

# Определение чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов рода *Klebsiella* методом MALDI-TOF MS

А.А.Самойлова<sup>1</sup>, И.В.Лихачёв<sup>1</sup>, Е.В.Зуева<sup>1</sup>, Л.А.Краева<sup>1,2</sup>, Е.В.Рогачёва<sup>1</sup>, Н.В.Михайлов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация;

<sup>2</sup>ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова», Санкт-Петербург, Российская Федерация

Современная микробиологическая диагностика инфекций, обусловленных *Klebsiella* spp., должна включать в себя выделение, идентификацию возбудителя и максимально быстрое определение чувствительности выделенного изолята к антимикробным препаратам (АМП). В ходе работы выполнена оценка перспективы использования MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения чувствительности штаммов *Klebsiella* spp. к АМП. По результатам масс-спектрометрии штаммов *Klebsiella* spp. на основе масс-спектров и данных о чувствительности исследуемых штаммов к АМП проведен кластерный анализ методом UPGMA, проанализированы полученные дендрограммы. Путем сопоставления масс-спектров чувствительной и резистентной культур при различных концентрациях АМП с помощью предложенного авторами метода выделены участки спектра с наибольшей вероятностью расположения маркеров антибиотикорезистентности. Таким образом, на основании проделанной работы может быть сформировано новое направление в оценке чувствительности *Klebsiella* spp. к антимикробным препаратам при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии.

**Ключевые слова:** антибиотикорезистентность, *Klebsiella* spp., MALDI-TOF масс-спектрометрия

**Для цитирования:** Самойлова А.А., Лихачёв И.В., Зуева Е.В., Краева Л.А., Рогачёва Е.В., Михайлов Н.В. Определение чувствительности к антимикробным препаратам микроорганизмов рода *Klebsiella* методом MALDI-TOF MS. Бактериология. 2020; 5(3): 8–13. DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-8-13

## Determination of sensitivity of microorganisms of the *Klebsiella* genus to antimicrobial drugs by the MALDI-TOF MS method

A.A.Samoilova<sup>1</sup>, I.V.Likhachev<sup>1</sup>, E.V.Zueva<sup>1</sup>, L.A.Kraeva<sup>1,2</sup>, E.V.Rogacheva<sup>1</sup>, N.V.Mikhailov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint Petersburg, Russian Federation;

<sup>2</sup>S.M.Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg, Russian Federation

Actual microbiological diagnostics of infections caused by *Klebsiella* spp. should include isolation of the strain, its identification and fastest possible determination of the pathogen susceptibility to antimicrobial agents. We evaluated the prospects of using MALDI-TOF mass spectrometry to determine the susceptibility of *Klebsiella* spp. strains to antimicrobial agents. According to the results of mass spectrometry *Klebsiella* spp. strains analysis, we carried out cluster analysis by the UPGMA method based on mass spectra and data on the susceptibility of the studied strains to antimicrobial agents, and then studied the obtained dendrograms. We identified the areas with the highest probability of the location of antibiotic resistance markers by comparing the mass spectra of susceptible and resistant microorganisms at different concentrations of antimicrobial agents. Thus, using MALDI-TOF mass spectrometry, a new direction in assessing the susceptibility of *Klebsiella* spp. to antimicrobial agents can be formed.

**Key words:** antibiotic resistance, *Klebsiella* spp., MALDI-TOF mass spectrometry

**For citation:** Samoilova A.A., Likhachev I.V., Zueva E.V., Kraeva L.A., Rogacheva E.V., Mikhailov N.V. Determination of sensitivity of microorganisms of the *Klebsiella* genus to antimicrobial drugs by the MALDI-TOF MS method. Bacteriology. 2020; 5(3): 8–13. (In Russian). DOI: 10.20953/2500-1027-2020-3-8-13

### Для корреспонденции:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинских наук, заведующая лабораторией медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», профессор кафедры микробиологии ФГБВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова»

Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

Телефон: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

Статья поступила 10.09.2020 г., принята к печати 12.10.2020 г.

### For correspondence:

Liudmila A. Kraeva MD, PhD, DSc, head of the laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute, professor of the department of microbiology, S.M.Kirov Military Medical Academy

Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation

Phone: (812) 233-2092

E-mail: lykraeva@yandex.ru

The article was received 10.09.2020, accepted for publication 12.10.2020

**М**икроорганизмы рода *Klebsiella* являются одними из наиболее распространенных возбудителей нозокомиальных инфекций [1] и входят в группу ESKAPE-патогенов – микроорганизмов, ассоциированных с повышенной антибиотикорезистентностью и представляющих собой серьезную проблему для здравоохранения [2, 3].

