назначении и выборе режимов терапии пациентов антибиотиками класса карбапенемов инфекций, вызванных потенциально полирезистентными грамотрицательными энтеробактериями, следует оценивать возможность продукции ими карбапенемаз и быстро выявлять молекулярный тип фермента.

Своевременное определение и мониторинг циркуляции устойчивых форм возбудителей направлен на сдерживание формирования устойчивости к АМП в популяции. С этой целью Правительством РФ была утверждена «Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года» [11].

Современные методы лабораторной детекции карбапенемаз можно подразделить на фенотипические (основанные на микробиологическом культивировании выделенных образцов при определении чувствительности к антибиотику диско-диффузионным методом, в том числе и Ходж-тест), аналитические (выявляющие факт наличия фермента с применением технологий Carba NP, MALDI-TOF масс-спектрометрии, спектрофотометрии, а также иммунохроматографии) и моле-

кулярно-генетические (исследование в полимеразной цепной реакции - ПЦР). Перечисленные методы различаются как по назначению и диагностической ценности, так и скорости получения результата, доступности практического выполнения и стоимости [8, 10, 12].

В сравнении с другими перечисленными аналитическими методами лабораторного определения карбапенемаз иммунохроматографический выгодно отличается от других по времени, необходимому для проведения исследования.

Из материалов научных и коммерческих публикаций известны зарубежные и отечественные наборы реагентов для одновременного качественного определения в исследуемых культурах *in vitro* сразу нескольких типов наиболее распространенных карбапенемаз (КРС, ОХА, VIM, IMP и NDM):

- «NG-Test CARBA 5» (фирма «NG Biotech Z.A.», Франция), РУ № РЗН 2023/21462; торговые представители в России ООО «ГЕМ», Москва и «Компания Диалаб», Москва) - набор для 20 диагностических исследований [8, 13];

- «CARBA5-ИМБИАН-ИХА" (фирма ООО "ИМБИАН", Новосибирская обл.) по ТУ 21.20.23-051-39271034-2023; в вариантах исполнения для 1 или 20 исследований [14].

С использованием иммунохроматографических наборов «NG-Test CARBA 5» в лаборатории при Сеульском госпитале (Республика Корея) были проведены клинические исследования 78 штаммов продуцирующих и 23 не продуцирующих карбапенемазы (штаммы охарактеризованы в предварительных исследованиях в ПЦР и сиквенсе). По результатам исследования в ИХА были установлены показатели чувствительности в 100% в отношении КРС, NDM, ОХА-48-like и IMP, в то время как при определении VIM – 92,31% (95% CI 63,97–99,81%); при специфичности результатов - 100%. Сопоставление затрат времени на проведение исследования демонстрировало преимущество ИХА (в среднем 24 мин) против ПЦР (с набором «Xpert Carba-R assay», США - 1 час и 11 минут) [15].

Цель исследования заключалась в разработке нового отечественного диагностического набора реагентов в формате иммунохроматографической тест-кассеты для одномоментного определения и дифференциации 5 наиболее часто встречающихся ферментов устойчивости к антибиотикам группы карбапенемов в суточных культурах энтеробактерий, полученных при культивировании биоматериала от больного, а также клиническая оценка разработанного медицинского изделия.

Материалы и методы. В качестве базового прототипа нового набора была применена технология иммунохроматографического качественного лабораторного определения специфических аналитов исследуемых патогенов в биологических образцах человека [16-20]. При разработке дизайна новой тест-кассеты принципиальной новацией явился более сложный по отношению к прототипу формат определения нескольких энтеробактериальных аналитов в рамках проведения одного лабораторного исследования [21].

Одной из задач для выполнения цели этой работы явилась оптимизация условий культивирования биологических образцов для исследования и оценка препаративного качества микробиологических культур,

полученных на разных плотных питательных средах. Для теста использовали бактериальные культуры, полученные из клинического материала человека: кровь, моча, фекалии, раневое гнойное и серозно-геморрагическое отделяемое, соскобы с изъязвлений на коже и слизистых оболочках, другие биологические жидкости, которые можно высеять на агаризованные среды.

