

УДК 614.777:579.842.16 (004.413.4)

ГИГИЕНИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЗАГРЯЗНЕНИЯ KLEBSIELLA PNEUMONIAE ВОДЫ, ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ДЛЯ НУЖД НАСЕЛЕНИЯ ГОРОДОВ РОСТОВ-НА-ДОНУ И АЗОВ**Морозова Марина Александровна,**кандидат биологических наук, старший научный сотрудник
ФБУН Ростовский научно-исследовательский институт микробиологии и паразитологии
Роспотребнадзора
e-mail: morozova.q@mail.ru**Аннотация**

Клебсиеллы относятся к группе микроорганизмов, способных вызывать кишечные инфекции с водным фактором передачи. Цель: оценить степень микробного риска распространения водообусловленных инфекционных заболеваний при обнаружении *Klebsiella pneumoniae* в различных источниках водопользования. Объекты исследования – родники, расположенные на территории г. Ростова-на-Дону, вода на участке реки Дон в зонах городских пляжей, ростовского и азовского водозаборов, а также вода централизованного водоснабжения г. Азова. Клебсиелл идентифицировали с помощью культуральных, биохимических методов и MALDI-TOF MS анализа. Индекс MAR рассчитывался для каждого штамма *K. pneumoniae* в качестве дополнительного маркера их происхождения из источников с широким применением антимикробных препаратов. Согласно результатам исследований, проведенных в 2024 г., акватории пляжей городов Ростова-на-Дону и Азов, а также три из восьми родников характеризуются «высокой» степенью микробного риска. Исследование показало, что 51% изолятов из речной воды и 80% из родников и водопроводной воды превысили пороговое значение индекса $MAR \geq 0,2$.

Ключевые слова: вода, родники, река Дон, степень микробного риска, *Klebsiella pneumoniae*.

HYGIENIC ASPECTS OF KLEBSIELLA PNEUMONIAE POLLUTION OF WATER USED FOR THE NEEDS OF THE POPULATION OF THE CITIES OF ROSTOV-ON-DON AND AZOV**Marina A. Morozova,**Candidate of Biological Sciences, Senior Research Fellow
Rostov Research Institute of Microbiology and Parasitology
e-mail: morozova.q@mail.ru**ABSTRACT**

Klebsiella is a member of the group of microorganisms that can cause waterborne intestinal infections. Objective: to assess the microbial risk of spreading waterborne infectious diseases due to detection of *Klebsiella pneumoniae* in various water sources. Material and methods: the objects of the study are springs located in the territory of Rostov-on-Don, water in the Don River section in the areas of city beaches, Rostov and Azov water intakes, as well as centralized water supply water in Azov. *Klebsiella* were identified using cultural, biochemical methods and MALDI-TOF MS analysis. The MAR index is calculated for each *K. pneumoniae* strain as an additional marker of their origin from sources with widespread use of antimicrobial drugs. According to the results of studies conducted in 2024, the water areas of the beaches of the cities of Rostov-on-Don and Azov, as well as three out of eight springs, are characterized by a «high» degree of microbial risk. The study showed that 51% of isolates from river water and 80% from springs and tap water exceeded the threshold value of the MAR index ≥ 0.2 .

Keywords: water, springs, Don River, degree of microbial risk, *Klebsiella pneumoniae*.