Традиционно представителей рода относят к условно-патогенным бактериям, однако данные микроорганизмы могут вызывать целый ряд различных инфекционных заболеваний: инфекции мочевыводящих и дыхательных путей, инфекции кожи и мягких тканей, острые кишечные инфекции и инфекции мочевых путей, септицемии и т.д. [4, 5]. Штаммы *Klebsiella* spp., устойчивые к антимикробным препаратам (АМП), представляют серьезную проблему для практического здравоохранения [6, 7] и отнесены ВОЗ к группе возбудителей с «критически высоким уровнем приоритетности» [8]. Для инфекций, вызванных микроорганизмами рода *Klebsiella*, характерно тяжелое течение заболеваний. При инфекциях кровотока в течение месяца погибает 20% больных [9], а при нозокомиальных пневмониях – 50% [10].

Высокий уровень антибиотикорезистентности, а также способность штаммов *Klebsiella* spp. вызывать внутрибольничные вспышки свидетельствуют о необходимости получения информации о чувствительности клинического изолята в кратчайшие сроки для проведения адекватного этиотропного лечения [11, 12].

В настоящее время наиболее оптимальным методом для рутинной идентификации микроорганизмов рода *Klebsiella* является MALDI-TOF (Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight – времяпролетная лазерная десорбционная ионизация, ассоциированная с матрицей) масс-спектрометрия, которая позволяет проводить типирование штаммов, относящихся к различным филогенетическим группам [13–15].

С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии можно осуществлять анализ различных биополимеров: протеинов, липидов, нуклеиновых кислот, полисахаридов, входящих в состав бактериальной клетки. Большинство таких клеточных компонентов обладают уникальными спектральными характеристиками, которые позволяют идентифицировать

их в качестве маркеров, что является причиной интереса медицинской микробиологии к данной технологии [16]. MALDI-TOF позволяет осуществлять не только видовую идентификацию микроорганизмов, но и определять чувствительность культуры к АМП, а также выявлять факторы патогенности [16].

**Цель исследования:** оценка возможности использования MALDI-TOF масс-спектрометрии для прогнозирования устойчивости *Klebsiella* spp. к различным АМП.

## Материалы и методы

В ходе выполнения работы исследовали 195 клинических изолятов *Klebsiella* spp., которые были выделены из проб биологического материала от госпитализированных пациентов медицинских учреждений Санкт-Петербурга. Идентификацию данных изолятов до вида осуществляли при помощи MALDI-TOF MS с использованием спектрометра «Microflex LRF» и программного обеспечения «Biotyper RTC» (Bruker Daltonik, Германия). Значения Score  $\geq 2,0$  использовали в качестве критерия надежной видовой идентификации.

Определение чувствительности клинических изолятов к АМП проводили диско-диффузионным методом в соответствии с клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2018-03) на среде агар Мюллера–Хинтон («Himedia», Индия). Клинические категории чувствительности исследуемых изолятов определяли в соответствии с рекомендациями EUCAST раздела «Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters» (версия 10.0, с 01.01.2020) и российскими клиническими рекомендациями «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2018-03).

В ходе определения чувствительности изолятов использовали 19 АМП, принадлежащих к следующим классам антибиотиков: аминогликозиды, хинолоны, бета-лактамы, в том числе пенициллины, цефалоспорины, карбапенемы.

Для определения связи между кластерами была проведена иерархическая кластеризация полученных спектров с использованием алгоритма попарного арифметического