При конструировании иммунохроматографических стрипов, на которых проходят иммунохимические реакции, применяли:

- подложку из полилита - бумага силиконизированная 0,2-0,6 мм толщиной (фирма ООО «ПКФ Современные технологии», Россия, кат. № ИНА-100);

- иммуносорбент - полоска нитроцеллюлозной мембраны с большой пропускной способностью толщиной 185 мкм ± 20% (фирма «MDI», Индия, Type CNPC-SS12, 15 мкм), для нанесения на нее тестовых линий с антителами к карбапенемазам;

- мембрану для нанесения конъюгатов антител к карбапенемазам (фирма «MDI», Индия, Type PT-R1);

- впитывающую мембрану для нанесения образца толщиной 0,6-0,8 мм и плотностью 270±20 г/м² (фирма «MDI», Индия, Type GFB-R7L);

- мембрану для адсорбции толщиной 0,2-0,5 мм, плотностью 179±5 г/м² (фирма «MDI», Индия, Type AP110).

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

- КРС (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *Klebsiella pneumoniae* карбапенемаза);

- IMP (imipenemase - имипенемаза);

- 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);

- ОХА (the oxacillinase-type beta-lactamase – оксациллиназа).

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

Для нанесения на мембрану с конъюгатами применяли рабочие растворы конъюгатов антител к карбапенемазам КРС, IMP, NDM, VIM, ОХА (Jiangsu East-Mab Biomedical Technology Co., Ltd., Китай, кат. №№ DZMK011, DZMK021, DZMK015, C07503, 02MK022 соответственно) на основе наночастиц коллоидного золота (НЧ-КЗ) размером 30-80 нм, получаемых из золотохлористоводородной кислоты - Gold (III) chloride hydrate (фирма «Aldrich», кат. № 254169-500MG). Размеры и однородность НЧ-КЗ контролировали с помощью спектрофотометрии и просвечивающей электронной микроскопии.

Для приготовления необходимых растворов получали деионизованную воду с удельным сопротивлением 18,2 Ом·м при 25 °С («Simplicity System», фирмы «Millipore», США). Для стерилизующей фильтрации деионизованную воду или солевые растворы про-

пускали через колонку фильтров с калиброванным размером пор 0,45 и 0,22 мкм (фирмы «Millipore», США).

Разработанный набор реагентов был укомплектован необходимыми компонентами для проведения лабораторного исследования:

- флакон-капельница с буферным раствором (БР) - пластиковый флакон с отвинчивающейся крышкой и встроенной капельницей (ООО «Меридиан», Россия), содержащий 5,0 мл 0,01 М фосфатного буфера (рН-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);

- Пипетка Пастера одноразовая неградуированная серологическая и для переноса жидкостей («Нинбо Гритмед Медикал Инструментес Ко., Лтд.», Китай, РУ № ФСЗ 2012/11857);

- микропробирка одноразовая пластиковая для подготовки исследуемого образца объемом 0,5 мл (тип Эппендорф), РУ № ФСЗ 2012/12495);

- подставка под микропробирки картонная (АО «ЭКОлаб, Россия, кат. № 43.8).

Для контроля компонентов набора на всех этапах производства, при выпуске и последующей оценке активности в пределах сроков годности была разработана панель стандартных образцов предприятия (СОП-368), содержащих и не содержащих изучаемые бактериальные карбапенемазы:

- образец №1 не содержит карбапенемаз;
- образцы №2-№6 содержат ферменты в концентрациях порогового определения (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 - сильно положительные - каждый образец содержит фермент в концентрации 100 мкг/мл (№7 - KPC, №8 - OXA, №9 - VIM, №10 - IMP и №11 - NDM).

Для проведения внутренних клинических испытаний по оценке показателей диагностической информативности разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» были использованы образцы клинического материала, полученные из следующих медицинских организаций: лаборатории ООО «ИНВИТРО» (лицензия ЛО-77-01-012556 от 22.06.2016 г.), ГБУЗ «Орехово-Зуевская станция переливания крови» (лицензия ЛО-

50-01-005260 от 02.04.14 г.) и Диагностического Центра «El'Clinic» АО «ЭКОлаб» (лицензия на осуществление медицинской деятельности № ЛО41-01162-50/00365571 от 08.04.15 г.).

