

Пай Г.В., Ракитина Д.В., Панькова М.Н., Юдин С.М., Загайнова А.В.

## Сравнение патогенного потенциала изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кишечной микробиоты человека, из поверхностных и сточных вод

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, 119121, Москва

**Введение.** *Klebsiella pneumoniae* является условно патогенным возбудителем, который отвечает за возникновение внутрибольничных и внебольничных инфекций, присутствует в почвенной и водной среде, но вирулентный потенциал изолятов *K. pneumoniae* из окружающей среды в значительной степени неизвестен. Поскольку главной угрозой загрязнения внешней среды в настоящий момент считаются изоляты с множественной устойчивостью к антибиотикам, то основная масса исследований *K. pneumoniae* из окружающей среды посвящена выявлению именно таких изолятов (в основном продуцентов бета-лактамаз). **Материал и методы.** В работе 42 изолята *K. pneumoniae*, выделенных из сточных вод, 19 — из поверхностных водных источников и 63 изолята из кишечной микробиоты «практически здоровых» людей проанализированы методом ПЦР на наличие потенциальных генов вирулентности (*ybtS*, *kfu*, *rmpA*, *mrkD*, *K2*, *alls*, *magA*, *iutA*).

**Результаты.** В результате анализа выявлена статистически значимая неоднородность исследуемых выборок. Изоляты, выделенные из сточных вод, показали наибольшую долю и спектр вирулентных генов (8 из 8). Изоляты из поверхностных источников статистически оказались неразличимы с изолятами, выделенными из кишечной микробиоты «практически здоровых» людей, при этом и в этих группах выявлялись патогенные детерминанты.

**Заключение.** Изоляты *K. pneumoniae* из поверхностных источников статистически не различались с изолятами из кала «практически здоровых», хотя часть вирулентных генов выявлена и в этих изолятах. Сточные воды могут служить резервуаром для высоковирулентных представителей *K. pneumoniae*, в большей степени, чем кишечник здоровых людей, могут служить риском для здоровья населения. Необходимы дополнительные исследования с более объёмными выборками и широким спектром вирулентных признаков для прогнозирования распространения гипервирулентных штаммов.

**К л ю ч е в ы е с л о в а :** гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae*; сидерофоры; гипермукоидный фенотип; поверхностные воды; сточные воды

**Для цитирования:** Пай Г.В., Ракитина Д.В., Панькова М.Н., Юдин С.М., Загайнова А.В. Сравнение патогенного потенциала изолятов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из кишечной микробиоты человека, из поверхностных и сточных вод. Гигиена и санитария. 2020; 99 (12): 1360-1364. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12-1360-1364>

**Для корреспонденции:** Загайнова Анжелика Владимировна, канд. биол. наук, зав. лаб. микробиологии и паразитологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва. E-mail: angelikaangel@mail.ru

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Финансирование.** Исследование проводилось при поддержке Государственного задания Рег. № АААА-А18-118020590091-2, тема «Разработка технологий криоконсервации и архивирования биообразцов микробиологических ресурсов человека».

**Участие авторов:** Пай Г.В. – концепция и дизайн исследования, сбор и обработка материала, выполнение экспериментальной работы, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Ракитина Д.В. – выполнение экспериментальной работы, написание текста; Панькова М.Н. – сбор и обработка материала; Юдин С.М. – редактирование, утверждение окончательного варианта статьи; Загайнова А.В. – концепция и дизайн исследования, редактирование, утверждение окончательного варианта статьи.

Поступила 22.10.2020

Принята к печати 15.12.20

Опубликована 25.01.2021

Galina V. Pay, Daria V. Rakitina, Marina N. Pankova, Sergey M. Yudin, Angelika V. Zagaynova

## Comparison of the pathogenic potential of *Klebsiella pneumoniae* isolates from human intestinal microbiota, surface waters, and sewage

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121, Russian Federation

**Introduction.** *Klebsiella pneumoniae*, an opportunistic pathogen responsible for nosocomial and community-acquired infections, is present in soil and water. Still, the virulent potential of *K. pneumoniae* isolates from the environment is mostly unknown. Since isolates with multiple antibiotic resistance are currently considered to be the main threat of environmental pollution, the bulk of ecological studies of *K. pneumoniae* are devoted to the identification of just such isolates (mainly producers of beta-lactamases).

