

Изучение генетического разнообразия штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном медицинском центре г. Москвы, с помощью секвенирования нового поколения

Скачкова Т.С.¹, Шипулина О.Ю.¹, Шипулин Г.А.¹, Шеленков А.А.¹, Янушевич Ю.Г.¹, Михайлова Ю.В.¹, Замятин М.Н.², Гусаров В.Г.², Петрова Н.В.², Лашенкова Н.Н.², Фомина В.С.², Шагин Д.А.¹

¹ ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБУ «Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:
Татьяна Сергеевна Скачкова
Эл. почта: skachkova@inbox.ru

Ключевые слова: *Klebsiella pneumoniae*, антибиотикорезистентность, бета-лактамазы, секвенирование нового поколения, сиквенс-тип.

Цель. Изучить генетическое разнообразие штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Национальном медико-хирургическом центре им. Н.И. Пирогова г. Москвы, с помощью секвенирования нового поколения.

Материалы и методы. В анализ включено 19 штаммов *K. pneumoniae* (18 из различного биологического материала и 1 с объектов внутрибольничной среды), выделенных в медико-хирургическом центре в период с 30 января по 9 октября 2017 г., фенотипически проявляющих множественную резистентность к антимикробным препаратам. Секвенирование ДНК штаммов проводилось на приборе Illumina HiSeq1500 с использованием наборов Illumina HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 и Illumina HiSeq Rapid SBS Kit v2.

Результаты. Все исследованные штаммы относились к 9 различным сиквенс-типам. Один из штаммов имел новый аллельный профиль. Обнаружен штамм с геном карбапенемазы, который относится к филогенетической линии, отличающейся повышенной патогенностью для человека. Во всех штаммах выявлены гены бета-лактамаз SHV-типа. Доля штаммов с генами бета-лактамаз CTX-M-типа составила 63,2%, OXA-типа – 68,4%, TEM-типа – 57,9%; в двух штаммах обнаружены гены металло-бета-лактамазы NDM-1. Практически во всех штаммах присутствовали гены нескольких типов бета-лактамаз одновременно. У всех 19 штаммов выявлены плазмид-ассоциированные детерминанты резистентности к фторхинолонам и ген *fosA*, обеспечивающий резистентность к фосфомицину.

Выводы. Проведенное исследование показало высокую гетерогенность штаммов *K. pneumoniae*. Преобладания какого-либо одного сиквенс-типа не обнаружено. Выявлены гипervирулентные штаммы сиквенс-типа ST23 и штаммы сиквенс-типов «высокого риска» (ST11 и ST147). В двух штаммах, относящихся к ST23, обнаружены бета-лактамазы blaSHV-1, blaCTX-M-55, blaOXA-1 и blaSHV-1, blaOXA-48 соответственно. Основным механизмом множественной устойчивости к антимикробным препаратам являлась продукция бета-лактамаз. Колистин был единственным препаратом, к которому сохраняли чувствительность все выделенные в центре штаммы *K. pneumoniae*.

Characterization of genetic diversity of the *Klebsiella pneumoniae* strains in a Moscow tertiary care center using next-generation sequencing

Skachkova T.S.¹, Shipulina O.Yu.¹, Shipulin G.A.¹, Shelenkov A.A.¹, Yanushevich Yu.G.¹, Mikhaylova Yu.V.¹, Zamyatin M.N.², Gusarov V.G.², Petrova N.V.², Lashenkova N.N.², Fomina V.S.², Shagin D.A.¹

¹ Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia

² National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov, Moscow, Russia

Contacts:
Tatyana S. Skachkova
E-mail: skachkova@inbox.ru

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, antimicrobial resistance, β -lactamase, next-generation sequencing, sequence type.

Objective. To study genetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains obtained in the National Medical and Surgical Center named after N.I. Pirogov (Moscow) using next-generation sequencing.

Materials and methods. A total of 19 isolates of *K. pneumoniae* were included in the study (18 – from patients and 1 – from nosocomial environment). The strains were isolated from January 30 to October 9, 2017 and phenotypically showed multi-drug resistance. DNA sequencing of the strains was performed on the Illumina HiSeq1500 instrument using the Illumina HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 and Illumina HiSeq Rapid SBS Kit v2 kits.