Всего было представлено 106 клинических образцов содержащих и 148 образцов, не содержащих карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии культуры на агаризованных средах.

При изучении возможной интерференции использовано 54 образца, содержащих и не содержащих карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP и NDM типов, и содержавшие культуральную среду (в концентрации до 100 мг/мл), цельную кровь (50 мкг/мл), слюну (50 мкг/мл), мочу (50 мкг/мл), антибиотики (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем в концентрациях до 10 мкг/мл), цефтриаксон (в концентрации до 500 мкг/мл).

Исследования возможной перекрестной реактивности выполнены на 36 клинических образцах, содержащих и не содержащих карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP и NDM типов и содержавшие *E. coli* (в концентрации $1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), *Klebsiella pneumoniae* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), *Enterobacter cloacae* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), *Pseudomonas aeruginosa* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), *Acinetobacter baumannii* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл), *Staphylococcus aureus* ($1,0 \times 10^2$ КОЕ/мл).

Для проведения внутренних доклинических испытаний были выпущены 4 опытно-производственные серии разработанного набора реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024: 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.

В качестве тест-системы сравнения были приобретены наборы «NG-Test CARBA 5» Экспресс-тест для определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» (фирмы «NGBiotech», Франция), серии 190323-01 годные до 2025-11, РУ № РЗН 2022/16818 от 05.04.2022.

Для верификации результатов применяли результаты ПЦР-РВ по выявлению генов приобретенных 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

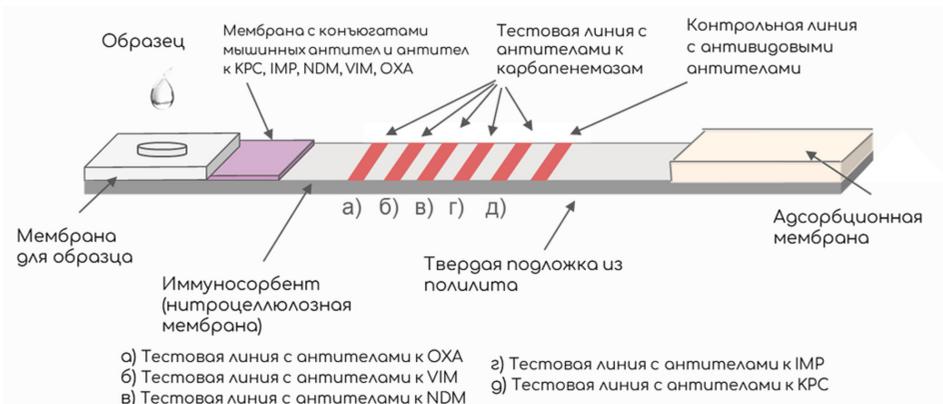


Рис.1. Структурная схема иммунологической тест-полоски в составе набора реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

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.

Результаты и их обсуждение. По результатам проведения серии предварительных испытаний был создан макет иммунологической тест-кассеты для набора реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024. Эти предварительные опыты позволили установить возможность последовательного размещения тест-линий с антителами к определяемым карбапенемазам в следующей последовательности, начиная от зоны внесения тестируемого образца: OXA, VIM, NDM, IMP и KPC; завершающей линией на стрипе является контрольная линия (рис. 1).

При этом на пластиковой кассете, в которую затем монтируется эта иммунохроматографическая тест-полоска, нанесены соответствующие литеры: S (Sample), O, V, N, I, K (начальные буквы названий ферментов) и C (Control). Готовая пластиковая тест-кассета является неразборной, тестовые и контрольные линии на тест-полоске визуально не определяются.

Дополнительная серия постановок позволила осуществить титрование концентраций растворов:

- для нанесения на иммуносорбент:
- антитела к определяемым карбапенемазам (тестовые линии) - $\geq 0,5$ мг/мл в фосфатном буфере (pH 7,4);
- козы антитела к IgG мыши (контрольная линия) - ≥ 1 мг/мл фосфатном буфере (pH 7,4) (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. №264.4);
- для нанесения на мембрану с конъюгатами:
- конъюгаты антител к карбапенемазам - ≥ 1 мг/мл в трисовом буфере (pH 7,4);
- конъюгаты НЧ-КЗ с мышиными IgG - $\geq 0,5$ мг/мл в трисовом буфере (pH 7,4) (АО «ЭКОлаб», Россия, кат. №264.4).