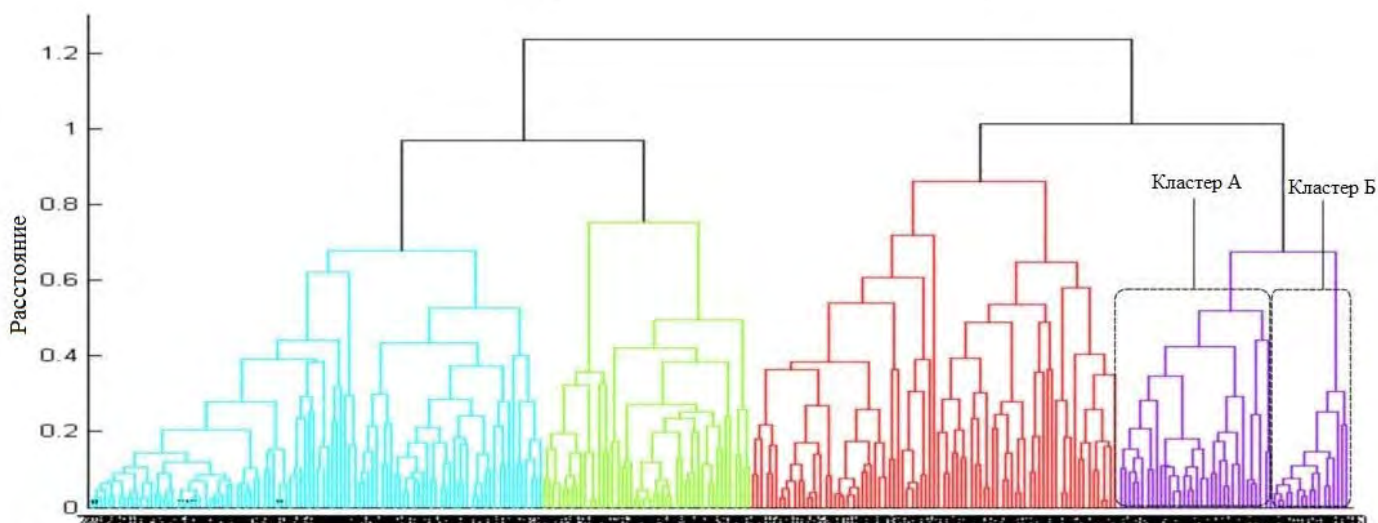


Рис. 1. Кластеризация штаммов на основе спектров.

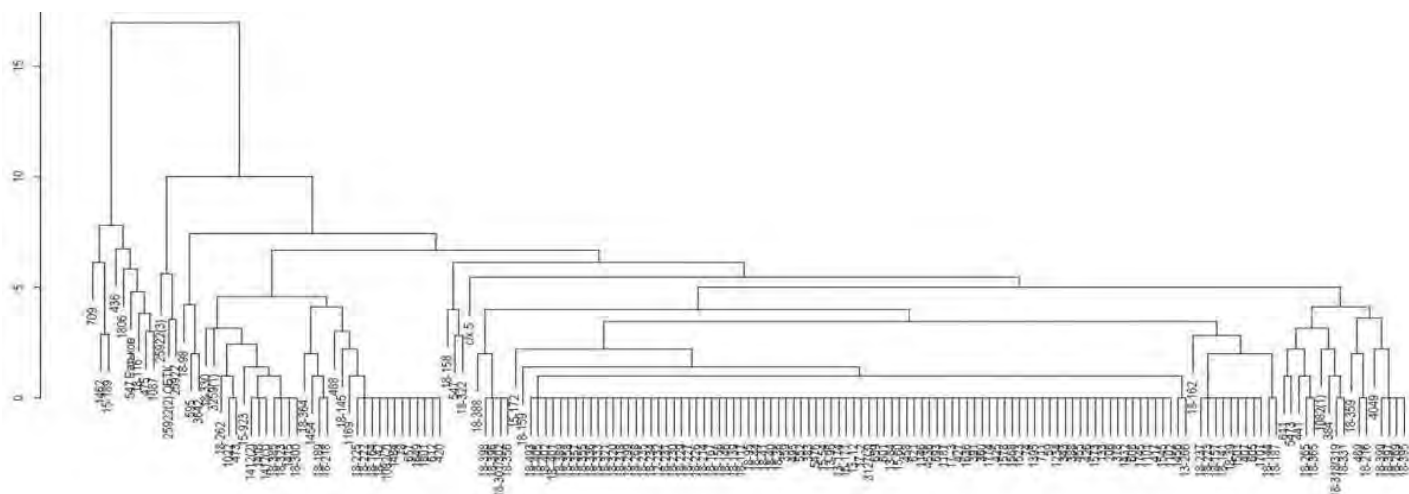


Рис. 2. Кластеризация штаммов на основании антибиотикочувствительности.

среднего (UPGMA). В работе использовали коэффициент корреляции Пирсона между переменными значениями интенсивности пиков в спектральных профилях в качестве меры расстояния между отдельными масс-спектрами.