Results. A total of 9 different sequence types were found. One strain had a novel allelic profile. There was one hypervirulent strain of *K. pneumoniae* carrying a carbapenemase gene. The genes of beta-lactamase SHV were detected in each strain. The proportion of strains carrying CTX-M, OXA or TEM beta-lactamase genes was 63.2%, 68.4% and 57.9%, respectively. NDM-1 beta-lactamase genes were found in two strains. Nearly all strains had several types of beta-lactamase genes simultaneously. Plasmid-associated determinants of resistance to fluoroquinolones and the *fosA* gene providing resistance to fosfomycin were determined in 100% of strains.

Conclusions. There was a high genetic diversity of *K. pneumoniae* strains isolated in the Moscow tertiary care center. No prevalence of any sequence type has been identified. Hypervirulent ST23 clones and high-risk resistant ST11 and ST147 clones were detected. Two hypervirulent strains ST23 had blaSHV-1, blaCTX-M-55, blaOXA-1 and blaSHV-1, blaOXA-48, respectively. The main mechanism of multiple antimicrobial resistance was β -lactamase production. Colistin was the only drug to which all *K. pneumoniae* strains were susceptible.

Введение

Klebsiella pneumoniae, один из ведущих возбудителей нозокомиальных инфекций [1], входит в группу так называемых «ESKAPE»-патогенов – микроорганизмов, ассоциированных с повышенной антибиотикорезистентностью и представляющих собой серьезную проблему для здравоохранения [2]. *K. pneumoniae* распространена повсеместно и обладает выраженной способностью приобретать устойчивость к антимикробным препаратам (АМП). Неадекватная антибактериальная терапия у пациентов с нозокомиальными инфекциями кровотока, согласно исследованию, ухудшает прогноз заболевания и увеличивает большую летальность [3], поэтому назначение препаратов должно опираться на знание актуального профиля антибиотикорезистентности возбудителя в конкретном стационаре. Изучение генетического разнообразия *K. pneumoniae* позволит выявить основные механизмы устойчивости этого возбудителя и сформулировать рекомендации по рациональной антибиотикотерапии.

Традиционно *K. pneumoniae* относят к условно-патогенным бактериям, тем не менее способным вызывать целый ряд заболеваний: пневмонию, инфекции кожи и мягких тканей, инфекции мочевых путей и др. Кроме того, в литературе представлены данные о тяжелых инвазивных заболеваниях, вызванных *K. pneumoniae*. Первое подобное сообщение появилось в 1995 г. и было связано со случаями гнойных абсцессов печени [4]. Позже было показано, что тяжелые инвазивные формы вызваны так называемыми гипервирулентными штаммами [5]. В инвазивные инфекции были вовлечены *K. pneumoniae* клонального комплекса 23, включая ST23 и ST57 [6]. К гипервирулентным относят также ST86, ST375 и ST380, ST65 и ST375 [7], к сиквенс-типам «высокого риска» – ST11, ST15, ST37 и ST147 [8–17]. Это повсеместно распространенные генетические линии, несущие детерминанты резистентности. Особую опасность представляют собой гипервирулентные и одновременно множественно резистентные штаммы *K. pneumoniae* [18, 19]. Появление подобных штаммов уже зафиксировано в России: в диссертации Лев А.И. «Молекулярно-генетическая характеристика клинических штаммов *Klebsiella pneumoniae*: вирулентность и устойчивость к антимикробным препаратам» 2018 г. впервые говорится о наличии одновременно двух генов эпидемических бета-лактамаз, CTX-M-15 и OXA-48, в штаммах гипервирулентного сиквенс-типа ST23 *K. pneumoniae*.

Цель данного исследования – изучение генетического разнообразия штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в Национальном медико-хирургическом центре им. Н.И. Пирогова (г. Москва), с помощью секвенирования нового поколения.

