

## ОБЗОР МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ESKAPE-ПАТОГЕНОВ

Т. С. Скачкова, О. Ю. Шипулина

ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

## A REVIEW OF MOLECULAR-BASED METHODS FOR ESKAPE PATHOGENS DETECTION

T. S. Skachkova, O. Yu. Shipulina

Federal Budget Institution of Science Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

**Резюме.** Использование быстрых и высокочувствительных методов для детекции ESKAPE-патогенов должно быть приоритетной целью любой микробиологической лаборатории. Во всем мире микроорганизмы из этой группы представляют особую проблему с точки зрения роста резистентности. В обзоре рассматриваются современные молекулярно-биологические методы, применяемые для детекции ESKAPE-патогенов. Указаны диагностические характеристики разработанных наборов, их преимущества и ограничения. Особое внимание уделено методам ПЦР диагностики (библ.: 23 ист.).

**Ключевые слова:** ESKAPE, молекулярная диагностика, молекулярные методы, ПЦР, секвенирование.

Статья поступила в редакцию 11.03.2018 г.

Группа бактерий, которые во всем мире представляют особую проблему с точки зрения роста резистентности, была названа ESKAPE-патогенами [1, 2]. ESKAPE — акроним, созвучный английскому слову «escapе» (ускользать, избегать), так как микроорганизмы из этой группы эффективно «ускользают» от воздействия антибактериальных препаратов. Слово образовано из первых букв названий микроорганизмов *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp.* Эти микроорганизмы распространены повсеместно и вызывают большую часть госпитальных инфекций [1, 3]. Карбапенем-резистентные *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, бактерии семейства *Enterobacteriaceae* (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.* и др.); ванкомицин-резистентный *Enterococcus faecium*, метициллин и ванкомицин-резистентный *Staphylococcus aureus* вошли также и в список из двенадцати самых опасных патогенов в мире [4].

Использование быстрых и высокочувствительных методов для детекции этих патогенов должно быть приоритетной целью любой микробиологической лаборатории. Быстрое назначение адекватного антибактериального препарата при сепсисе чрезвычайно важно для снижения смертности [5]. Неадекватное назначение антибиотиков у пациентов

**Abstract.** The fast and highly-sensitive methods for detection of ESKAPE pathogens must be the priority purpose of any microbiological laboratory. Microorganisms from this group represent a special problem of the resistance increase around the world. The modern molecular-based methods applied to detection of ESKAPE pathogens are discussed in this review. Diagnostic characteristics, advantages and qualifications of the developed sets are specified. Special attention is paid to methods of PCR diagnostics (bibliography: 23 refs).

**Key words:** ESKAPE, molecular-based methods, molecular diagnostics, PCR, sequencing.

Article received 11.03.2018.

с внутрибольничной инфекцией кровотока ухудшает прогноз заболевания, увеличивает госпитальную смертность по сравнению с пациентами, которым была назначена адекватная антибиотикотерапия [6]. Традиционные бактериологические методы требуют как минимум 48–72 ч для получения результатов идентификации микроорганизма и его чувствительности к антибиотикам. Гемокультуры у пациентов с сепсисом отрицательны в 50% случаев [7]. Это может быть связано с предшествующей антимикробной химиотерапией; небольшим количеством микроорганизмов, циркулирующих в крови; некультивируемыми или труднорастущими микроорганизмами. У пациентов с септическим шоком каждый час задержки в назначении адекватной антимикробной химиотерапии снижает выживаемость пациентов на 7,6% [8]. Молекулярно-биологические методы могут стать помощником врачей и работников лабораторной службы в достижении цели сокращения времени идентификации микроорганизмов и обнаружения генов устойчивости к наиболее распространенным антибиотикам. Наиболее распространенные молекулярно-биологические методы, на основе которых ведутся разработки наборов для выявления бактериальных патогенов, — это MALDI-TOF масс-спектрометрия, флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH), методы амплификации нуклеиновых кислот и секвенирование.