Кластерный анализ и построение дендрограмм осуществляли с использованием инструментов MALDI «Biotyper RTC» 3.1 («Bruker Daltonik», Германия), «BioNumerics 6.6» («Applied Maths», Бельгия), языка программирования «R».

### Результаты и обсуждение

По результатам масс-спектрометрии штаммов *Klebsiella* spp. проведен кластерный анализ методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA).

Как видно из рис. 1, масс-спектры штаммов сформировали 4 крупных кластера, разделенных на более мелкие. При

этом штаммы, схожие по признаку чувствительности к АМП, объединились в группу только в случае кластера А, который включал штаммы, резистентные ко всем исследуемым АМП, и кластера Б, включившего чувствительные штаммы (расстояние между кластерами – 0,65).

Группы, полученные в результате кластеризации, также проведенной методом невзвешенного попарного среднего (UPGMA) по признаку чувствительности к АМП (рис. 2), не были идентичны группам, кластеризованным по спектральным характеристикам. Причина различий заключалась в том, что кластеризация осуществляется по всем участкам спектра, а не только по тем, которые могут быть связаны с устойчивостью микроорганизма к АМП. Таким образом, предсказать антибиотикорезистентность только на основании кластеризации «сырых спектров» («raw spectra») исследуемых штаммов не представляется возможным.

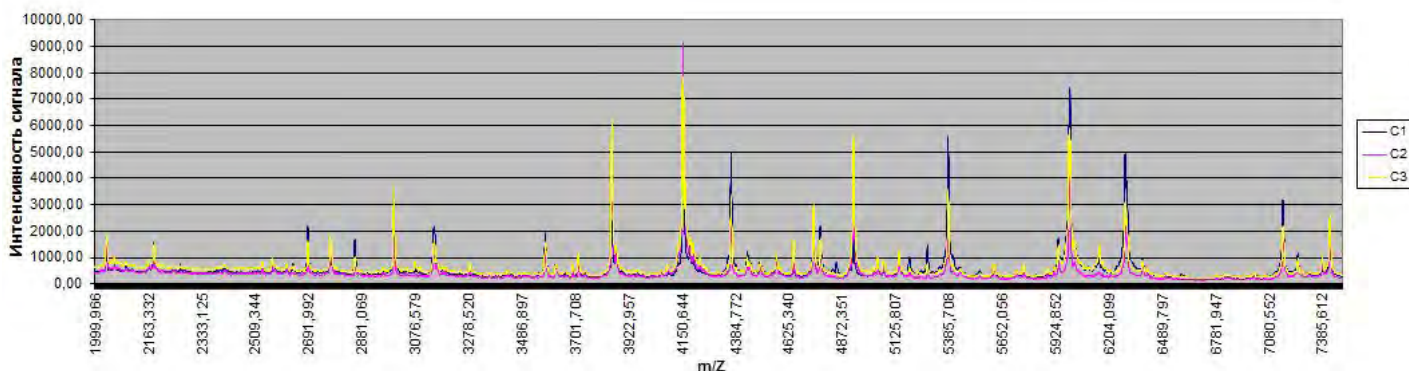


Рис. 3. Масс-спектры чувствительного штамма *Klebsiella* spp., полученные с участков с различными концентрациями антибиотика.

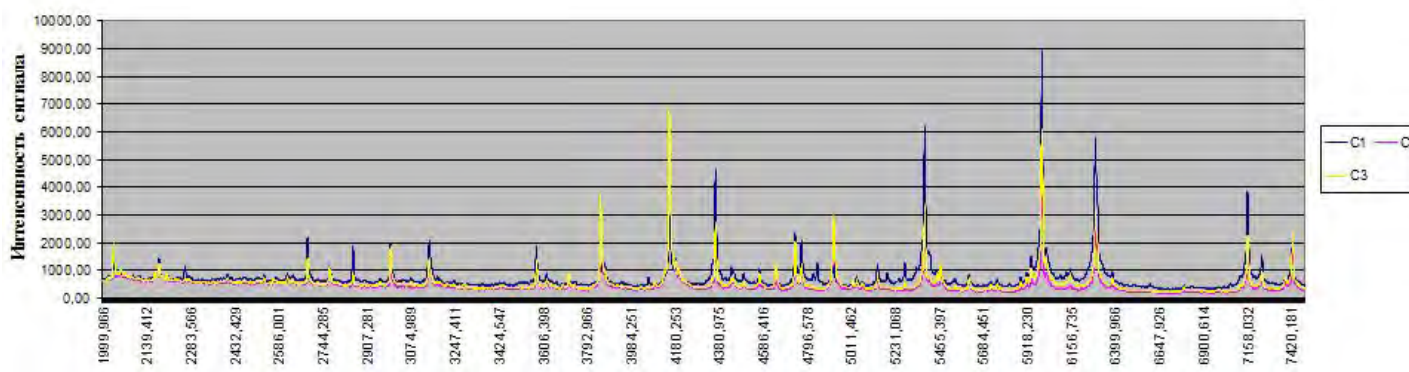


Рис. 4. Масс-спектры резистентного штамма *Klebsiella* spp., полученные с участков с различными концентрациями антибиотика.