Материалы и методы

Были проанализированы 19 штаммов *K. pneumoniae* (18 из различного биологического материала и 1 с объектов внутрибольничной среды), фенотипически проявляющих множественную резистентность к АМП. Все включенные в исследование штаммы были выделены в период

с 30 января по 9 октября 2017 г. в Национальном медико-хирургическом центре им. Н.И. Пирогова (далее – Центр). 8 штаммов были получены в отделении реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), 3 – в отделении медицинской реабилитации, по 2 штамма – в отделениях урологии, хирургии и гастроэнтерологии, 1 – в отделении рентгенохирургических методов диагностики и лечения, 1 – в отделении терапии. Из них 8 (42,1%) были выделены из мочевых путей; по 3 образца (15,8%) – из крови, из отделяемого в области операционной раны и из дыхательных путей; по одному образцу из смыва в ОРИТ и кала. В анализ не включались повторные изоляты, выделенные от одного пациента. Возраст пациентов составил от 22 до 96 лет (медиана – 59), среди них женщин – 10 (55,6%), мужчин – 8 (44,4%). Одиннадцать больных (61,1%) до госпитализации в многопрофильный медицинский центр находились на лечении в различных стационарах (Москва – 10, РФ – 2). 12 пациентов (66,7%) до поступления в центр имели факторы риска хронической колонизации полирезистентными микроорганизмами, такие как многократная госпитализация, длительная катетеризация мочевого пузыря, рецидивирующее течение мочекаменной болезни, хроническая задержка мочи.

Для бактериологического исследования взятие крови проводилось в стандартные флаконы со средами BACTEC™ Plus Aerobic/F Medium и BACTEC™ Plus Anaerobic/F Medium. В случае выявления роста микроорганизмов в крови проводили их идентификацию и определение чувствительности к АМП на бактериологическом автоматизированном анализаторе VITEK 2 Compact (bioMérieux, Франция).

Геномная ДНК бактерий выделялась с использованием набора Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits согласно протоколу производителя. Приготовление образцов ДНК для дальнейшего секвенирования осуществлялось с использованием Illumina Nextera DNA Library Prep Kit и Illumina Nextera Index Kit. Секвенирование проводилось на приборе Illumina HiSeq 1500 с использованием наборов Illumina HiSeq PE Rapid Cluster Kit v2 и Illumina HiSeq Rapid SBS Kit v2.

Определение принадлежности штамма к сиквенс-типу осуществлялось путем сравнения результатов секвенирования с последовательностями, приведенными в международной базе данных Института Пастера <http://bigsdbs.pasteur.fr/klebsiella> [20–22]. Поиск детерминант антибиотикорезистентности проводился с помощью ресурса ResFinder 3.0 [23]. Поиск плазмид выполнялся с помощью ресурса PlasmidFinder 1.3 [24].

Для построения core-генома использовалась программа Roary (<https://sanger-pathogens.github.io/Roary/>) [25]. Предварительная аннотация генов для собранных геномов *K. pneumoniae* выполнялась с помощью программы Prokka (www.vicbioinformatics.com/software.prokka.shtml). Для построения деревьев по полученным данным использовалась программа FastTree (www.microbesonline.org/fasttree/). Визуализация деревьев проводилась с помощью программы TreeGraph (<http://treegraph.bioinfweb.info/>) [26].

Результаты и обсуждение

Схема мультилокусного сиквенс-типирования (MLST) для *K. pneumoniae* была разработана в 2005 г. [20]. Данный метод основан на определении нуклеотидной последовательности фрагментов 7 генов: *proB* (бета-субъединицы РНК-полимеразы), *gapA* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), *mdh* (малатдегидрогеназы), *pgi* (фосфоглюкозы-изомеразы), *rhoE* (фосфорина E), *infB* (фактора инициации трансляции 2), *tonB* (белка TonB), и сравнении последовательностей с имеющимися в постоянно пополняющейся международной базе данных [20]. Следует отметить, что на июль 2018 г. в базе содержались сведения о 3376 сиквенс-типах *K. pneumoniae*. В проведенном нами исследовании с помощью секвенирования нового поколения установлено, что все штаммы относились к 9 различным сиквенс-типам (Таблица 1). Один из исследуемых штаммов имел новый аллельный профиль, не представленный в базе данных. Преобладания какого-либо сиквенс-типа выявлено не было. Пять штаммов относились к ST395, 3 штамма – к ST377, 3 – к ST147, 2 – к ST11, 2 – к ST23; было выявлено по одному штамму каждого из следу-

ющих сиквенс-типов: ST29, ST35, ST453. На основании анализа нуклеотидной последовательности 4052 генов, выбранных для филогенетического анализа, образец P-45 с новым аллельным профилем, не имеющим аналогов в международной базе данных, образует общий кластер с образцом P-69, относящимся к ST29 (Рисунок 1).