В основе метода MALDI-TOF масс-спектрометрии лежит получение масс-спектра белков исследуемого микроорганизма и сравнение его с масс-спектрами, содержащимися в базе данных. Вывод о принадлежности микроорганизма к тому или иному виду делается на основании степени сходства полученного масс-спектра белков с уже известными. Время, необходимое для видовой идентификации микроорганизма из положительной гемокультуры методом MALDI TOF масс-спектрометрии, составляет 1–2 ч в зависимости от количества исследованных проб [9]. Преимуществом данного метода является широкий спектр выявляемых микроорганизмов. Метод MALDI TOF позволяет выявить всех представителей группы ESKAPE. Ограничением метода является необходимость предварительного гемокультивирования и невозможность идентификации микроорганизмов в культурах с более чем одним патогеном.

В одном из исследований идентификацию патогенов в крови проводили всего после 4 ч предварительного гемокультивирования. Подобный подход позволил правильно идентифицировать 69,5% видов в 174 случаях положительных гемокультур. Ошибочно было определено 3,4% видов. В культурах крови, содержащих более одного патогена, был правильно идентифицирован только один из видов в 72,7% случаев [10].

В основе метода FISH лежит специфическое связывание флуоресцентного зонда с комплементарной последовательностью ДНК микроорганизма. Получение результата после гемокультивирования возможно менее чем за 3 ч [11]. Чувствительность и специфичность метода составляют 90–97 и 100% соответственно [11, 12]. Компанией *Accelerate Diagnostics INC* (США) разработана автоматическая система (*Accelerate ID/AST*) на основе технологии FISH, позволяющая идентифицировать наиболее распространенные бактерии за 1 ч и определять чувствительность к антибактериальным препаратам в течение 6 ч. Наборы «QuickFISH™» (*Alpha Laboratories*) позволяют детектировать *E. faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* и *Pseudomonas aeruginosa* в течение 20 мин после получения гемокультуры. В линейке предлагаемых наборов нет тестов для выявления *Acinetobacter baumannii* и *Enterobacter spp.* Ограничением использования метода является необходимость предварительного гемокультивирования и ограниченный спектр выявляемых микроорганизмов. Наиболее перспективно применение молекулярных методов для идентификации микроорганизмов непосредственно в клинических образцах, так как это предполагает значительное сокращение времени, затрачиваемого на идентификацию микроорганизмов. Идентификацию бактериальных патогенов непосредственно в биологическом материале позволяют проводить молекулярные ме-

тоды, основанные на амплификации нуклеиновых кислот. Ограничением этих методов является возможность детекции микробной ДНК после гибели возбудителя и ограниченный спектр выявляемых микроорганизмов и локусов резистентности.

Одним из первых на рынке появился тест «LightCycler SeptiFast» (*Roche Molecular Diagnostics*). Тест позволяет выявлять всех представителей группы ESKAPE в течение 3,5–6 ч. Показано, что чувствительность метода составила 75%, специфичность — 92% [13]. С помощью метаанализа 41 исследования (7 тыс. пациентов) были рассчитаны специфичность — 68% и чувствительность — 86% [14]. Набор имеет регистрационное удостоверение (№ ФСЗ 2007/00139), действующее на территории Российской Федерации (РФ).

Компанией *Seegene* (Южная Корея) был разработан тест «Magicplex Sepsis Real-Time» для идентификации более 90 микроорганизмов на уровне рода, включая 25 микроорганизмов на уровне вида (все микроорганизмы из группы ESKAPE входят в набор). Есть возможность детекции локусов резистентности для ванкомицин-резистентного *Enterococcus spp.* и метициллин-резистентного *Staphylococcus spp.* У набора нет регистрационного удостоверения, действующего на территории РФ. Опубликованные исследования свидетельствуют о чувствительности в диапазоне от 37 до 65% и специфичности от 77 до 92% [15, 16].

Немецкая компания *Analytik Jena* представила на рынок продукт «VVOO system», позволяющий идентифицировать 34 бактерии (все представители группы ESKAPE включены), 7 грибов и 5 локусов резистентности (*mecA*; *vanA*; *vanB*; *blaSHV*; *blaCTX-M*). Результат можно получить в течение 7 ч. Чувствительность и специфичность метода относительно традиционного бактериологического метода составила 60 и 75% соответственно [17]. При этом среднее время до получения результата с помощью составляло 7,2 ч; а результаты полимеразной цепной реакции (ПЦР) идентификации микроорганизмов в положительных гемокультурах были известны только после 68,8 ч. Набор не зарегистрирован для применения в клинической практике на территории России.