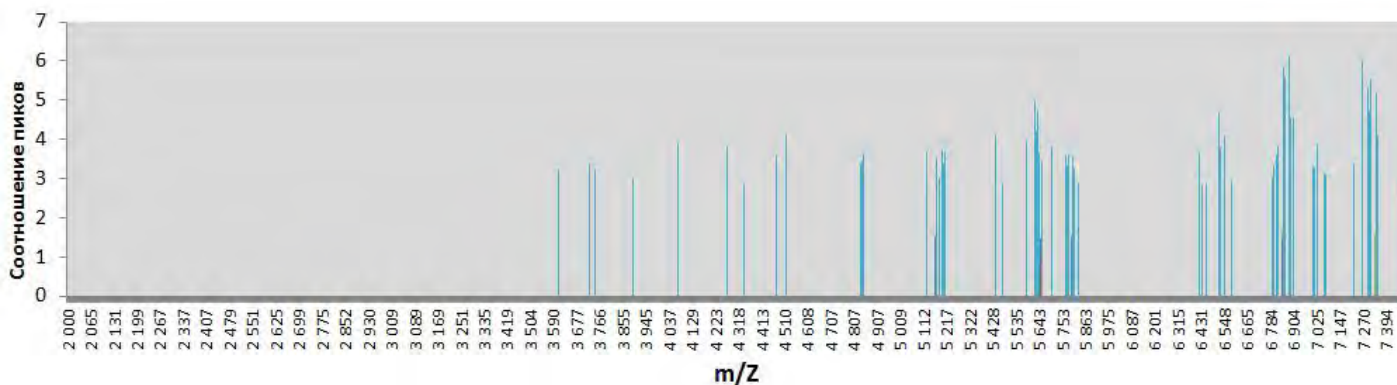


Рис. 5. Наиболее вероятные области локализации пиков, ответственных за резистентность к АМП.

Прогнозирование наличия какого-либо признака исследуемого изолята по масс-спектру возможно только при нахождении «маркерных пиков» – участков спектра, достоверно связанных с данным признаком (в нашем случае признак – чувствительность к АМП). Мы предлагаем алгоритм поиска наиболее вероятных участков расположения маркерных пиков, состоящий из следующих этапов:

1. Выделение на полученных масс-спектрах тех участков, которые могут быть связаны с дискриминантным признаком, то есть признаком, на основании которого делается вывод о принадлежности штамма к какой-либо группе. В нашем исследовании дискриминантным признаком являлась устойчивость микроорганизмов к АМП, поэтому мы исследовали резистентные штаммы.

2. Сравнение масс-спектров штаммов, обладающих дискриминантным признаком, со штаммами, которые не обладают данным признаком.

3. Сопоставление найденных на втором этапе различий с участками, с наибольшей вероятностью связанными с дискриминантным признаком (по результатам, полученным на первом этапе). Выделение достоверно различных участков, совпадающих с местами наиболее вероятного расположения дискриминантного признака на масс-спектре. На этих участках расположение маркерных пиков представляется наиболее вероятным.

4. Проверка достоверности связи найденных пиков с антибиотикочувствительностью штаммов.

Для проверки предложенного алгоритма на первом этапе исследования провели сравнение спектров микробных культур, выращенных при различных концентрациях АМП, с целью выявления участков спектра, в которых с наибольшей вероятностью располагаются пики, отвечающие за проявление антибиотикорезистентности.

На чашку Петри с питательной средой, засеянную исследуемой культурой микроорганизма (*Klebsiella* spp.), помещали диск с меропенемом, для которого осуществляли поиск маркеров резистентности. После инкубации культуры при 37°C в течение 24 ч отбирали пробу культуры в трех точках с различными концентрациями АМП: С<sub>1</sub> – максимальная концентрация АМП в питательной среде (культура отобрана на границе зоны роста), С<sub>3</sub> – минимальная концентрация АМП (культура отобрана у внутреннего края чашки Петри), С<sub>2</sub> – промежуточная концентрация (культура отобрана посередине между двумя предыдущими точками).