**Material and methods.** In this study, 42 isolates of *K. pneumoniae* isolated from wastewater, 19 from surface water sources, and 63 isolates from the intestinal microbiota of conventionally healthy cases were analyzed by PCR for the presence of potential virulence genes (*ybtS*, *kfu*, *rmpA*, *mrkD*, *K2*, *alls*, *magA*, *iutA*).

**Results.** As a result of the analysis, a statistically significant heterogeneity of the studied samples was revealed. Isolates from wastewater showed the highest proportion and spectrum of virulent genes (8 out of 8). Isolates from surface sources were statistically indistinguishable from isolates isolated from the intestinal microbiota of “conventionally healthy” people, while pathogenic determinants were also detected in these groups.

**Conclusion.** *K. pneumoniae* isolates from surface sources did not statistically differ from isolates from feces of “practically healthy” ones, although some of the virulent genes were also detected in these isolates. Wastewater can serve as a reservoir for highly virulent

*K. pneumoniae*, to a greater extent than the intestines of healthy people, and can serve as a risk to public health. Additional studies with larger samples and a more comprehensive range of virulent traits are needed to predict the spread of hypervirulent strains.

**К е у в о р д с :** *hpkV Klebsiella pneumoniae*; siderophore; hypermucooid phenotype; surface water; sewage water

**For citation:** Pay G.V., Rakitina D.V., Pankova M.N., Yudin S.M., Zagaynova A.V. Comparison of the pathogenic potential of *Klebsiella pneumoniae* isolates from human intestinal microbiota, surface waters, and sewage. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2020; 99 (12): 1360-1364. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2020-99-12-1360-1364> (In Russ.)

**For correspondence:** Angelika V. Zagaynova, MD, Ph.D., Head of Microbiology and parasitology laboratory in the Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency, Moscow, 119121, Russian Federation. E-mail: mgoshin@cspzmz.ru

#### Information about the authors:

Pay G.V., <https://orcid.org/0000-0001-7086-0899>; Rakitina D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3554-7690>; Pankova M.N., <https://orcid.org/0000-0002-9133-3665>; Yudin S.M., <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>; Zagaynova A.V. <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686>

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgements.** The research was supported with the support of the State Assignment Reg. № AAAA-A18-118020590091-2, the theme is "Development of technologies for cryopreservation and archiving of biological samples of human microecological resources".

**Contribution:** Pay G.V. – concept and design of the study, collection, and processing of material, performing the experiments, statistical processing, writing, editing; Rakitina D.V. – performing the experiments, writing; Pankova M.N. – collection and processing of material; Yudin S.M. – editing, approval of the final version of the article; Zagaynova A.V. – concept and design of the study, editing, approval of the final version of the article.

Received: October 22, 2020  
Accepted: December 15, 2020  
Published: January 25, 2021

## Введение

Поверхностные воды, питьевая вода, почва, растения, сточные воды и промышленные стоки являются экологическими резервуарами бактерий *Klebsiella pneumoniae*, также присутствующих в резидентной микрофлоре кишечника «практически здоровых» людей [1, 2]. Однако Podschun и его коллеги [3] в 2001 г. выделили из поверхностных вод в Германии потенциально патогенные *K. pneumoniae*, которые обладают такими факторами вирулентности, как пили, устойчивость к воздействию сыворотки крови и сидерофор. Эти факторы вирулентности характерны для патогенных изолятов *K. pneumoniae*, вызывающих поражение кишечника, респираторных органов, печени и др. [4]. Таким образом, *K. pneumoniae* из окружающей среды может представлять угрозу для здоровья человека [5].