В РФ на сегодняшний день зарегистрированы две отечественные тест-системы для идентификации микроорганизмов из списка ESKAPE-патогенов: набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* в клиническом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс®*Pseudomonas aeruginosa*-скрин-титр-FL» (ФСР 2012/13997) [18] и набор реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus* в биологическом материале методом ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией «АмплиСенс®*MRSA*-скрин-титр-FL»

(ФСР 2012/13998) [19]. В стадии клинической апробации находится разработанный в ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора набор реагентов для одновременного выявления всех микроорганизмов из списка ESKAPE. Тесты позволяют получить информацию о возбудителях через 3–4 ч напрямую из клинических образцов без необходимости предварительного гемокультивирования.

На территории РФ нет зарегистрированных тестов для выявления бактериальных патогенов на основе методов секвенирования нуклеиновых кислот, однако подобные разработки ведутся. В мире уже есть предложения для идентификации микроорганизмов на основе секвенирования ДНК по Сэнгеру. Немецкая компания *Molzum* предлагает набор «SepsiTst» с универсальными праймерами на 16S рРНК бактерий с последующим секвенированием ампликонов и анализом хроматограмм, позволяющим идентифицировать последовательности, характерные для различных микроорганизмов. В разных исследованиях

чувствительность и специфичность набора «SepsiTst» варьирует от 21 до 85 и от 58 до 95% соответственно [16, 20–22].

В мире ведутся разработки по созданию тестов у постели больного. Разработан портативный диагностический прибор, позволяющий оперативно выявлять ESKAPE-патогены в режиме реального времени. Детекция микроорганизмов *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter spp* происходит с помощью изотермической амплификации [23]. Предел детекции составляет 10 молекул нуклеиновых кислот. Пока нет данных о чувствительности и специфичности этого теста при использовании на клинических образцах.

На сегодня молекулярно-биологические методы не могут заменить традиционные бактериологические методы. Однако значительное сокращение времени анализа по сравнению с традиционными методами делает актуальным и необходимым их внедрение в клиническую практику.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