Далее проводили сравнение трех масс-спектров для чув-

ствительного и резистентного штаммов *Klebsiella* spp., полученных при исследовании микроорганизмов, взятых с участков среды с различной концентрацией АМП (рис. 3, 4).

При сопоставлении масс-спектров чувствительного и резистентного штаммов исключили совпадающие области (предположительно ответственные за неспецифические механизмы устойчивости). В итоге получили только те области, которые представляют наибольший интерес для поиска маркеров резистентности (рис. 5).

Применение метода MALDI-TOF масс-спектрометрии для определения чувствительности к АМП, а именно для поиска маркеров резистентности, в настоящее время рассмотрено лишь в единичных работах, и пока не создано технологий его практического рутинного применения [18]. Описано применение MALDI-TOF MS для быстрого обнаружения поринов у *Klebsiella* spp. [19]. Авторы этой работы исследовали 5 карбапенем-чувствительных штаммов и 7 штаммов, устойчивых к карбапенемам. Белки внешней мембраны (OMP) экстрагировали и анализировали с помощью электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли (SDS-PAGE) и затем с помощью MALDI-TOF MS. Предполагается, что пик примерно с  $m/z = 16\text{кДа}$  является  $2\text{H}^+$ -ионом моноизотопного пика 32 кДа, идентифицированного с помощью SDS-PAGE как белок OMP.

Методом MALDI-TOF масс-спектрометрии определена карбапенемазная активность бактерий порядка *Enterobacteriales* при помощи идентификации соединений карбапенемов и продуктов их распада [20]. Важнейшим преимуществом данной технологии являлась возможность определения активности бактериальных ферментов в отношении конкретной группы АМП, например β-лактамных антибиотиков [18]. Обнаружение маркеров резистентности к антибиотикам упрощается путем выделения участков спектра с наибольшей вероятностью их расположения с помощью предлагаемой методики выявления дискриминантных пиков.

## Заключение

Таким образом, одновременно с идентификацией микроорганизмов при помощи MALDI-TOF масс-спектрометрии становится возможным прогнозирование чувствительности полученного изолята к АМП. Предлагаемый метод поиска дискриминантных пиков в перспективе может быть исполь-

зован для выявления маркеров, ответственных за резистентность микроорганизма к АМП. Перспектива использования результатов исследования состоит в сокращении времени исследования биологического материала от пациента и определения чувствительности к АМП выделенного микроорганизма.

#### Информация о финансировании

Финансирование данной работы не проводилось.

#### Financial support

No financial support has been provided for this work.

#### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### Conflict of interests

The authors declare that there is no conflict of interest.