Введение. Санитарная охрана водоисточников, зон рекреации и обеспечение населения доброкачественной питьевой водой считается одной из ключевых глобальных задач, неотъемлемых для всего мирового сообщества. В условиях современной химической и биологической нагрузки на водоемы, оценка надежности действующих стандартов включает использование индикаторных микроорганизмов. В гигиене воды биоиндикация ориентируется на показатели фекальных загрязнений, обнаружение которых свидетельствует о потенциальном присутствии бактерий – возбудителей острых кишечных инфекций (ОКИ) [1]. С этой целью в Российской Федерации в качестве надёжного санитарно-микробиологического показателя фекального загрязнения воды применяется индикаторный показатель «обобщённые колиформные бактерии» (ОКБ), объединяющий широкий спектр бактерий порядка *Enterobacteriales*. Клебсиеллы включены в показатель ОКБ, но не являются отдельным нормируемым микроорганизмом. В 2011 г. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) внесены в список микроорганизмов, способных вызывать кишечные инфекции с водным фактором передачи, среди групп населения повышенного риска с ослабленной иммунной системой [2]. Необходимо отметить, что клебсиеллы, присутствующие в различных источниках водоснабжения, обладают выраженными свойствами патогенности и вирулентности, проявляют значительную проникающую способность в водоносные горизонты и длительную выживаемость в подземных водах [3]. Однако увеличение опасности связано не с эволюцией их вирулентных свойств, а с прогрессирующей устойчивостью к антибактериальным препаратам (АБП). Именно резистентность к наиболее широко применяемым антибиотикам делает клебсиелл лидерами среди оппортунистов, что наглядно подтверждается статистикой распространения устойчивых штаммов [4, 5]. Возвращаясь к гидроэкосистемам, необходимо обратить внимание на обнаружение в воде рек Дон и Темерник изолятов *Klebsiella pneumoniae* с множественной устойчивостью к лекарственным препаратам и детерминантами резистентности к антибиотикам [6-8].

Важным является вопрос выживаемости *Klebsiella* в речной воде. Имеется сообщение, что жизнеспособность клебсиелл в речной воде достигает 50 дней [9]. Авторы отмечают, что время, за которое количество *K. pneumoniae* в пресной воде уменьшается в 10 раз при температуре 0 °С составляет около 24 дней, а при температуре 20 °С - чуть больше 5 дней [10]. Согласно экспериментальным исследованиям, в течение первых часов после внесения культуры в стерильную речную воду происходит снижение количества вследствие отмирания. Однако спустя 24 часа содержание бактерий в воде превышает исходное

значение в 29,2 раза. Полученные данные подтверждают способность клебсиелл к размножению в стерильной речной воде, что позволяет предположить увеличение их численности при поступлении в открытый водоем [11]. Учитывая высокую устойчивость штаммов *Klebsiella* к хлору, они могут присутствовать в питьевой воде даже в отсутствие *E. coli*, что представляет серьезную эпидемиологическую опасность водопользования. Кроме того, была установлена этиологическая роль бактерий рода *Klebsiella* и инфицирующая (100 КОЕ/дм³) доза в возникновении ОКИ [3].

Цель исследования: определить степень микробного риска при обнаружении *Klebsiella pneumoniae* в различных водоисточниках и определить индекс множественной антибиотикорезистентности (индекс MAR) для каждого отдельного изолята.

Материал и методы исследования

Объекты исследования: 120 проб воды включая пробы из реки Дон в зонах водозаборов (17 проб) и акваторий городских пляжей (17 проб) г. Ростова-на-Дону и г. Азова; вода 8 родников, расположенных на территории Ростова-на-Дону (16 проб); а также пробы воды из распределительной сети и перед поступлением в распределительную сеть (70 проб). Воду отбирали из водопроводных колонок, в детских дошкольных учреждениях и учреждениях среднего образования г. Азова. Исследования проводили ежемесячно с марта по октябрь 2024 г. Воду из родников отбирали в летне-осенний период.

Методы исследования: отбор проб воды осуществлен в соответствии ГОСТ Р 59024 [12], ГОСТ 31942 (ИСО 19458) [13]. Количественный анализ проб воды на определение показателя ОКБ и выделение клебсиелл выполняли титрационным методом в соответствии с МУК 4.2.3963-23 [14] и методическим рекомендациям «Обнаружение и количественный учёт клебсиелл при целевых исследованиях объектов окружающей среды» [15]. Качество воды оценивалось согласно Санитарным правилам и нормам СанПиН 2.1.3684-21 «Санитарно-эпидемиологические требования к содержанию территорий городских и сельских поселений, к водным объектам, питьевой воде и питьевому водоснабжению населения, атмосферному воздуху, почвам, жилым помещениям, эксплуатации производственных, общественных помещений, организации и проведению санитарно-противоэпидемических (профилактических) мероприятий».