- Boucher H. W., Talbot G. H., Bradley J. S., Edwards J. E., Gilbert D., Rice L. B., Scheld M., Spellberg B., Bartlett J. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 2009; 48 (1): 1–12. DOI:10.1086/595011
- Rice L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. *J. Infect. Dis.* 2009; 197: 1079–81.
- Pendleton J. N., Gorman S. P., Gilmore B. F. Clinical relevance of the ESKAPE pathogens. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2013; 11 (3): 297–308.
- Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. WHO report. WHO/EMP/IAU. 2017; 12: 88.
- Mayr F., Yende S., Angus D. Epidemiology of severe sepsis. *Virulence.* 2013; 5: 4–11.
- Ibrahim E. H., Sherman G., Suzanne W., Ward S., Fraser V. J., Kollef M. H. The Influence of Inadequate Antimicrobial Treatment of Bloodstream Infections on Patient Outcomes in the ICU Setting. *Chest.* 2000; 118: 146–55. DOI: 10.1378/chest.118.1.146
- Dellinger R., Levy M., Carlet J., Bion J., Parker M. M., Jaeschke R., Reinhart K., Angus D. C., Brun-Buisson C., Beale R., Calandra T., Dhainaut J. F., Gerlach H., Harvey M., Marini J. J., Marshall J., Ranieri M., Ramsay G., Sevransky J., Thompson B. T., Townsend S., Vender J. S., Zimmerman J. L., Vincent J. L. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive. Care Med.* 2008; 34: 17–60.
- Kumar A., Roberts D., Wood K., Light B., Parrillo J. E., Sharma S., Suppes R., Feinsein D., Zanotti S., Taiberg L., Gurka D., Kumar A., Cheang M. Duration of hypotension before initiation of effective antimicrobial therapy is the critical determinant of survival in human septic shock. *Crit. Care Med.* 2006; 34: 1589–96.
- Ломинадзе Г. Г., Семенова Е. А., Мотузова О. В., Калакуцкая А. Н., Лазарева А. В. Использование метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для ускорения идентифи-
- фикации микроорганизмов в гемокультурах пациентов с подозрением на сепсис. Поликлиника. Спецвыпуск «Лаборатория ЛПУ». 2014; 4: 17–20. [Lominadze G. G., Semenova E. A., Motuzova O. V., Kalakutskaya A. N., Lazareva A. V. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for the rapid identification of microorganisms in blood cultures of patients with suspected sepsis. *Polyclinic. Special issue "LPU Laboratory"*. 2014; 4: 17–20. (In Russian)]
- Kohlmann R., Hoffmann A., Geis G., Gatermann S. MALDI-TOF mass spectrometry following short incubation on a solid medium is a valuable tool for rapid pathogen identification from positive blood cultures. *Int. J. Med. Microbiol.* 2015; 305 (4–5): 469–79. DOI: 10.1016/j.ijmm.2015.04.004
- Martinez R. M., Bauerle E. R., Fang F. C., Butler-Wu S. M. Evaluation of three rapid diagnostic methods for direct identification of microorganisms in positive blood cultures. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 2521–9. DOI: 10.1128/JCM.00529-14
- Deck M. K., Anderson E. S., Buckner R. J., Colasante G., Coull J. M., Crystal B., Della Latta P., Fuchs M., Fuller D., Harris W., Hazen K., Klimas L. L., Lindao D., Meltzer M. C., Morgan M., Shepard J., Stevens S., Wu F., Flandera M. J. Multicenter evaluation of the Staphylococcus QuickFISH method for simultaneous identification of Staphylococcus aureus and coagulase-negative staphylococci directly from blood culture bottles in less than 30 minutes. *J. Clin. Microbiol.* 2012; 50: 1994–8. DOI: 10.1128/JCM.00225-12
- Chang S. S., Hsieh W. H., Liu T. S., Lee S. H., Wang C. H., Chou H. C., Yeo Y. H., Tseng C. P., Lee C. C. Multiplex PCR system for rapid detection of pathogens in patients with presumed sepsis — a systemic review and meta-analysis. *PLOS ONE.* 2013; 8: e62323. DOI: 10.1371/journal.pone.0062323
- Dark P., Wilson C., Blackwood B., McAuley D. F., Perkins G. D., McMullan R., Gates S., Warhurst G. Accuracy of LightCycler(R) SeptiFast for the detection and identification of pathogens in the blood of patients with suspected sepsis: a systematic review protocol. *BMJ Open.* 2012; 2 (1): e000392. DOI: 10.1136/bmjopen-2011-000392
- Carrara L., Navarro F., Turbau M., Seres M., Morán I., Quintana I., Martino R., González Y., Brell A., Cordon O.,