### Литература

1. Сухорукова МВ, Эйдельштейн МВ, Скленова ЕЮ, Иванчик НВ, Микотина АВ, Дехнич АВ, и др. 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 HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12. DOI: 10.1086/595011
3. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int. 2016;2016:2475067. DOI: 10.1155/2016/2475067
4. Скачкова ТС, Шипулина ОЮ, Шипулин ГА, Шеленков АА, Янушевич ЮГ, Михайлова ЮВ, и др. Изучение генетического разнообразия штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных в многопрофильном медицинском центре г. Москвы, с помощью секвенирования нового поколения. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2019;21(1):69-74.
5. Lin WH, Kao CY, Yang DC, Tseng CC, Wu AB, Teng CH, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Sep;33(9):1533-9. DOI: 10.1007/s10096-014-2100-4
6. Покудина ИО, Коваленко КА. Распространённость и вклад в антибиотикостойчивость β-лактамаз у амбулаторных изолятов *Klebsiella pneumoniae*. Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. 2016;12(2):295–298.
7. Анганова ЕВ, Распопина ЛВ, Ветехина АВ, Духанина АВ. Антибиотикостойчивость *Klebsiella pneumoniae* к препаратам цефалоспоринового ряда. Acta Biomedica Scientifica. 2017;2(4):43-47.
8. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed (2017). The first ever list of WHO cataloging clinically relevant multidrug-resistant pathogens in order of priority, according to the current threat to human health, for urgent research and development of new antibiotics. Available at: www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/
9. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallares R, Dominguez MA, Linares J, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains causing bloodstream infections in adults. Microb Drug Resist. 2018;24(7):949957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
10. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
11. Шамина ОВ, Крыжановская ОА, Лазарева АВ, Поликарпова СВ, Карасёва ОВ, Чеботарь ИВ, Маянский НА. Сравнение методов определения устойчивости к колистину у карбапенемрезистентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*. Клиническая лабораторная диагностика. 2018;63(10):646-650. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-646-650
12. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and metaanalysis of mortality of patients infected with carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):18. DOI: 10.1186/s1294101701913
13. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, et al. Biotyping of multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDITOF MS. PloS One. 2013;8(4):e61428. DOI: 10.1371/journal.pone.0061428
14. Rodrigues C, Novais A, Sousa C, Ramos H, Coque TM, Canton R, et al. Elucidating constraints for differentiation of major human *Klebsiella pneumoniae* clones using MALDITOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(2):379386. DOI: 10.1007/s1009601628128
15. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDITOF mass spectrometry. Front Microbiol. 2018;9:3000. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03000
16. Бочарова ЮА, Чеботарь ИВ, Маянский НА. Возможности, проблемы и перспективы масс-спектрометрических технологий в медицинской микробиологии (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(4):249-256. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256
17. Oberle M, Wohlwend N, Jonas D, Maurer FP, Jost G, Tschudin-Sutter S, et al. The Technical and Biological Reproducibility of MatrixAssisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing: Employment of Bioinformatics in a Multicenter Study. PLoS ONE. 2016; 11(10): e0164260. DOI:10.1371/journal.pone.0164260
18. Припутневич ТВ, Мелкумян АР. Масс-спектрометрия – новое слово в клинической микробиологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2016;61(12):842-848. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848
19. Cai J, Hu Y, Zhang R, Zhou H, Xiang G. Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2012 Jun; 50(6): 2179-82. DOI: 10.1128/JCM.00503-12
20. Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of β-lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):924-30. DOI: 10.1128/JCM.02691-13

### References

1. Sukhorukova MV, Edelstein MV, Skleenova EYu, Ivanchik NV, Mikotina AV, Dekhnic AV, et al. Antimicrobial resistance of nosocomial *Enterobacteriaceae* isolates in Russia: results of multicenter epidemiological study "Marathon" 2013–2014. Clinical Microbiology and antimicrobial Chemotherapy. 2017;19(1):49-56. (In Russian).
2. Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, et al. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2009 Jan 1;48(1):1-12. DOI: 10.1086/595011
3. Santajit S, Indrawattana N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. Biomed Res Int. 2016;2016:2475067. DOI: 10.1155/2016/2475067
4. Skachkova TS, Shipulina OYu, Shipulin GA, Shelenkov AA, Yanushevich YuG, Mikhaylova YuV, et al. Characterization of genetic diversity of the *Klebsiella pneumoniae* strains in a Moscow tertiary care center using next-generation sequencing. Clinical Microbiology and antimicrobial Chemotherapy. 2019;21(1):69-74. (In Russian).
5. Lin WH, Kao CY, Yang DC, Tseng CC, Wu AB, Teng CH, et al. Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* from community-acquired recurrent urinary tract infections. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2014 Sep;33(9):1533-9. DOI: 10.1007/s10096-014-2100-4