Поскольку главной угрозой загрязнения внешней среды в настоящий момент считаются изоляты с множественной устойчивостью к антибиотикам [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>], то основная масса исследованных *K. pneumoniae*, выделенных из окружающей среды, посвящена выявлению именно таких изолятов (в основном продуцентов бета-лактамаз [6–8]). Вместе с тем важны также и иные генетические детерминанты, в том числе и те, которые определяют так называемый гипервирулентный патотип *K. pneumoniae* (hvKp) [4, 9], вызывающий инфекции и эпидемиологические вспышки. Для hvKp весьма характерен так называемый гипермукоидный фенотип (ГМ), проявляющийся в слизеобразности бактериальной колонии и защищающий клетки от фагоцитоза и воздействия сыворотки [10]. Также hvKp свойственны устойчивость к антибиотикам, усиленная продукция сидерофоров и определённые серотипы бактериальной капсулы (K1, K2) [9, 11].

Для оценки загрязнённости поверхностных и сточных вод вирулентными (и потенциально гипервирулентными) изолятами *K. pneumoniae* в настоящем исследовании использован ПЦР-анализ ДНК изолятов из этих источников в сравнении с кишечной микробиотой «практически здоровых» людей на наличие патогенных детерминант (сидерофоров, адгезинов, генов мукоидного фенотипа, вирулентного серотипа и метаболизма аллантаина (маркера внекишечных инфекций) – всего 8 генов).

## Материал и методы

Исследования проведены в рамках выполнения темы Государственного задания Рег. № AAAA-A18-118020590091-2 «Разработка технологий криоконсервации и архивирования биобразцов микробиологических ресурсов человека».

**Получение бактериальных изолятов.** В работе использованы:

- изоляты *K. pneumoniae* ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, выделенные из кишечной микробиоты когорты «практически здоровых» людей (63 изолята);
- 19 изолятов *K. pneumoniae* из поверхностных источников, выделенных из 19 проб воды рек Москвы, Дона, отобранных в октябре 2018 и ноябре 2019 гг.;
- 42 изолята, выделенных из 26 образцов сточной воды внутри станций аэрации на разных стадиях очистки г. Москвы и Московской области (Курьяновской, Зеленоградской, Люберецкой, Подольской) в рамках выполнения Государственного контракта № 0195100000219000284\_315749 в октябре–ноябре 2018 г. и ноябре 2019 г.

Отбор проб проводили в соответствии с ГОСТ 31942-2012 «Вода. Отбор проб для микробиологического анализа», пробы воды исследовали методами, указанными в МУ 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов».

Изолированные колонии *K. pneumoniae* выделяли культуральным методом на агаризованных дифференциально-диагностических средах (Эндо (HiMedia), Агар ВСР (Conda), Chromocult Conform Agar (Merk)).

Идентификацию бактерий проводили с использованием системы масс-спектрометрической бактериальной идентификации Viotyper MALDI-TOF MS (Bruker).

Все выделенные изоляты *K. pneumoniae* хранили в рабочей коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА России при температуре –70 °С в среде для длительного хранения живых бактериальных клеток в условиях низких температур (Патент на изобретение № 2019128097 от 06.09.2019 г.). Для подготовки к выделению ДНК изоляты *K. pneumoniae* вынимали из низкотемпературного хранилища, размораживали в течение 45 с на прогретой заранее до температуры +37 °С водяной бане, затем образцы оставляли при комнатной температуре до полного оттаивания (заявка на патент № 2019142673 от 20.12.2019 г.).

**Выделение ДНК.** Изолированные суточные колонии снимали с агаризованной питательной среды (мясо-пептонный агар), ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе, собирали центрифугированием, добавляли 0,5 мл деионизированной воды и лизировали 15-минутным прогреванием при 70 °С. После 10 мин центрифугирования при 6000 об./мин надосадочную жидкость использовали в ПЦР-анализе.