Бактерий р. *Klebsiella* идентифицировали с помощью культуральных методов с применением хромогенных сред (среда питательная хромогенная Уриселект, среда КЛЕБСИЕЛЛА 5-АСК), биохимических коммерческих тест-систем (набор «ММТ Е24», системы индикаторные бумажные СИБ набор № 2 для идентификации энтеробактерий) и методом времяпролётной матрично-ассоциированной лазерной масс-спектрометрии, на платформе MALDI-TOF.

Чувствительность 100 штаммов бактерий к 21 АБП определяли диско-диффузионным методом в соответствии с действующими рекомендациями EUCAST (2021) и МУК 4.2.1890-04. Значения индекса MAR для каждого отдельного изолята рассчитывали по следующей формуле: «количество препаратов, к которым изолят устойчив / общее количество протестированных антибиотиков» [16]. Оценка степени микробного риска, связанной с условиями централизованного хозяйственно-питьевого водоснабжения, нецентрализованного водоснабжения и рекреационным водопользованием выполнена в соответствии рассчитывалась согласно методическим рекомендациям «Комплексная оценка риска возникновения бактериальных кишечных инфекций, передаваемых водным путем» (2012) [17].

Результаты и их обсуждение

По результатам биохимической идентификации клебсиелл из речной воды были определены виды: *K. oxytoca*, *Klebsiella varicola*, *K. pneumoniae* (рис.1), с преобладанием

последнего. Полученные минимальные (min), максимальные (max) и медианные (Me) значения клебсиелл в сравнении с нормативным показателем ОКБ (для зон рекреации и водозаборов) позволяют получить объективное представление о степени загрязнения воды этими микроорганизмами. Так, в акваториях пляжей содержание клебсиелл превышает допустимый уровень ОКБ, при этом медианное значение в 1,24 раза выше нормативных требований (рис.2).



Рис.1 Колонии *K. pneumoniae* на среде Эндо

Анализ сезонного распространения ОКБ в зонах водозаборов показал высокий уровень колиформных бактерий в период с августа по сентябрь 2024 г. (рис. 3), что коррелирует с увеличением числа клебсиелл в указанный временной интервал.

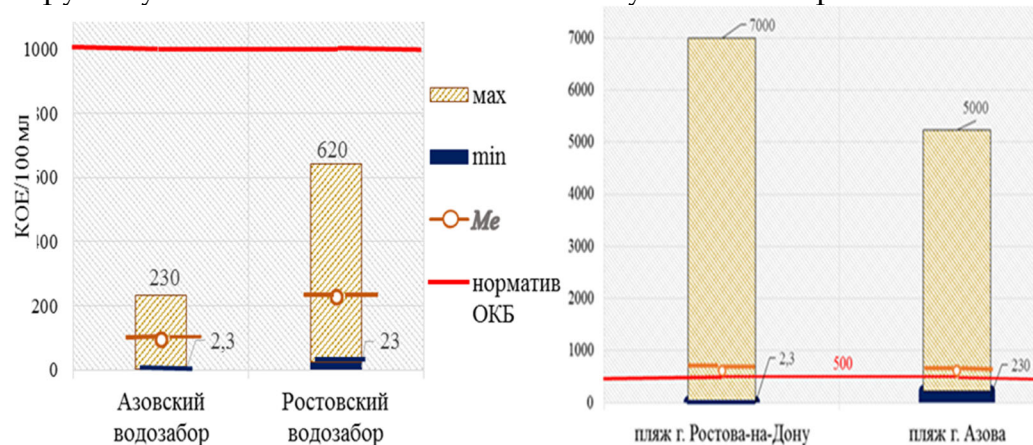


Рис.2 Интервалы количественного содержания *K. pneumoniae* в воде р. Дон (зоны водозаборов, городских пляжей)