В данном исследовании у двух пациентов были выявлены гипервирулентные штаммы ST23, выделенные из крови и эндотрахеального аспирата. В гипервирулентных штаммах обнаружены бета-лактамазы CTX-M и OXA-типа. Образец P-140 относится к филогенетической группе, отличающейся повышенной патогенностью для человека (ST23), и имеет ген карбапенемазы; этот штамм был выделен из крови женщины 40 лет с сепсисом. Кроме того, были выявлены так называемые сиквенс-типы «высокого риска»: ST11 – у двух пациентов в моче и крови, ST147 – у двух пациентов в моче и кале.

Для исследуемых образцов было построено филогенетическое дерево (Рисунок 1). Число генов, по которым проводился анализ для 19 геномов, составило 4052. Данные гены присутствовали во всех штаммах, степень подобия между штаммами для каждого из них

Таблица 1. Характеристики штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в многопрофильном медицинском центре г. Москвы

№ образца	Сиквенс-тип	Кол-во изолятов	Бета-лактамазы	Плазмиды	Биологический материал/источник
P-68 P-117	ST11	2	blaSHV-11, blaOXA-1 blaTEM-1B; blaCTX-M-15; blaSHV-11	Col(BS512); IncR; IncFIB(K); IncFII(K) IncL/M; IncR	Моча Кровь
P-108 P-140	ST23	2	blaSHV-1; blaCTX-M-55; blaOXA-1 blaSHV-1; blaOXA-48	ColRNAI; IncFII(K); IncFII; IncQ1; IncFIA(HI1) ColRNAI; IncFII(K); IncFIA(HI1); IncL/ M(pOXA-48)	Эндотрахеальный аспират Кровь из периферической вены
P-69	ST29	1	blaTEM-1B, blaSHV-83, blaCTX-M-14	IncFII; IncFIB(K)	Мокрота
P-115	ST35	1	blaSHV-33	–	Моча
P-99 P-142 P-29	ST147	3	blaCTX-M-15; blaOXA-9; blaSHV-11; blaTEM-1B; blaOXA-1; blaNDM-1 blaCTX-M-15; blaOXA-9; blaSHV-11; blaTEM-1B; blaOXA-1; blaNDM-1 blaOXA-9, blaTEM-1B, blaCTX-M-15, blaOXA-48, blaSHV-11, blaOXA-1	IncFII(K); IncFIB(pQil); FIA(pBK30683); IncHI1B IncFII(K); IncFIB(pQil); FIA(pBK30683); IncHI1B Col(BS512); IncFIB(Mar); IncN; IncHI1B; IncR	Моча Кал Аспират
P-21 P-26 P-38	ST377	3	blaOXA-48; blaCTX-M-15; blaSHV-110; blaOXA-1 blaOXA-48; blaCTX-M-15; blaSHV-110; blaOXA-1 blaOXA-48; blaCTX-M-15; blaSHV-110; blaTEM-1B	IncQ1; IncHI1B; ColRNAI; IncL/M(pOXA-48) IncQ1; IncHI1B; ColRNAI; IncL/M(pOXA-48) ColRNAI; IncHI1B; IncL/M; IncFIB(Mar)	Смыв Раневое отделяемое Моча
P-75 P-133 P-134 P-137 P-36	ST395	5	blaCTX-M-15; blaSHV-11; blaTEM-1B; blaOXA-1 blaTEM-1B; blaSHV-11 blaSHV-11; blaTEM-1B; blaOXA-48; blaCTX-M-15; blaOXA-1 blaSHV-11; blaCTX-M-15; blaTEM-1B; blaOXA-1 blaCTX-M-15, blaSHV-11, blaTEM-1B, blaOXA-1	IncR; Col(BS512); IncFII IncR IncX4; IncHI1B; IncFIB(Mar); IncR; IncL/M(pOXA-48) IncFIB(Mar); IncHI1B; IncR IncR	Кровь Моча Моча Моча Моча
P-6	ST453	1	blaSHV-1	Col(BS512); IncFIA(HI1); IncFII(K); IncFIB(K)	Раневое отделяемое
P-45	Неизвестно	1	blaSHV-11	–	Моча