**ПЦР-анализ.** Использовали специфические синтезированные олигонуклеотиды к генам-мишеням, предложенным в работе Comrain и соавт. [12] для мультиплексного

Таблица 1

Последовательности олигонуклеотидов к генам-мишеням ПЦР для проведения мультиплексного анализа

Ген-мишень ПЦР	Функция белка – продукта гена-мишени	Название олигонуклеотида	Последовательность олигонуклеотида
<i>entB</i>	Захват и транспорт железа	entB_for entB_rev	GTCAACTGGGCCTTTGAGCCGTC TATGGGCGTAAACGCCGGTGAT
<i>ybtS</i>	Захват и транспорт железа	ybtS_for ybtS_rev	GACGGAAACAGCACGGTAAA GAGCATAATAAGGCCGAAAGA
<i>kfu</i>	Захват и транспорт железа, фосфотрансфераза	kfu_for kfu_rev	GGCCTTTGTCCAGAGCTACG GGTCTGGCGCAGAGTATGC
<i>iutA</i>	Захват и транспорт железа	iutA_for iutA_rev	GGGAAAGGCTTCTCTGCCAT TTATTCGCCACCACGCTCTT
<i>mrkD</i>	Компонент системы адгезина 3-го типа	mrkD_for mrkD_rev	AAGCTATCGCTGTACTTCCGGCA GGCGTTGGCGCTCAGATAGG
<i>magA</i>	Гипермукоидный фенотип, серотип K1	magA_for magA_rev	GGTGCTCTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG
<i>rmpA</i>	Гипермукоидный фенотип	rmpA_for rmpA_rev	CATAAGAGTATTGGTTGACAG CTTGCATGAGCCATCTTTCA
<i>k2</i>	K2-серотип, предположительно патогенный	K2_for K2_rev	CAACCATGGTGGTTCGATTAG TGGTAGCCATATCCCTTTGG
<i>allS</i>	Метаболизм аллантаина	allS_for allS_rev	CATTACGCACCTTTGTCAGC GAATGTGTCGGCGATCAGCTT

анализа (табл. 1) и реактивов набора для ПЦР с Taq-полимеразой (PK114, Евроген), согласно протоколу производителя.

В качестве внутреннего контроля прохождения реакции использовался ген сидерофора *entB*, универсальный для всех бактерий рода *Klebsiella*.

Мультиплексный анализ проводили в условиях реакции, описанных у Compain, 2014: денатурация 15 мин при 95 °С, 30 циклов (95 °С 30 с; 60 °С 90 с; 72 °С 60 с), финальная элонгация 72 °С 10 мин.

Продукты реакции детектировали методом электрофореза в 1,2% агарозном геле на трис-борат-ЭДТА буфере с окрашиванием бромистым этидием. Детекцию производили с помощью системы BioRad Gel-detection.

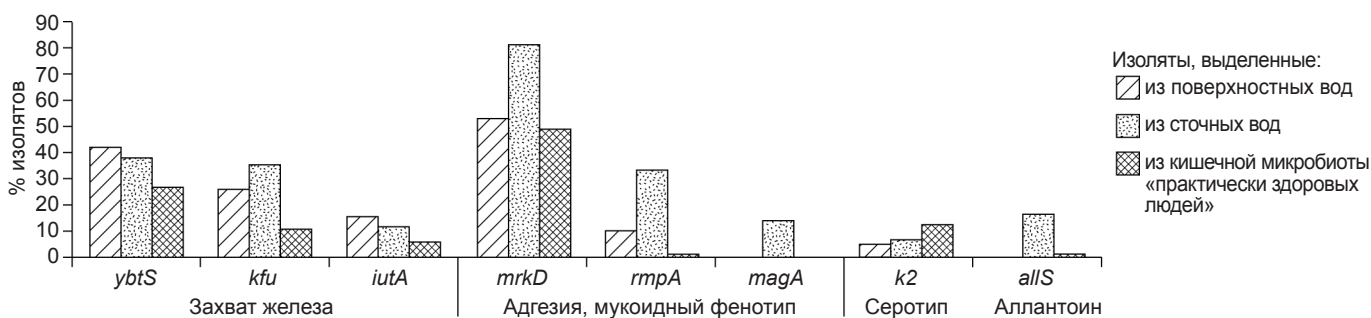
**Статистический анализ.** Анализ статистической достоверности различий между группами изолятов представлен-

ности патогенных детерминант проводили с использованием программного обеспечения Statistica (Statsoft, Dell) методом критерия согласия Пирсона  $\chi^2$  (хи-квадрат) [13].