Разработанные наборы «ИХА-CARBA-5» характеризовались следующими нормативными показателями аналитической чувствительности (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 и к NDM - 150 пг/мл.

Принцип проведения иммунохроматографического латерального исследования.

Тест основан на использовании меченных коллоидным золотом конъюгатов (НЧ-КЗ и моноклональных антител к специфическим эпитопам выявляемых карбапенемаз). Подготовленный к исследованию образец тестируемой культуры микроорганизма вносят на поверхность тест-полоски через специальную лунку (S), где он соединяется со смесью меченных НЧ-КЗ моноклональными антителами к различным карбапенемазам. При наличии карбапенемаз происходит их конъюгация с соответствующими антителами, далее смесь за счет капиллярных сил смачивания продвигается в толще нитроцеллюлозной подложки, на которую нанесены отдельно в виде поперечных линий моноклональные антитела к каждому из определяемых ферментов.

Если в реакционной смеси образовались конъюгаты с карбапенемазами, то они фиксируются в области соответствующих реакционных линий иммуносорбента, формируя за счет НЧ-КЗ окрашенные в розовый цвет полоску. В отсутствие карбапенемаз окрашивается только контрольная линия, что указывает на пригодность тест-системы и правильное выполнение этапов исследования.

Порядок подготовки культур к исследованию.

Для исследования пригодны разнообразные виды клинического материала человека, предназначенные для высева на агаризованные питательные среды с целью получения изолированных колоний (фекалии, раневое отделяемое, биологические жидкости: амниотическая жидкость, гной, кровь лимфа, мокрота, желчь, молозиво, моча, секрет предстательной железы, слизь слизистых оболочек, синовиальная жидкость, сперма, спинномозговая жидкость, тканевая жидкость, плевральная жидкость, носовая слизь, пот, трансудат, ушная сера или экссудат). Рекомендуемые к использованию питательные среды для последующего определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM IMP, NDM: ХРОМагар™мСуперКАРБА™, агар Мюллер-Хинтона (MX), URIselct™4 (УРИселект™4), Триптиказо-соевый агар (ТСА), Колумбийский агар 5% лошадиной крови (СОН), Хромогенный агар Chromid ESBL, Хромогенный агар Chromid CARBA smart, агар Дригальского (DRIG), Лурия бульон (ЛБ) и Лурия агар.

Отбор биологических проб, посев и культивирование

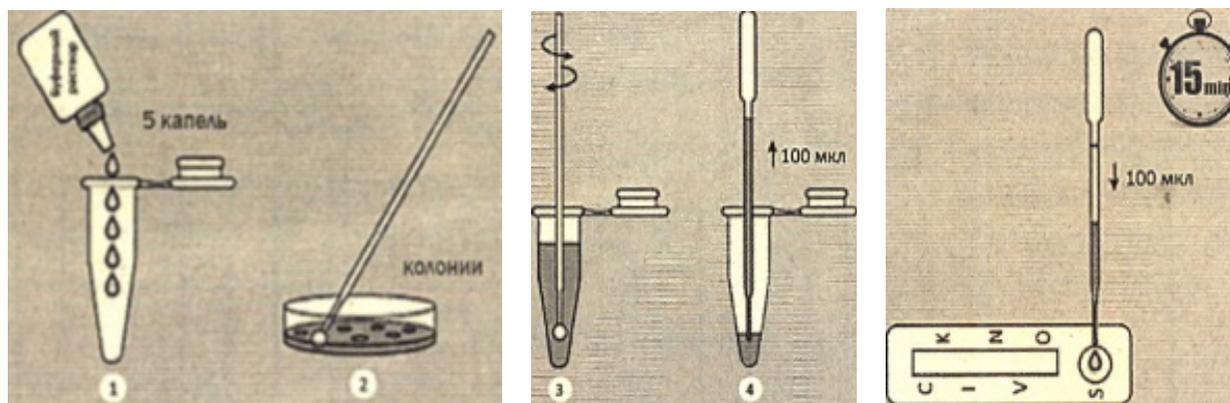


Рис. 2. Порядок проведения исследования с набором реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

ние производят с соблюдением условий стерильности в соответствии со стандартной процедурой.