6. Pokudina IO, Kovalenko KA. The prevalence and contributing to antibiotic-resistant of  $\beta$ -lactamases in ambulatory isolates *Klebsiella pneumoniae*. International Journal of Applied and Fundamental Research. 2016;12(2):295–298. (In Russian).
7. Anganova EV, Raspopina LA, Vetokhina AV, Dukhanina AV. Antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* to cephalosporins. Acta Biomedica Scientifica. 2017;2(4):43–47. (In Russian).
8. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed (2017). The first ever list of WHO cataloging clinically relevant multidrug-resistant pathogens in order of priority, according to the current threat to human health, for urgent research and development of new antibiotics. Available at: www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/
9. Cubero M, Grau I, Tubau F, Pallares R, Dominguez MA, Linares J, et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains causing bloodstream infections in adults. Microb Drug Resist. 2018;24(7):949957. DOI: 10.1089/mdr.2017.0107
10. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:4. DOI: 10.3389/fcimb.2018.00004
11. Shamina OV, Kryzhanovskaya OA, Lazareva AV, Polikarpova SV, Karaseva OV, Chebotar IV, Mayanskiy NA. The comparison of methods for determination of colistin susceptibility in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2018;63(10):646–650. DOI: 10.18821/0869-2084-2018-63-10-646-650 (In Russian).
12. Xu L, Sun X, Ma X. Systematic review and metaanalysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 2017;16(1):18. DOI: 10.1186/s1294101701913
13. Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richez H, Landraud L, et al. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. PLoS One. 2013;8(4):e61428. DOI: 10.1371/journal.pone.0061428
14. Rodrigues C, Novais A, Sousa C, Ramos H, Coque TM, Canton R, et al. Elucidating constraints for differentiation of major human *Klebsiella pneumoniae* clones using MALDI-TOF MS. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2017;36(2):379386. DOI: 10.1007/s1009601628128
15. Rodrigues C, Passet V, Rakotondrasoa A, Brisse S. Identification of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella quasipneumoniae*, *Klebsiella variicola* and related phylogroups by MALDI-TOF mass spectrometry. Front Microbiol. 2018;9:3000. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03000
16. Bocharova YuA, Chebotar IV, Mayanskiy NA. The possibilities, problems and perspectives of mass-spectrometry in medical microbiology: publications review. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2016;61(4):249–256. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-4-249-256 (In Russian).
17. Oberle M, Wohlwend N, Jonas D, Maurer FP, Jost G, Tschudin-Sutter S, et al. The Technical and Biological Reproducibility of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing: Employment of Bioinformatics in a Multicenter Study. PLoS ONE. 2016; 11(10): e0164260. DOI:10.1371/journal.pone.0164260
18. Pripitnevich TM, Melkumyan AR. The mass-spectrometry as a new word in clinical microbiology. Russian Clinical Laboratory Diagnostics (Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika). 2016;61(12):842–848. DOI: 10.18821/0869-2084-2016-61-12-842-848
19. Cai J, Hu Y, Zhang R, Zhou H, Xiang G. Detection of OmpK36 Porin Loss in *Klebsiella* spp. by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. J Clin Microbiol. 2012 Jun; 50(6): 2179–82. DOI: 10.1128/JCM.00503-12
20. Jung JS, Popp C, Sparbier K, Lange C, Kostrzewa M, Schubert S. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for rapid detection of  $\beta$ -lactam resistance in *Enterobacteriaceae* derived from blood cultures. J Clin Microbiol. 2014 Mar;52(3):924–30. DOI: 10.1128/JCM.02691-13

**Информация об авторах:**

Самойлова Анна Андреевна, младший научный сотрудник отдела новых технологий ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
 Телефон: (812) 233-2092  
 E-mail: samanta1906@mail.ru

Лихачёв Иван Владимирович, младший научный сотрудник отдела новых технологий ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
 Телефон: (812) 233-2092  
 E-mail: liv-dnt@mail.ru

Зуева Елена Викторовна, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
 Телефон: (812) 233-2092  
 E-mail: elenazueva9@gmail.com

Рогачёва Елизавета Владимировна, младший научный сотрудник лаборатории медицинской бактериологии ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
 Телефон: (812) 233-2092  
 E-mail: elizvla@yandex.ru

Михайлов Николай Венерович, кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»  
 Адрес: 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14  
 Телефон: (812) 233-2092  
 E-mail: mnv63@yandex.ru

**Information about authors:**

Anna A. Samoilova, junior researcher, department of new technologies, Saint Petersburg Pasteur Institute  
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation  
 Phone: (812) 233-2092  
 E-mail: samanta1906@mail.ru

Ivan V. Likhachev, junior researcher, department of new technologies, Saint Petersburg Pasteur Institute  
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation  
 Phone: (812) 233-2092  
 E-mail: liv-dnt@mail.ru

Elena V. Zueva, PhD (Biological Sciences), senior researcher, laboratory of molecular immunology, Saint Petersburg Pasteur Institute  
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation  
 Phone: (812) 233-2092  
 E-mail: elenazueva9@gmail.com

Elizaveta V. Rogacheva, junior researcher, laboratory of medical bacteriology, Saint Petersburg Pasteur Institute  
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation  
 Phone: (812) 233-2092  
 E-mail: elizvla@yandex.ru

Nikolay V. Mikhailov, MD, PhD, senior researcher at the Saint Petersburg Pasteur Institute  
 Address: 14 Mira str., Saint Petersburg, 197101, Russian Federation  
 Phone: (812) 233-2092  
 E-mail: mnv63@yandex.ru