Результаты

Результаты анализа 42 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из сточных вод, 19 штаммов, обнаруженных в поверхностных источниках, и 63 изолятов из кишечной микрофлоры «практически здоровых» людей представлены на рисунке.

Статистические различия между исследуемыми генами изолятов бактерий, выделенными из внешней среды, внекишечными инфекциями, обусловленными *K. pneumoniae* и штаммами, выделенными от когорты «практически здоровых» людей, представлены в табл. 2.



Процент изолятов *K. pneumoniae*, содержащих условно патогенные гены, в сравниваемых группах.

Таблица 2

Значения критерия согласия Пирсона  $\chi^2$  и вероятности ошибки (p) при сравнении представленности исследуемых генов в сравниваемых группах

Сравниваемые группы	Исследуемый ген															
	<i>ybtS</i>		<i>kfu</i>		<i>iutA</i>		<i>mrkD</i>		<i>rmpA</i>		<i>magA</i>		<i>K2</i>		<i>AllS</i>	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p		
Внешние источники / Сточные воды / Кишечная микрофлора «практически здоровых»	> 0,05		9,2	< 0,01	> 0,05		11,2	< 0,01	21,7	< 0,001	12,3	< 0,01	> 0,05		11,0	< 0,01

Гены, чьи продукты участвуют в захвате, транспорте и усвоении железа из окружающей среды, выявлены во всех изученных группах. Продукты этих генов также способны участвовать в патогенезе, индуцируя воспаление и усиленный бактериальный рост [14, 15]. Ген сидерофора *ybtS* обнаруживался в изучаемых группах с достоверно различной частотой – около 40% штаммов из водных сред и существенно меньше у изолятов «практически здоровых» (26,5%) людей. Отвечающий за транспорт железа *kfu* выявляли с максимальной частотой в изолятах, выделенных из сточных вод (35,7%), чуть меньшей (26,3%) – в изолятах из поверхностных источников и около 10% – у изолятов, выделенных из кишечной микробиоты «практически здоровых» людей, причём эти различия оказались статистически значимыми ( $p < 0,01$ ). Сидерофор *iutA* не демонстрировал статистически значимых различий в частоте выявляемости между группами (6,3–15,7% изолятов).

Адгезин 3-го типа *mrkD*, ассоциированный с госпитальными инфекциями [16, 17], выявлен максимально у изолятов из сточных вод (80,9%) по сравнению с изолятами от «практически здоровых» лиц и изолятами из поверхностных источников (49,2 и 52,6% соответственно) ( $p < 0,01$ ).

Ген *k2*, ассоциированный с K2-серотипом бактериальной капсулы, встречался во всех исследуемых группах изолятов без статистических различий.

Ген, связанный с гипермукоидным фенотипом *K. pneumoniae* (*rmpA*), статистически чаще всего ( $p < 0,001$ ) обнаруживался в изолятах, выделенных из проб сточных вод с частотой 33,3%. Реже всего (1,6%) он встречался в изолятах, выделенных из кишечной микробиоты «практически здоровых» людей. Из изолятов, выделенных из проб поверхностных вод, только 10,5% имели этот ген. Ген *magA*, также ассоциированный с ГМ-фенотипом, встречается только у изолятов, выделенных из проб сточных вод (14,3% из выборки).

Ген, участвующий в метаболизме аллантина *alls*, ассоциированный с изолятами из печёночных абсцессов [18], достоверно чаще ( $p < 0,01$ ) встречался в изолятах, выделенных из проб сточной воды (16,7% в сравнении с 1,6% у изолятов из кишечной микробиоты «практически здоровых» людей и отсутствием в пробах, выделенных из поверхностных вод).

## Обсуждение

Характерной чертой бактерий рода *Klebsiella* является способность колонизировать самые разные места обитания как во внешней среде (вода, почва), так и в живых организмах (растения, пищеварительный тракт и респираторные органы животных и человека и т. д.) [19]. Тем не менее вопросы специфичности конкретных бактерий для конкретных мест обитания и возможной циркуляции их между различными биотопами остаются невыясненными. Изучение поверхностных и сточных вод на наличие патогенных микроорганизмов имеет своей целью как оценить степень загрязнения (локальная задача, представляющая интерес для конкретного региона), так и выявить пути, по которым распространяется загрязнение (представляет универсальный интерес). Можно предположить, что источником загрязнения потенциально патогенными бактериями *K. pneumoniae* является недостаточная очистка бытовых сточных вод [20–22], в том числе поступающих из лечебных учреждений больнично-ассоциированных инфекций [23] и т. д.