По окончании времени культивирования (18-24 часа при 37°C) выявляют изолированные колонии микроорганизмов на поверхности плотного агара. С помощью микробиологической петли колонию аккуратно снимают с поверхности агара и переносят в одноразовую микропробирку (типа Эппендорф) с экстракционным буфером (входит в состав набора), где суспендируют с целью гомогенизации полученной смеси. Для оптимальной эффективности тестов рекомендуется использовать только свежие колонии.

Порядок проведения исследования. Перед использованием все компоненты набора и исследуемые образцы доводят до комнатной температуры (18-25°C), упаковку с тест-кассетой выдерживают при указанной температуре до вскрытия! Все реагенты готовы к применению.

Подготовка образцов.

Вносят 5 капель (~200 мкл) буферного раствора в микропробирку. Отбирают с помощью микробиологической петли колонию культуры с твердого агара, как

указано выше, помещают в микропробирку с буферным раствором. Закрывают пробирку крышкой. Тщательно перемешивают (рис. 2).

Проведение исследования.

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

2. Держа пипетку Пастера вертикально, вносят 3 капли (~100 мкл) подготовленной ранее в микропробирке суспензии в лунку тест-кассеты для внесения образцов (отмечена литерой «S»).

3. Запускают секундомер. Во время исследования тест-кассету не трогают и не перемещают.

4. Оценивают результат исследования через 15-20 минут. Не интерпретировать результаты позднее 20 минут после внесения образца.

Интерпретация результатов

Интенсивность окраски розовых линий иммунологической тест-полоске может варьировать в зависимости от концентрации карбапенемаз в исследуемом об-

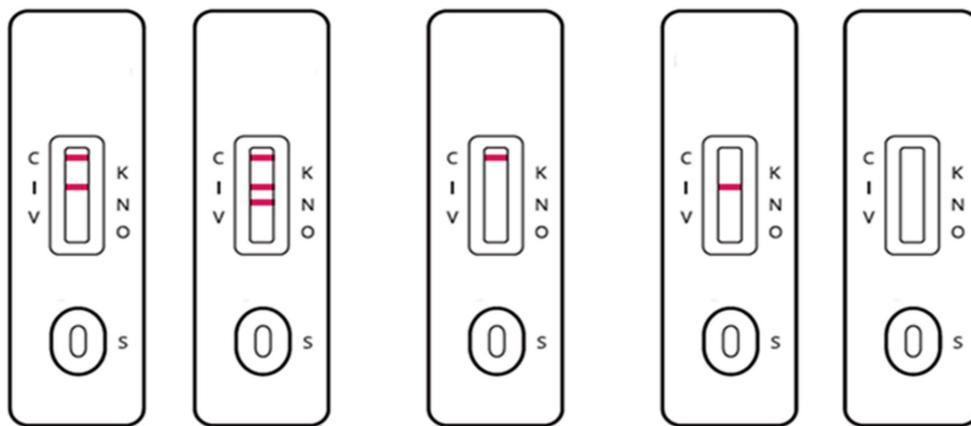


Рис. 3. Интерпретация результатов исследования с набором реагентов «ИХА-CARBA-5» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

разце (рис. 3).

Положительный результат: проявляются две или более четкие окрашенные линии: одна - в контрольной зоне (С), другая(другие) - в тестовой зоне (I, V, K, N, O).

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

Недействительный результат: в контрольной зоне (С) не появляется окрашенной линии независимо от наличия линий в тестовой зоне (I, V, K, N, O).

В случае получения недействительного результата исследование следует повторить с использованием другой тест-кассеты набора реагентов «ИХА-CARBA-5».

Результаты внутренних доклинических испытаний разработанного набора.