Сверхнормативный уровень загрязнения обобщенными колиформными бактериями воды в акваториях пляжей (рис. 4) свидетельствует о высокой степени микробного риска распространения водообусловленных инфекционных нозологических форм, особенно в контексте участия *K. pneumoniae*. Необходимо отметить распространение множественной лекарственной устойчивости среди половины изолятов *K. pneumoniae*, обнаруженных в речных водах. Превышение порогового значения индекса MAR ($\geq 0,2$) у 51 % (42/82) изолятов, может свидетельствовать по данным Крамперман П.Х. (1983) [18] об поступлении фекального загрязнения из источников с широким применением антимикробных средств.

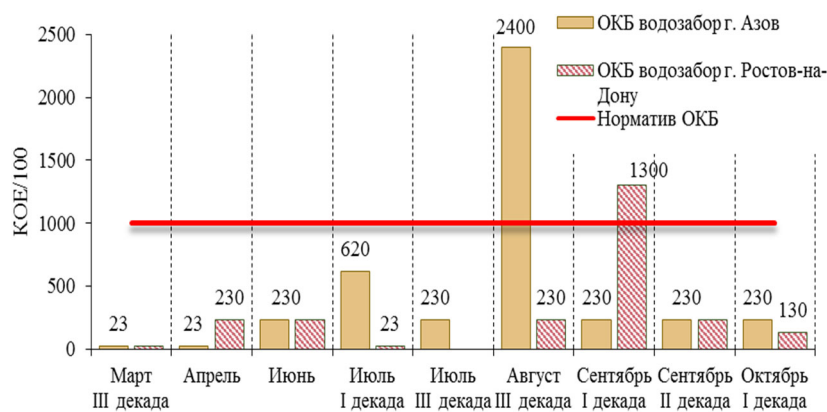
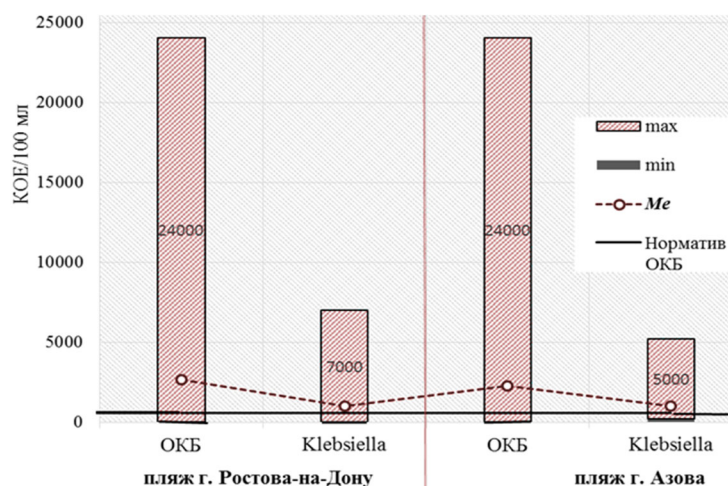


Рис. 3 Сезонная динамика содержания ОКБ в воде р. Дон (зоны водозаборов)

Рис. 4 Интервалы количественного содержания ОКБ и *K. pneumoniae* в акваториях пляжей р. Дон

В ходе санитарно-бактериологического исследования воды восьми родников было обнаружено, что в трех из них содержание клебсиелл составляет от 60 до 230 КОЕ/100 мл. Кроме того, установлено наличие ОКБ и *E. coli* в диапазоне от 230 до 620 КОЕ/100 мл. Полученные данные указывают на наличие фекального загрязнения воды и «высокую» степень микробного риска. Данная проблема обусловлена отсутствием централизованной канализации в частном секторе, который расположен в непосредственной близости от родников, что повышает вероятность загрязнения подземных источников. Особое внимание следует уделить абсолютной устойчивости выделенных штаммов клебсиелл к аминопенициллинам с ингибитором бета-лактамазы. Согласно данным I.L. Miftode с соавторами, постоянное и зачастую нецелесообразное применение различных β -лактамных антибиотиков на энтеробактерии, способствует возникновению динамических мутаций и увеличенной продукции β -лактамаз и приводит к формированию множественной устойчивости даже к цефалоспорином третьего поколения [19]. В рамках нашего исследования было выявлено, что 10 из 13 протестированных штаммов оказались устойчивыми к цефоперазону, цефтазидиму, цефиксиму и цефтибутену, при этом половина из них проявляла резистентность к цефтриаксону. Индексы MAR варьировались в широком диапазоне от 0,14 до 1,0, со средним значением 0,47.