В настоящем исследовании наиболее широкий спектр патогенных детерминант выявляли в изолятах *K. pneumoniae*, выделенных из сточных вод, в которых были обнаружены все исследуемые вирулентные гены (8 генов). К тому же 5 из этих генов обнаружили либо в большем проценте (*kfu*, *mrkD*, *rmpA*, *alls*), либо исключительно в изолятах этой группы (*magA*). В изолятах, выделенных из поверхностных вод, встречали 6 генов-мишеней, а в фекалиях когорты «практически здоровых» – 7 людей (при этом два из них – *rmpA* и *alls* – всего лишь в 1,6% случаев).

Таким образом, в проведённом исследовании наибольший вирулентный потенциал выявлен у изолятов *K. pneumoniae*, вы-

деленных в сточных водах. Такое распределение вирулентности бактерий *K. pneumoniae* можно объяснить следующим образом.

Сточные воды богаты питательными веществами, антимикробными субстанциями и тяжёлыми металлами, что предоставляет оптимальные условия для размножения и развития изменчивости у бактерий [24, 25]. В ряде исследований делались предположения о том, что очистные сооружения, места сбора и сброса сточных вод, системы отстойников и т. п. могут служить инкубационным резервуаром, где бактерии могут размножаться, взаимно обмениваться мобильными элементами генома (в том числе несущими гены разнообразной устойчивости) и в случае даже небольших дефектов очистки высвободиться в окружающую среду и нести потенциальный вред здоровью человека [26].

В литературе имеется ряд сообщений о выявлении в изолятах *K. pneumoniae* из сточных и поверхностных вод таких патогенных детерминант, как сидерофоры. В то же время большинство исследователей сообщают об отсутствии обнаруженных авторами генов мукоидного фенотипа, присущего высоковирулентным клебсиеллам. Испанскими исследователями отмечалось сходство вирулентных свойств изолятов *K. pneumoniae* из сточных вод с клиническими изолятами по присутствию сидерофора *ybtS* и адгезинов, в том числе 3-го типа (как *mrkD*), в то время как гены мукоидного фенотипа *magA* и *rmpA* в сточных водах не обнаруживались [27]. В Иране сидерофор *kfu* обнаружен в 20% изолятов из окружающей среды (в сравнении с 33% среди клинических изолятов). Runchagoen и соавт. [28] проанализировали методом полногеномного секвенирования 30 изолятов из клиники и прилегающих водоёмов в Таиланде, и ген *rmpA* не был выявлен в водных источниках. В аналогичном исследовании в Румынии в изолятах поверхностных вод вблизи госпиталей также не найдены детерминанты гипермукоидного фенотипа [29]. В исследовании поверхностных вод рек Малайзии [30] гены *magA* и *rmpA* не обнаружили даже у изолятов из популяционно нагруженных и загрязнённых фекалиями населённых мест. Только в Ираке [31] выявили наличие генов мукоидного фенотипа у изолятов из поверхностных вод в 15% случаев (*magA*) и 75% (*rmpA*).

В глобальных исследованиях показано, что конкретные патотипы могут иметь весьма различную частоту встречаемости в разных странах [32], что объясняется как различными климатическими условиями, так и разным качеством санитарно-гигиенических мероприятий.

## Заключение

На основании проведённого молекулярно-генетического анализа генов патогенности *K. pneumoniae* в изолятах, выделенных из сточных и поверхностных вод, установлено, что они достоверно отличаются по набору генов как между собой, так и с выборкой изолятов, выделенных из кишечной микробиоты «практически здоровых» людей. Выборка *K. pneumoniae* из сточных вод продемонстрировала достаточно высокий вирулентный потенциал. Изоляты, выделенные из этой группы, обладают повышенной частотой генов гипермукоидного фенотипа *rmpA*, *magA* (характерных для гипервирулентных клебсиелл), гена *alls* (ассоциированного с больничными внекишечными инфекциями), а также повышенной частотой сидерофора *kfu* и адгезина *mrkD*.