В рамках испытаний проведено исследование с набором реагентов «ИХА-CARBA-5» колоний из 254 клинических образцов, полученных посевом биоматериалов от человека на плотные питательные агаризованные среды. Было установлено, что исследованные колонии микроорганизмов от 106 образцов содержали карбапенемазы (KPC - 26, OXA - 18, VIM - 24, IMP - 13

и NDM - 25 образцов колоний микроорганизмов) и от 148 – не содержали (таблица). Результаты определения типа карбапенемаз разработанным набором реагентов и набором сравнения полностью совпали. Верифицирующее исследование в ПЦР двумя наборами реагентов также подтвердило наличие карбапенемаз как по общему количеству проб, так и по типу кодирующих их экспрессию генов. Таким образом, была установлена высокая клиническая чувствительность и специфичность (по 100%) разработанного нового набора реагентов «ИХА-CARBA-5», стабильность получения результатов и отсутствие межсерийной вариабельности.

Один из разделов внутренних клинико-лабораторных испытаний набора реагентов «ИХА-CARBA-5» включал оценку возможной вариации результатов исследования карбапенемаз в зависимости от присутствия в среде потенциально интерферирующих веществ: культуральной среды (в концентрации до 100 мг/мл), цельной крови (50 мкг/мл), мочи (50 мкг/мл), слюны (50 мкг/мл), антибиотиков (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем в концентрациях до 10 мкг/мл и цефтриаксон – до 500 мкг/мл). Для этого были

приготовлены образцы, моделирующие потенциальное интерферирующее влияние перечисленных факторов (х 9 факторов) с каждым типом карбапенемаз и без них (х 6 типов); тестирование выполнено с каждой опытно-производственной серией набора реагентов (х 4 серии). Всего выполнено 216 исследований. Нами не было замечено изменения выраженности позитивного результата в ИХА-исследовании в зависимости от присутствия в реакционной среде изученных потенциальных интерферентов. Так же не наблюдали появления ложных положительных результатов в ИХА при отсутствии в среде карбапенемаз и наличии интерферентов.

Помимо этого, проведены исследования возможной перекрестной реактивности на результаты определения типов и наличия карбапенемаз возможного присутствия в пробе культур наиболее часто циркулирующих микроорганизмов. С этой целью перед исследованием подготовленных проб (содержавших и не содержащих каждый тип карбапенемаз) в микропробирки вносили каждую из 6 выбранных культур микроорганизмов: *E. coli* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл; штамм O157:H7), *Klebsiella*

pneumoniae ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл; штамм *K. pneumoniae ssp. pneumoniae* ST 3181K-54), *Enterobacter cloacae* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл; штамм NCTC 10006), *Pseudomonas aeruginosa* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл; штамм ST235), *Acinetobacter baumannii* ($1,0 \times 10^6$ КОЕ/мл; штамм *Acinetobacter baumannii* 5720), *Staphylococcus aureus* ($1,0 \times 10^2$ КОЕ/мл; штамм CC30). При проведении 144 исследований не было определено перекрестной реактивности воздействия испытанных штаммов микроорганизмов в указанной концентрации на результаты иммунохроматографических тестов с 4 опытно-производственным сериями разработанного набора «ИХА-CARBA-5».

Таким образом, была показана высокая специфичность разработанного набора реагентов для иммунохроматографического определения в колониях микроорганизмов, полученных при культивировании биологических образцов от человека, ферментов устойчивости к антибиотикам карбапенемам (KPC, OXA, VIM, IMP и NDM).

Применение иммунохроматографической технологии экономно по времени, не требует дополнительного дорогостоящего оборудования, доступно для применения ме-

Таблица

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 KPC/OXA-48-FL» (серия 17.12.23, годен до 2024-09-17)

Исследованные материалы	n =	Результаты исследований (n =) с наборами реагентов													
		«ИХА-CARBA-5»								«NG-Test CARBA 5»		«АмплиСенс® MDR MBL-FL»		«АмплиСенс® MDR KPC/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: пол. – положительный результат, отр. – отрицательный результат.

дицинским персоналом клинической лаборатории.

Систематическое широкое использование иммунохроматографических наборов для качественного определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM при оказании медицинской помощи населению позволяет повысить качество оказания этой услуги, повысить экономное расходование средств на антибактериальные препараты и осуществлять эпидемиологический мониторинг распространения карбапенемрезистентных штаммов в популяции.