составляла не менее 90%. Результаты построения филогенетического дерева свидетельствуют о генетической неоднородности исследуемых штаммов, при этом были выявлены образцы с генетически близкими нуклеотидными последовательностями. Полученные данные могут указывать на эпидемиологическую связь между образцами. Например, образцы P-21 и P-26 образуют общий кластер. Зная, что они выделены в одном отделении с разницей в 2 недели, с большой долей вероятности можно говорить о том, что образцы эпидемиологически связаны друг с другом. Оба образца относятся к ST377. Основываясь только на данных MLST, можно было бы предположить полную идентичность P-21 и P-26 с образцом P-38. Однако на филогенетическом дереве мы видим, что нуклеотидная последовательность P-38 отличается от P-21 и P-26. Это же подтверждают и результаты типирования плазмид, а также данные о выявленных бета-лактамазах. В образцах P-21 и P-26 обнаружены плазмиды IncQ1, IncHI1B, ColRNAI и IncL/M(pOXA-48). В образце P-38 дополнительно присутствует плазида IncFIB(Mar), при этом IncQ1 не выявлена. В P-21 и P-26 идентифицированы бета-лактамазы blaOXA-48, blaCTX-M-15, blaSHV-110 и blaOXA-1. В образце P-38 дополнительно обнаружена blaTEM-1B, а blaOXA-1 отсутствует. Таким образом, выявление плазмид и локусов антибиотикорезистентности может служить дополнительным источником данных для внутривидовой дифференциации штаммов при расшифровке локальных вспышек.

Практически во всех включенных в анализ штаммах были обнаружены гены бета-лактамаз нескольких типов одновременно. Во всех штаммах присутствовали гены бета-лактамаз SHV-типа. Как известно, SHV-1 является хромосомно-кодируемой и обеспечивает устойчивость *K. pneumoniae* к ампициллину [27]. Доля штаммов с генами бета-лактамаз CTX-M-типа составила 63,2%, OXA-типа – 68,4%, TEM-типа – 57,9%. В двух штаммах присутствовали гены металло-бета-лактамазы (МБЛ) NDM-1. Идентифицированные CTX-M бета-лактамазы относились к двум генетически родственным группам – CTX-M-14 и CTX-M-15. Среди бета-лактамаз SHV-типа были выявлены SHV1, SHV11, SHV33, SHV83 и SHV110. Чаще всего встречались SHV11 – у 11 штаммов. Также был обнаружен ряд ферментов OXA-типа – подгруппы OXA-1, OXA-9 и OXA-48. Среди ферментов TEM-типа встречался только один вариант – TEM-1B (Таблица 1).

Как известно, продукция бета-лактамаз расширенного спектра обеспечивает резистентность практически ко всем бета-лактамам антибиотикам (пенициллинам, цефалоспорином), кроме карбапенемов [28]. Отдельные представители разных молекулярных классов бета-лактамаз обладают способностью гидролизовать карбапенемы, однако наиболее распространенными и клинически важными в настоящее время являются сериновые карбапенемазы KPC (молекулярный класс A), МБЛ (молекулярный класс B) и отдельные OXA-ферменты (молекулярный класс D) – подгруппы OXA-23, OXA-40, OXA-51, OXA-58 [29]. На сегодняшний день выявление и дифференциация карбапенемаз становятся необходимыми для эффективного применения новых АМП – ком-

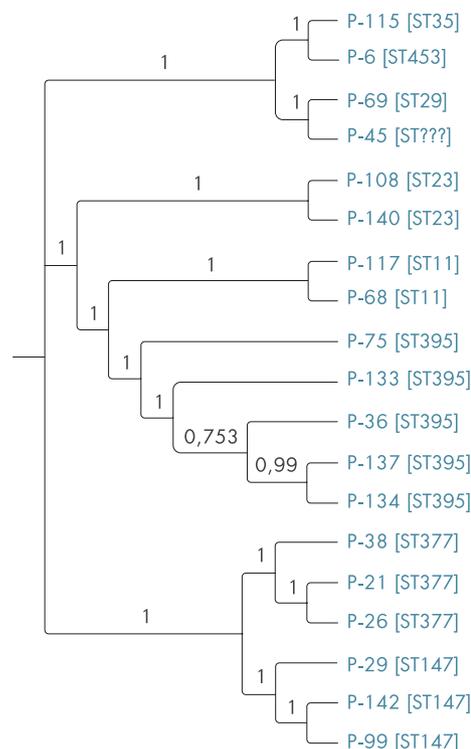


Рисунок 1. Филогенетическое дерево core-геномов исследованных штаммов *K. pneumoniae*