Изоляты *K. pneumoniae* из поверхностных источников статистически не различались с изолятами из кала «практически здоровых», хотя часть вирулентных генов выявлены и в этих изолятах.

Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что сточные воды и очистные сооружения действительно могут служить резервуаром для высоковирулентных представителей *K. pneumoniae* в большей степени, чем кишечник здоровых людей и водоёмы. При недостаточном обеззараживании сточных вод патогенные изоляты имеют возможность попадать в поверхностные воды, что в свою очередь может представлять эпидемическую опасность.

## Литература

(п.п. 1–12, 14–32 см. References)

13. Анализ произвольных таблиц сопряженности с использованием критерия хи-квадрат. Available at: <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html>

## References

- Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* 1998; 11(4): 589–603.
- Struve C., Krogfelt K.A. Pathogenic potential of environmental *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Environ. Microbiol.* 2004; 6(6): 584–90. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2004.00590.x>
- Podschun R., Pietsch S., Höller C., Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* species in surface waters and their expression of virulence factors. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001; 67(7): 3325–7. <https://doi.org/10.1128/aem.67.7.3325-3327.2001>
- Choby J.E., Howard-Anderson J., Weiss D.S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* –clinical and molecular perspectives (Review). *J. Intern. Med.* 2020; 287: 283–300. <https://doi.org/10.1111/joim.13007>
- Lightfoot N. Bacteria of potential health concern. In: World Health Organization (WHO). *Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety*. London; 2003: 61–79.
- Matsen J.M., Spindler J.A., Blosser R.O. Characterization of *Klebsiella* isolates from natural receiving waters and comparison with human isolates. *Appl. Microbiol.* 1974; 28(4): 672–8.
- Vasaikar S., Obi L., Morobe I., Bisi-Johnson M. Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Klebsiella* isolates in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa. *Int. J. Microbiol.* 2017; 2017: 8486742. <https://doi.org/10.1155/2017/8486742>
- Kim S.H., Wei C.I., Tzou Y.M., An H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. *J. Food Prot.* 2005; 68(10): 2022–9. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-68.10.2022>
- Lee C.R., Lee J.H., Park K.S., Jeon J.H., Kim Y.B., Cha C.J., et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 2017; 7: 483. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00483>
- Fung C.P., Lin Y.T., Lin J.C., Chen T.L., Yeh K.M., Chang F.Y., et al. *Klebsiella pneumoniae* in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscesses. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(8): 1322–5. <https://doi.org/10.3201/eid1808.111053>
- Russo T.A., Olson R., Macdonald U., Metzger D., Maltese L.M., Drake E.J., et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hyper-mucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. *Infect. Immun.* 2014; 82(6): 2356–67. <https://doi.org/10.1128/IAI.01667-13>
- Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., Audo J., Ailloud F., et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 2014; 52(12): 4377–80. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-14>
- Analysis of arbitrary conjugacy tables using the chi-square criterion. Available at: <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html> (in Russian)
- Yu W.L., Ko W.C., Cheng K.C., Lee C.C., Lai C.C., Chuang Y.C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2008; 62(1): 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007>
- Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois C.M., Bachman M.A. *Klebsiella pneumoniae* siderophores induce inflammation, bacterial dissemination, and HIF-1 $\alpha$  stabilization during pneumonia. *mBio.* 2016; 7(5): e01397–16. <https://doi.org/10.1128/mBio.01397-16>
- Jagnow J., Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* MrkD-mediated biofilm formation on extracellular matrix- and collagen-coated surfaces. *Microbiology.* 2003; 149(Pt. 9): 2397–405. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26434-0>