Результаты микробиологического анализа водопроводной воды г. Азова показали, что на трех участках распределительной сети степень микробного риска в марте и августе 2024 г. оценивается как «средняя». Установлено несоответствие 5,7% проб по показателю ОКБ. Средний индекс составил 7,1 КОЕ/100 мл. При этом *K. pneumoniae* был единственным видом колиформных бактерий, обнаруженным в пробах. Штаммы характеризовались высоким уровнем резистентности к бета-лактамным препаратам. Устойчивость к

аминопенициллинам с ингибитором бета-лактамазы (амоксициллин /клавулат, тикарциллин/клавулат) установлена в 100% случаев, а к цефалоспорином в диапазоне от 77% до 100%. Значения индекса MAR для протестированных штаммов колебались в пределах от 0,47 до 0,76.

Выделение клебсиелл в ассоциации с спорами СРК, бациллами (*Bacillus arsenicus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus spp.*), стафилококками (*Staphylococcus warneri*, *Staphylococcus hominis*) и *Aeromonas veronii*, учитывая отсутствие микробной контаминации воды перед поступлением в распределительную сеть, может указывать на возможное повреждение или физический износ коммунальных водопроводных трубопроводов на участке до поступления воды к потребителю.

Выводы. Таким образом, вода акваторий ростовского и азовского городских пляжей, а также трех из восьми родников, расположенных на территории г. Ростова-на-Дону, характеризуется высокой степенью микробного риска распространения водобуловленных ОКИ, особенно в контексте участия *K. pneumoniae*. Обнаружение в родниках, речной (водозаборы, зоны рекреации) и водопроводной воде клебсиелл с высоким индексом MAR указывает на распространение штаммов из источников с широким применением антимикробных препаратов и представляет потенциальную угрозу общественному здоровью.

Список литературы:

1. Даубнер И., Ежова Э. Гигиенические аспекты оценки качества воды по микробиологическим показателям // Гигиена и санитария. – 1989. – № 1. – С. 58–60.
2. WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, 4th ed. Vol. 1: Recommendations. Geneva: World Health Organizations; 2011. 564 p.
3. Распространение бактерий рода *Klebsiella* в водных объектах и их роль в возникновении острых кишечных инфекций, связанных с водой / Ю. А. Рахманин, Л.В. Иванова, Т.З. Артемова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2016. – Т. 95, №. 4. – С. 397-406.
4. Чеботарь И. В. и др. Почему *Klebsiella pneumoniae* становится ведущим оппортунистическим патогеном // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2020. – Т. 22. – №. 1. – С. 4-19.
5. Ларцева, Л. В. Сравнительная оценка санитарно-гигиенической значимости клебсиелл, выделенных из клинического материала и гидрозкосистем (Обзор литературы) / Л.В. Ларцева, О.В. Обухова // Астраханский вестник экологического образования. – 2020. – № 2(56). – С. 143-154. – DOI 10.36698/2304-5957-2020-19-2-143-154.
6. Мониторинг *Klebsiella pneumoniae* как один из критериев микробиологической характеристики водного объекта / А.С. Калужин, А.Л. Байракова, М.А. Морозова [и др.] // Гигиена и санитария. – 2024. –Т. 103, № 3. – С. 234-241. DOI 10.47470/0016-9900-2024-103-3-234-241
7. Результаты мониторинга антибиотикорезистентности и биологических свойств изолятов *Klebsiella pneumoniae* из поверхностных водоемов на территории Ростовской области / М.А. Морозова, Н.В. Алексанина, П.В. Журавлев [и др.] // Актуальные вопросы эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными заболеваниями на юге России. Ермольевские чтения: сборник материалов межрегиональной научно-практической конференции и конференции