Выводы:

1. Коллективом сотрудников АО «ЭКОлаб» в ходе выполнения задач по импортозамещению и обеспечению медицинских учреждений необходимыми диагностическими медицинскими изделиями для оказания медицинской помощи населению был разработан новый отечественный набор реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024».

2. Результаты, проведенных внутренних доклинических испытаний (с использованием 106 образцов, содержавших карбапенемазы KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальных колониях культуры на агаризованных средах и 148 образцов, их не содержавших), позволили высоко оценить клиническую специфичность и чувствительность результатов исследования (по 100%) с новым иммунохроматографическим набором реагентов «ИХА-CARBA-5» и отсутствие внутри- и межсерийной вариабельности результатов. Аналитическая чувствительность (предел обнаружения) теста «ИХА-CARBA-5» в отношении определяемых аналитов: KPC - 600 пг/мл; OXA - 300 пг/мл; VIM - 300 пг/мл; IMP - 200 пг/мл и NDM - 150 пг/мл.

3. Испытания клинических образцов, содержавших потенциально интерферирующие вещества (культуральную среду, цельную кровь, мочу, слюну, антибиотики (меропенем, имипенем, дорипенем, эртапенем или цефтриаксон) или потенциально перекрестно реагирующие культуры (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acineto-*

bacter baumannii, *Staphylococcus aureus*), демонстрировали отсутствие влияния этих факторов на положительные результаты определения карбапенемаз или появления ложных положительных результатов.

4. Набор реагентов «ИХА-CARBA-5» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры» по ТУ 21.20.23-368-70423725-2024» представлен к государственной регистрации в Российской Федерации в установленном законом порядке. По завершении чего он может быть следующее рекомендован для применения в здравоохранении, что позволит обеспечить своевременное и качественное оказание медицинской помощи населению и осуществлять эпидемиологический мониторинг циркуляции карбапенемаза-продуцирующих штаммов бактерий в популяции.

ЛИТЕРАТУРА

- Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(3): 417–33.
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(18): 5649–54.
- Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. Webcast of Q-A. Session on global report on surveillance, 2014 (http://apps.who.int/iris/bit-stream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1) (Accessed 10.07.2024).
- Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(1): 42–51.
- Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.* 2016; 387(10014): 176–87.
- 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): 387-393
- Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother.* 2013; 19(4): 549-559. DOI: 10.1007/s10156-013-0640-7.
- Попов Д.А. Сравнительная характеристика современных методов определения продукции карбопенемаз. *Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия.* 2019; 21(2): 125-133 DOI: <http://10.36488/cmasc/2019/2/125-133>.
- Яковлев С.В., Сурова 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
- Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А. и др. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности. *Клин. микробиол. и антимикробная химиотерапия.* 2017; 19(2): 84-90.
- 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".
- Лазарева И.В., Агеев В.А., Сидоренко С.В. Антибиотикорезистентность: роль карбопенемаз. *Медицина экстремальных ситуаций.* 2018; 20(3): 320-328
- Электронный ресурс: DIALAB medical. Каталог. Экспресс-тест для определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM (NG-Test CARBA5). <http://diallab.ru/product/ngb-car-s23-014-iht-ng-test-carba5-dlya-opred-karba-penemaz-kpc-oxa-vim-imp-i-ndm-20-kasset>
- Экспресс-тест для качественного иммунохроматографического определения карбапенемаз KPC, OXA, VIM, IMP и NDM в бактериальной колонии из культуры в биологическом материале "CARBA5-ИМБИАН-ИХА" по ТУ 21.20.23-051-39271034-2023 (Электронный ресурс) <https://analitikamed.ru/products/94936/>
- RZH-2023-21446/#home
- Jung Yoon, Chang Hyun Kim, Soo-Young Yoon et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02309-9>.
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. и др. О количественном определении D-димера в крови иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2022; 67(2): 91-96
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для полуколичественного определения простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке, плазме или цельной крови человека "ИХА-ПСА". *Известия ГТТУ. Медицина, фармацевтика.* 2023; 2: 9-14.
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. и др. Разработка иммунохромато-графического набора реагентов для выявления ротавирусов. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2023; 68(11): 672-679.
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. Об иммунохроматографическом выявлении *Helicobacter pylori* у человека. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2024; 69(4): 123-130.
- 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): 82-89
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Гашенко Т.Ю. Одноэтапное выявление маркеров возбудителей острых кишечных вирусных инфекций у человека. *Эпидемиология и инфекционные болезни.* 2024; 29(2): 97-106.