бинаций бета-лактамов с ингибиторами бета-лактамаз (цефтазидим/авибактам, азтреонам/авибактам и др.). Так, авибактам эффективно ингибирует карбапенемазы групп KPC и OXA-48, но не ингибирует МБЛ [30, 31]. При этом для МБЛ NDM-1 характерна высокая скорость глобального распространения, а расположение гена NDM на плазмиде расширяет возможности внутри- и межвидового переноса. Карбапенемаза NDM-1 впервые была выделена в 2008 г. у пациента с инфекцией мочевых путей в больнице г. Нью-Дели [32, 33]. Сообщение о первом случае выделения штамма *K. pneumoniae*, продуцирующего карбапенемазу NDM-1, у пациента в России (Санкт-Петербург) появилось в 2012 г. [34]. Изоляты продуцентов NDM-1 относились к одному сиквенс-типу *K. pneumoniae* – ST340 [34]. Выделенные в проведенном нами исследовании 2 изолята, продуцирующие карбапенемазу NDM-1, относились к сиквенс-типу ST147 и обладали сходным генетическим профилем антибиотикорезистентности. Фенотипически микроорганизмы были устойчивы к цефалоспорином и карбапенемам, но сохраняли чувствительность к колистину. Изоляты были выделены от двух пациентов ОПИТ (из мочи и кала) на 30-ые и 100-ые сутки госпитализации. Следует отметить, что ранее уже был описан случай обнаружения изолятов ST147 с карбапенемазой NDM-1 у пациента с травмой (раневая инфекция после открытого перелома голени) в Санкт-Петербурге [35].

Первые сообщения об угрозе плазмид-ассоциированной резистентности грамотрицательных бактерий к фторхинолонам появились еще в 2006 г. [36]. Серьезную опасность, по мнению исследователей, представляло бы-

строе распространение генов белков Qпг и гена, кодирующего производную аминогликозид ацетилтрансферазы *aac(6')Ib-cr*. Кроме того, плазмид-ассоциированными являются гены *oqxAB*, обеспечивающие устойчивость к ципрофлоксацину [37]. Во всех 19 исследованных нами штаммах *K. pneumoniae* были найдены плазмид-ассоциированные детерминанты резистентности к фторхинолонам. В 5 штаммах обнаружены одновременно *oqxA*, *oqxB*, *aac(6')Ib-cr* и *QnrS1*, в 6 штаммах – *oqxA*, *oqxB*, *aac(6')Ib-cr*, в 5 – *oqxA* и *oqxB*, в 2 – *oqxA*, *oqxB* и *QnrS1*, в 1 – *QnrS1*. Из-за малого размера выборки сложно оценить вклад отдельных генетических конструкций в фенотипические проявления антибиотикорезистентности. При определении чувствительности к фторхинолонам с использованием микробиологического анализатора VITEK 2 Compact у 15 штаммов выявлена устойчивость к ципрофлоксацину и левофлоксацину, а 4 штамма фенотипически были чувствительны к данным АМП.

В проведенном нами исследовании с помощью секвенирования нового поколения во всех 19 штаммах *K. pneumoniae* был обнаружен ген *fosA*, отвечающий за устойчивость к фосфомицину, поэтому данный антибиотик не может быть рекомендован для использования в центре в качестве препарата резерва для лечения инфекций, вызванных карбапенеморезистентными штаммами бактерий [38, 39, 40].

Единственным препаратом, к которому сохраняли чувствительность все выделенные в центре штаммы *K. pneumoniae*, являлся колистин: локусов резистентности к данному АМП выявлено не было. Однако следует отметить, что случаи появления колистинорезистентных штаммов уже описаны в литературе [41, 42], показано увеличение летальности среди пациентов, инфицированных устойчивыми к данному препарату *K. pneumoniae* [43], поэтому постоянный мониторинг ситуации необходим в каждом конкретном стационаре.