- молодых ученых, Ростов-на-Дону, 26 сентября 2024 года. – Ростов-на-Дону. 2024. – С. 211-216
8. Молекулярная характеристика изолятов *Klebsiella pneumoniae* выделенных в поверхностных водах г. Ростов-на-Дону / А. С. Калужин, А. Л. Байракова, М. А. Морозова [и др.] // Актуальные проблемы болезней, общих для человека и животных: материалы V Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Ставрополь, 24-25 апреля 2024 года, 2024. – С. 179-181.
 9. First evidence of KPC-producing ST258 *Klebsiella pneumoniae* in river water / Jelić, M., Hrenović, J., Dekić, S. [et al.] // *Journal of hospital infection*. – 2019. – 103(2). – P.147-150. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.04.001>
 10. Niemelä, S.I., Vääänen, P. Survival in lake water of *Klebsiella pneumoniae* discharged by a paper mill // *Applied and Environmental Microbiology*. – 1982. – 44(2). – P. 264-269.
 11. Журавлев П.В. Динамика выживаемости *K. pneumoniae* и *P. aeruginosa* в водной среде в экспериментальных условиях // *Гигиена и санитария*. – 1991. – №7. – С.27-28
 12. МУК 4.2.1890-04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
 13. Методические рекомендации. Обнаружение и количественный учёт клебсиелл при целевых исследованиях объектов окружающей среды. – Минздрав СССР. – М., 1982. – 8 с.
 14. ГОСТ Р 59024-2020. Вода. Общие требования к отбору проб. – М.: Стандартинформ. 2020. – 35 с.
 15. ГОСТ 31942-2012 (ИСО 1948:1996). Вода. Отбор проб для микробиологического анализа. – М.: Стандартинформ. 2013. – 23 с.
 16. Методические указания МУК 4.2.3963-23 «Бактериологические методы исследования воды» (утв. Федеральной службой по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека 1 сентября 2023 г.). – М., 2023. – 129 с.
 17. Комплексная оценка риска возникновения бактериальных кишечных инфекций, передаваемых водным путем: Методические рекомендации. – М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2012. – 47 с.
 18. Osundiya O.O., Oladele R.O., Oduyebo O.O. Multiple antibiotic resistance (MAR) indices of *Pseudomonas* and *Klebsiella* species isolates in Lagos University Teaching Hospital // *African Journal of Clinical and Experimental Microbiology*. –2013. – 14(3). – P.64-168.
 19. Insights into multidrug-resistant *K. pneumoniae* urinary tract infections: From susceptibility to mortality / I.L. Miftode, E.V. Nastase, R.-Ş. Miftode [et al.] // *Exp. Ther. Med.* – 2021. –Vol. 22, № 4. – P.1086. DOI: 10.3892/etm.2021.10520

References:

1. Daubner I., Yezhova E. Hygienic aspects of water quality assessment by microbiological indicators // *Hygiene and Sanitation*. – 1989. – No. 1. – P. 58–60.
2. WHO Guidelines for Drinking-Water Quality, 4nd ed. Vol. 1: Recommendations. Geneva: World Health Organizations; 2011. P.564