- Diestra K., Mata C., Mirelis B., Coll P.* Molecular diagnosis of bloodstream infections with a new dual-priming oligonucleotide-based multiplex PCR assay. *J. Med. Microbiol.* 2013; 62: 1673–9. DOI:10.1099/jmm.0.064758-0
16. *Loonen A., de Jager C., Tosserams J., Kusters R., Hilbink M., Wever P. C., van den Brule A. J.* Biomarkers and molecular analysis to improve bloodstream infection diagnostics in an emergency care uni. *PLoS One.* 2014; 9: e87315. DOI: 10.1371/journal.pone.0087315
17. *Bloos F., Sachse S., Kortgen A., Pletz M. W., Lehmann M., Straube E., Riedemann N. C., Reinhart K., Bauer M.* Evaluation of a polymerase chain reaction assay for pathogen detection in septic patients under routine condition: an observational study. *PLoS ONE.* 2012; 7: e46003. DOI: 10.1371/journal.pone.0046003
18. *Скачкова Т. С., Черневская Е. А., Дмитриева И. Б., Белобородова Н. В., Шипулина О. Ю., Шипулин Г. А.* Разработка методики количественного определения ДНК *Pseudomonas aeruginosa* методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией продуктов амплификации. *Покровский В. И.*, ред. В сб.: Молекулярная диагностика-2010. VI Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием. 2010: 430–5. [*Skachkova T. S., Chernevskaya E. A., Dmitrieva I. B., Beloborodova N. V., Shipulina O. Yu., Shipulin G. A.* Development of a technique for the quantitative determination of DNA of *Pseudomonas aeruginosa* using the PCR method with hybridization-fluorescent detection of amplification products. *Pokrovsky V. I.*, ed. In: *Molekulyarnaya diagnostika-2010. VI Vserossiyskaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya s mezhdunarodnym uchastiem* (Molecular diagnostics-2010. VI all-Russian scientific-practical conference with international participation). 2010: 430–5. (In Russian)]
19. *Скачкова Т. С., Шипулина О. Ю., Домонова Э. А., Субботовская А. И., Козырева В. С., Ильина В. Н., Шипулин Г. А.* Разработка и апробация набора реагентов для выявления и количественного определения ДНК метициллин-чувствительного и метициллин-резистентного *Staphylococcus aureus*, а также метициллин-резистентных коагулазонегативных *Staphylococcus spp.* методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Клиническая и лабораторная диагностика. 2013; 6: 42–5. [*Skachkova T. S., Shipulina O. Yu., Domonova E. A., Subbotovskaya A. I., Kozyreva V. S., Il'ina V. N., Shipulin G. A.* development and testing of reagent kit for detection and quantification of DNA methicillin-sensitive and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, as well as methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus spp.* real-time polymerase chain reaction method. *Clinical and laboratory diagnosis.* 2013; 6: 42–5. (In Russian)]
20. *Orszag P., Disqué C., Keim S., Lorenz M. G., Wiesner O., Hadem J., Stiesch M., Haverich A., Kühn C.* Monitoring of patients supported by extracorporeal membrane oxygenation for systemic infections by broad-range rRNA gene PCR amplification and sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52: 307–11. DOI:10.1128/JCM.02493-13
21. *Schreiber J., Nierhaus A., Braune S. A., de Heer G., Kluge S.* Comparison of three different commercial PCR assays for the detection of pathogens in critically ill sepsis patients. *Med. Klin. Intensivmed. Notfmed.* 2013; 108 (4): 311–8. DOI: 10.1007/s00063-013-0227-1
22. *Wellinghausen N., Kochem A. J., Disqué C., Mühl H., Gebert S., Winter J., Matten J., Sakka S. G.* Diagnosis of bacteremia in whole-blood samples by use of a commercial universal 16S rRNA gene-based PCR and sequence analysis. *J. Clin. Microbiol.* 2009; 47 (9): 2759–65. DOI: 10.1128/JCM.00567-09
23. *Renner L. D., Zan J., Hu L. I., Martinez M., Resto P. J., Siegel A. C., Torres C., Hall S. B., Slezak T. R., Nguyen T. H., Weibel D. B.* Detection of ESKAPE Bacterial Pathogens at the Point of Care Using Isothermal DNA-Based Assays in a Portable Degas-Actuated Microfluidic Diagnostic Assay Platform. *Appl. Environ. Microbiol.* 2017; 83 (4): e02449–16. DOI: 10.1128/AEM.02449-16

**УВЕДОМЛЕНИЕ**

Авторы внесли равный вклад в данную работу и сообщают об отсутствии какого-либо конфликта интересов.

**СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ**

**Скачкова Татьяна Сергеевна** — младший научный сотрудник отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, д. 3А, e-mail: skachkova@inbox.ru

**Шипулина Ольга Юрьевна** — канд. мед. наук, руководитель подразделения молекулярных методов диагностики, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, 111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3А, e-mail: olga.shipulina@pcr.ms

**Автор, ответственный за переписку**

Скачкова Татьяна Сергеевна  
 Контактный тел.: +7(916)8335116  
 e-mail: skachkova@inbox.ru

**ACKNOWLEDGMENT**

Authors contributed equally into this work and declare no conflict of interest.

**INFORMATION ABOUT AUTHORS**

**Skachkova Tatyana S.** — junior researcher, molecular diagnostics and epidemiology Department, Federal Budget Institution of Science Central Research Institute of Epidemiology, 3A, Novogireevskaya str., Moscow, 111123, e-mail: skachkova@inbox.ru

**Shipulina Olga Yu.** — M. D., Ph. D. (Medicine), the Head of Molecular Diagnostic Methods Department, Federal Budget Institution of Science Central Research Institute of Epidemiology, 3A, Novogireevskaya str., Moscow, 111123, e-mail: olga.shipulina@pcr.ms

**Corresponding author**

**Skachkova Tatyana Sergeevna**  
 Contact phone: +7(916)8335116  
 e-mail: skachkova@inbox.ru