REFERENCES

- Davies J., Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. // *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(3): 417–33.
- Van Boeckel T.P., Brower C., Gilbert M. et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015; 112(18): 5649–54.
- Antimicrobial Resistance Global Report on surveillance. Webcast of Q-A. Session on global report on surveillance, 2014 (http://apps.who.int/iris/bit-stream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf?ua=1) (Accessed 10.07.2024).
- Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 13(1): 42–51.
- Holmes A.H., Moore L.S., Sundsfjord A. et al. Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance. *Lancet.* 2016; 387(10014): 176–87.
- 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): 387-393. (in Russ.)
- Bush K. The ABCD's of β -lactamase nomenclature. *J Infect Chemother.* 2013; 19(4): 549-559. DOI: 10.1007/s10156-013-0640-7.
- Popov D.A. Comparative review of the modern methods for determining carbapenemase production. *Klin. mikrobiol. i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2019; 21(2): 125-133. (in Russ.)
- Yakovlev S.V., Surova M. .P., Bykov A.O. Infections caused by carbapenem-resistant enterobacteria: epidemiology, clinical significance and possibilities of optimization of antibacterial therapy. *Antibiotiki i khimioterapiya.* 2020; 65: 5-6. (in Russ.)
- Kuzmenkov A.Yu., Trushin I.V., Avramenko A.A. et al. AMRmap: Internet platform for monitoring antibiotic resistance. *Klin. mikrobiol. i antimikrobnaya khimioterapiya.* 2017; 19(2): 84-90. (in Russ.)
- Order of the Government of the Russian Federation of September 25, 2017 No. 2045-r. "On approval of the Strategy for preventing the spread of antimicrobial resistance in the Russian Federation for the period up to 2030". (in Russ.)
- Lazareva I.V., Ageyevets V. A., Sidorenko S.V. Antibiotic resistance: the role of carbapenemases. *Meditsina ekstremal'nykh situatsiy.* 2018; 20(3): 320-328. (in Russ.)
- Electronic resource: DIALAB medical. Catalog. Rapid test for detection of carbapenemases KPC, OXA, VIM, IMP and NDM (NG-

- Test CARBA5). <http://diallab.ru/product/ngb-car-s23-014-ih-ng-test-carba5-dlya-opred-karbapenemaz-kpc-oxa-vim-imp-i-ndm-20-kasset> (in Russ.)
14. Express test for qualitative immunochromatographic determination of bovine carbapenemases, 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 (Electronic resource) <https://analitikamed.ru/products/94936/RZH-2023-21446/#home> (in Russ.)
 15. Jung Yoon, Chang Hyun Kim, Soo-Young Yoon et al. 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. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02309-9>. (in Russ.)
 16. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V. et al. On the quantitative determination of D-dimer in the blood by the immunochromatographic method. *Klinicheskaya laboratornaya.dagnostika*. 2022; 67(2): 91-96 (in Russ.)
 17. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G. Immunochromatographic test for semi-quantitative determination of prostate-specific antigen (PSA) in human serum, plasma or whole blood "ICA-PSA". *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya*. 2023; 2: 9-14. (in Russ.)
 18. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V. et al. Development of an immunochromatographic reagent kit for the detection of rotaviruses. *Klinicheskaya laboratornaya.dagnostika*. 2023; 68 (11): 672-679 (in Russ.)
 19. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V. On immunochromatographic detection of Helicobacter pylori in humans. *Klinicheskaya laboratornaya.dagnostika*. 2024; 69 (4): 123-130. (in Russ.)
 20. Rotanov S.V., Mardanly S.G., Popova T.V., Akinshina Yu.A. On the spread of Helicobacter pylori among the population of the Pavlovsky Posad district of the Moscow region. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 82-89. (in Russ.)
 21. Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Gashchenko T.Yu. One-stage detection of markers of pathogens of acute intestinal viral infections in humans. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni*. 2024; 29 (2): 97-106. (in Russ.)