Литература

1. Sukhorukova M.V., Edelstein M.V., Skleynova E.Yu., et al. Antimicrobial resistance of nosocomial Enterobacteriaceae isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study «MARATHON» 2013-2014. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija*. 2017;19(1):49-56. Russian. (Сухорукова М.В., Эйдельштейн М.В., Скленова Е.Ю. и соавт. Антибиотикорезистентность нозокомиальных штаммов Enterobacteriaceae в стационарах России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «Марафон» 2013-2014. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2017;19(1):49-56.).
2. Boucher H.W., Talbot G.H., Bradley J.S., et al. 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
3. Ibrahim E.H., Sherman G., 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;118:146-155. DOI: 10.1378/chest.118.1.146
4. Chang F.Y., Chou M.Y. Comparison of pyogenic liver abscesses caused by *Klebsiella pneumoniae* and non-*K. pneumoniae* pathogens. *J Formos Med Assoc*. 1995;94:232-237.
5. Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence*. 2013;4(2):107-118. DOI: 10.4161/viru.22718
6. Luo Y., Wang Y., Ye L., Yang J. Molecular epidemiology and virulence factors of pyogenic liver abscess causing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(11):818-824. DOI:10.1111/1469-0691.12664
7. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(11):1812-1820. DOI: 10.3201/eid2011.140206
8. Yan J.J., Wang M.C., Zheng P.X., Tsai L.H., Wu J.J. Associations of the major international high-risk resistant clones and virulent clones with specific ompK36 allele groups in *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *New Microbes New Infect*. 2015;5:1-4. DOI: 10.1016/j.nmni.2015.01.002
9. Woodford N., Turtton J.F., Livermore D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35:736-755. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00268.x
10. Damjanova I., Tóth A., Pászti J., et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTXM-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005 – the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother*. 2008;62(5):978-985. DOI: 10.1093/jac/dkn287
11. Samuelsen, Toleman M.A., Hasseltvedt V., et al. Molecular characterization of VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Scandinavia reveals genetic relatedness with international clonal