- Murphy C., Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol.* 2012; 7(8): 991–1002. <https://doi.org/10.2217/fmb.12.74>
- Chou H.C., Lee C.Z., Ma L.C., Fang C.T., Chang S.C., Wang J.T. Isolation of a chromosomal region of *Klebsiella pneumoniae* associated with allantoin metabolism and liver infection. *Infect. Immun.* 2004; 72(7): 3783–92. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.7.3783-3792.2004>
- Bagley S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control.* 1985; 6(2): 52–8. <https://doi.org/10.1017/s0195941700062603>
- Huijbers P.M.C., Blaak H., De Jong M.C.M., Graat E.A.M., Vandenberghe-Grauls C.M.J.E., De Roda Husman A.M. Role of the environment in the transmission of antimicrobial resistance to humans: a review. *Environ. Sci. Technol.* 2015; 49(20): 11993–2004. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b02566>
- Bréchet C., Plantin J., Sauget M., Thouverez M., Talon D., Chollet P., et al. Wastewater treatment plants release large amounts of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* into the environment. *Clin. Infect. Dis.* 2014; 58(12): 1658–65. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu190>
- Ram B., Kumar M. Correlation appraisal of antibiotic resistance with fecal, metal and microplastic contamination in a tropical Indian river, lakes and sewage. *npj Clean Water.* 2020; 3: 3. <https://doi.org/10.1038/s41545-020-0050-1>
- Khan F.A., Hellmark B., Ehrlich R., Söderquist B., Jass J. Related carbapenemase-producing *Klebsiella* isolates detected in both a hospital and associated aquatic environment in Sweden. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2018; 37(12): 2241–51. <https://doi.org/10.1007/s10096-018-3365-9>
- Mearthur J.V., Tuckfield R.C. Spatial patterns in antibiotic resistance among stream bacteria: effects of industrial pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(9): 3722–6. <https://doi.org/10.1128/aem.66.9.3722-3726.2000>
- Graham D.W., Olivares-Rieumont S., Knapp C.W., Lima L., Werner D., Bowen E. Antibiotic resistance gene abundances associated with waste discharges to the Almendares River near Havana, Cuba. *Environ. Sci. Technol.* 2011; 45(2): 418–24. <https://doi.org/10.1021/es102473z>
- Lepuschitz S., Schill S., Stoeger A., Pekard-Amenitsch S., Huhulescu S., Inreiter N., et al. Whole genome sequencing reveals resemblance between ESBL-producing and carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Austrian rivers and clinical isolates from hospitals. *Sci. Total Environ.* 2019; 662: 227–35. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.179>
- Atmani S.M., Messai Y., Alouache S., Fernandez R., Estepa V., Torres C., et al. Virulence characteristics and genetic background of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from wastewater. *Fresenius Environ. Bull.* 2015; 24(1): 103–12.
- Runcharoen C., Moradigaravand D., Blane B., Paksanont S., Thamachote J., Anun S., et al. Whole genome sequencing reveals high-resolution epidemiological links between clinical and environmental *Klebsiella pneumoniae*. *Genome Med.* 2017; 9(1): 6. <https://doi.org/10.1186/s13073-017-0397-1>
- Surleac M., Czobor Barbu I., Paraschiv S., Popa L.I., Gheorghe I., Marutescu L., et al. Whole genome sequencing snapshot of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from hospitals and receiving wastewater treatment plants in Southern Romania. *PLoS One.* 2020; 15(1): e0228079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0228079>
- Barati A., Ghaderpour A., Chew L.L., Bong C.W., Thong K.L., Chong V.C., et al. Isolation and characterization of aquatic-borne *Klebsiella pneumoniae* from tropical estuaries in Malaysia. *Int. J. Environ. Res. Public Health.* 2016; 13(4): 426. <https://doi.org/10.3390/ijerph13040426>
- Mohammed E.S., Flayyih M.T. Detection of rmpA and magA genes and hypermucoviscosity phenotype in *Klebsiella pneumoniae* isolated from water samples in compare with clinical isolates. *Curr. Res. Microbiol. Biotechnol.* 2018; 6(1): 1424–30.
- Ko W.C., Paterson D.L., Sagnimeni A.J., Hansen D.S., Von Gottberg A., Mohapatra S., et al. Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(2): 160–6. <https://doi.org/10.3201/eid0802.010025>