3. Distribution of bacteria of the Klebsiella strain in water objects and their value in developing of the water caused acute intestinal infections / Yu. A. Rakhmanin, L. V. Ivanova, T. Z. Artemova [et al.] // Hygiene and Sanitation. – 2016. –Vol. 95, No. 4. – P. 397-406.
4. Chebotar I. V. et al. Why Klebsiella pneumoniae is becoming a leading opportunistic pathogen // Clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy. - 2020. – Vol. 22. – No. 1. – P. 4-19.
5. Lartseva, L. V. Comparative assessment of the sanitary and hygienic significance of Klebsiella isolated from clinical material and hydroecosystems (Literature review) / L. V. Lartseva, O. V. Obukhova // Astrakhan Bulletin of Environmental Education. –2020. –No. 2 (56). – P. 143-154. DOI 10.36698/2304-5957-2020-19-2-143-154.
6. Monitoring of Klebsiella pneumoniae as one of the criteria for microecological characteristics of a water body / A.S. Kalyuzhin, A.L. Bayrakova, M.A. Morozova [et al.] // Hygiene and Sanitation. – 2024. –V. 103, No. 3. –P. 234-241. DOI 10.47470/0016-9900-2024-103-3-234-241
7. Results of monitoring antibiotic resistance and biological properties of Klebsiella pneumoniae isolates from surface water bodies in the Rostov Region / M.A. Morozova, N.V. Aleksanina, P.V. Zhuravlev [et al.] // Current issues of epidemiological surveillance of infectious and parasitic diseases in the south of Russia. Ermolievskie Readings: Collection of Materials of the Interregional Scientific and Practical Conference and Conference of Young Scientists, Rostov-on-Don, September 26, 2024. – Rostov-on-Don. 2024. – P. 211-216
8. Molecular Characteristics of Klebsiella pneumoniae Isolates Obtained in Surface Waters of Rostov-on-Don / A. S. Kalyuzhin, A. L. Bayrakova, M. A. Morozova [et al.] // Actual Problems of Diseases Common to Humans and Animals: Materials of the V All-Russian Scientific and Practical Conference with International Participation, Stavropol, April 24-25, 2024. – P. 179-181.
9. First evidence of KPC-producing ST258 Klebsiella pneumoniae in river water / Jelić, M., Hrenović, J., Dekić, S. [et al.] // Journal of hospital infection. – 2019. – 103(2). – P.147-150. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2019.04.001>
10. Niemelä, S.I., Vääänen, P. Survival in lake water of Klebsiella pneumoniae discharged by a paper mill // Applied and Environmental Microbiology. – 1982. – 44(2). – P. 264-269.
11. Zhuravlev P.V. Dynamics of survival of K. pneumoniae and P. aeruginosa in the aquatic environment under experimental conditions // Hygiene and Sanitation. – 1991. –No. 7. – P. 27-28
12. МУК 4.2.1890-04. Determination of the sensitivity of microorganisms to antibacterial drugs: Methodological guidelines. –М.: Federal Center for State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Ministry of Health of the Russian Federation, 2004. – 91 p.
13. Methodological recommendations. Detection and quantitative accounting of Klebsiella in targeted studies of environmental objects. – USSR Ministry of Health. – М., 1982. – 8 p.
14. GOST R 59024-2020. Water. General requirements for sampling. – М.: Standartinform. 2020. –35 p.
15. GOST 31942-2012 (ISO 1948:1996). Water. Sampling for microbiological analysis. – М.: Standartinform. 2013. – 23 p.

16. Methodical instructions MUK 4.2.3963-23 "Bacteriological methods for water analysis" (approved by the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing on September 1, 2023). М., 2023. – 129 p.
17. Comprehensive assessment of the risk of bacterial intestinal infections transmitted by water: Methodical recommendations. -- М.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2012. – 47 p.
18. Osundiya O.O., Oladele R.O., Oduyebo O.O Multiple antibiotic resistance (MAR) indices of Pseudomonas and Klebsiella species isolates in Lagos University Teaching Hospital // African Journal of Clinical and Experimental Microbiology. –2013. – 14(3). – P.64-168.
19. Insights into multidrug-resistant K. pneumoniae urinary tract infections: From susceptibility to mortality / I.L. Miftode, E.V. Nastase, R.-Ş. Miftode [et al.] // Exp. Ther. Med. – 2021. –Vol. 22, № 4. – P.1086. DOI: 10.3892/etm.2021.10520