- complexes encoding transferable multidrug resistance. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(12):1811-1816. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03532.x
12. Breurec S., Guessennd N., Timinouni M., et al. *Klebsiella pneumoniae* resistant to third-generation cephalosporins in five African and two Vietnamese major towns: multiclonal population structure with two major international clonal groups, CG15 and CG258. *Clin Microbiol Infect.* 2013; 19(4):349-355. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03805.x
 13. Lee M.Y., Ko K.S., Kang C.I., et al. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(2):160-163. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.03.020
 14. Chiu S.K., Wu T.L., Chuang Y.C., et al. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS One.* 2013;8(7):e69428. DOI:10.1371/journal.pone.0069428
 15. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(2):307-312. DOI: 10.1093/jac/dkq431
 16. Ko K.S., Lee J.Y., Baek J.Y., et al. Predominance of an ST11 extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol.* 2010;59:822-828. DOI:10.1099/jmm.0.018119-0
 17. Illiaquer M., Caroff N., Bémer P., et al. Occurrence and molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* ST37 clinical isolates producing plasmid-mediated AmpC recovered over a 3-year period. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012;74(1):95-97. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.05.023
 18. Cejasa D., Canigiab L.F., Cruz G.R. First Isolate of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 23 from the Americas. *J. Clin. Microbiol.* 2014;52(9):3483-3485. DOI: 10.1128/JCM.00726-14
 19. Surgers L., Boyd A., Girard P.M., Arlet G., Decre D. ESBL-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(9):1687-1688. DOI: 10.3201/eid2209.160681
 20. Diancourt L., Passet V., Verhoef J., Grimont P.A., Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005;43(8):4178-4182. DOI: 10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005
 21. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., et al. Genomic definition of Hypervirulent and Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clonal Groups. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(11):1812-20. DOI: 10.3201/eid2011.140206
 22. Larsen M.V., Cosentino S., Rasmussen S. Multilocus Sequence Typing of Total Genome Sequenced Bacteria. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1355-1361. DOI: 10.1128/JCM.06094-11
 23. Zankari E., Hasman H., Cosentino S., et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(11):2640-2644. DOI: 10.1093/jac/dks261
 24. Carattoli A., Zankari E., Garcia-Fernandez A., et al. PlasmidFinder and pMLST: *in silico* detection and typing of plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):3895-903. DOI: 10.1128/AAC.02412-14
 25. Page A.J., Cummins C.A., Hunt M., et al. Roary: Rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3691-3693. DOI: 10.1093/bioinformatics/btv421
 26. Stöver B.C., Müller K.F. TreeGraph 2: Combining and visualizing evidence from different phylogenetic analyses. *BMC Bioinformatics.* 2010;11:7. DOI: 10.1186/1471-2105-11-7
 27. Hennequin C., Robin F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016;35(3):333-341. DOI: 10.1007/s10096-015-2559-7
 28. Stratchounski L.S. Extended-Spectrum β -Lactamases – Rapidly spreading and underestimated problem. *Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija.* 2005;7(1):92-96. Russian. [Страчунский Л.С. β -лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия.* 2005;7(1):92-96.].
 29. Tapalski D.V., Osipov V.A., Zhavoronok S.V. Carbapenemases of gram-negative pathogens: spread and methods of detection. *Medicinskij zhurnal.* 2012;2(40):1015. Russian. [Тапальский Д.В., Осипов В.А., Жаворонок С.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции. *Медицинский журнал.* 2012;2(40):1015.].
 30. Carmeli Y., Armstrong J., Laud P.J., et al. Ceftazidime-avibactam or best available therapy in patients with ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* complicated urinary tract infections or complicated intra-abdominal infections (REPRISE): a randomised, pathogen-directed, phase 3 study. *Lancet Infect Dis.* 2016;16(6):661-673. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30004-4
 31. Papp-Wallace K.M., Bonomo R.A. New β -Lactamase Inhibitors in the Clinic. *Infect Dis Clin North Am.* 2016;30(2):441-464. DOI: 10.1016/j.idc.2016.02.007
 32. Yong D., Toleman M.A., Christian G.G., et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5046-5054. DOI: 10.1128/AAC.00774-09
 33. Kumarasamy K.K., Toleman M.A., Walsh T.R., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(9):597-602. DOI: 10.1016/S1473-3099(10)70143-2
 34. Ageevets V.A., Partina I.V., Lisitsyna E.S., et al. The first detection of metallo-beta-lactamase NDM-type multidisciplinary hospital in Russia. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal.* 2012;(4):43-45. Russian. [Агеевец В.А., Партина И.В., Лисицына Е.С. и соавт. Первое обнаружение металло-бета-лактамазы NDM-типа в многопрофильном стационаре в России. *Медицинский академический журнал.* 2012;(4):43-45.].
 35. Shabanova V.V., Krasnova M.V., Bozhkova S.A., et al. The first case of isolation of *Klebsiella pneumoniae* ST147, producing NDM-1 carbapenemase, in trauma and orthopedic hospital in Russia. *Traumatalogija i ortopedija Rossii.* 2015;(2):90-98. [Шабанова В.В., Краснова М.В., Божкова С.А. и соавт. Первый случай выявления в России *Klebsiella pneumoniae* ST147, продуцирующей NDM-1 карбапенемазу, в травматологическо-ортопедическом стационаре. *Травматология и ортопедия России.* 2015;(2):90-98.].
 36. Robicsek A., Jacoby G.A., Hooper D.C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. *Lancet Infect Dis.* 2006;6(10):629-640. DOI: 10.1016/S1473-3099(06)70599-0
 37. Jacoby G.A. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. In: Mayers D., Sobel J., Ouellette M., Kaye K., Marchaim D., Eds. *Antimicrobial Drug Resistance.* Springer, Cham. 2017. 265-268 pp. DOI 10.1007/978-3-319-46718-4
 38. Kozlov S.N., Stratchounski L.S. *Modern Antimicrobial Chemotherapy: A Guide for Physicians.* M., 2009. Russian. [Козлов С.Н., Страчунский Л.С. *Современная антимикробная химиотерапия: Руководство для врачей.* М., 2009.].
 39. Castaneda-Garcia A., Blazquez J., Rodriguez-Rojas A. Molecular mechanisms and clinical impact of acquired and intrinsic fosfomycin resistance. *Antibiotics.* 2013;2(2):217-236. DOI 10.3390/antibiotics2020217
 40. Silver L.L. Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(2):a025262. DOI: 10.1101/cshperspect.a025262
 41. Marchaim D., Chopra T., Jason M.P., et al. Outbreak of Colistin-Resistant, Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Metropolitan Detroit, Michigan. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:593-599. DOI: 10.1128/AAC.01020-10
 42. Antoniadou A., Kontopidou F., Poulakou G., et al. Colistin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* emerging in intensive care unit patients: first report of a multiclonal cluster. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(4):786-790. DOI:10.1093/jac/dkl562
 43. Capone A., Giannella M., Fortini D., et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(1):E23-E30. DOI:10.1111/1469-0691.12070