

Читать
онлайн
Read
online

Пай Г.В., Ракитина Д.В., Панькова М.Н., Федец З.Е., Мания Т.Р.,
Загайнова А.В., Юдин С.М.

ПЦР-анализ присутствия вирулентных генов в изолятах *E. coli* из внешней среды в сравнении с изолятами из кала здоровых и больных воспалительными заболеваниями кишечника людей

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

Введение. Патогенные *Escherichia coli* являются значительной угрозой здоровью человека. Передача этого патогена осуществляется в том числе через объекты водной среды, окружающие человека.

Цель исследования — оценка наличия патогенных *E. coli* в поверхностных и сточных водах. Изоляты из скважин, сточных вод, вод бассейнов и поверхностных водных источников сравнивали с изолятами из кала здоровых людей и людей с воспалительными заболеваниями кишечника.

Материалы и методы. Для выявления генетических детерминант потенциальной вирулентности использовали метод ПЦР. Признаками патогенности были выбраны 19 вирулентных генетических детерминант: 11 токсинов, 5 адезинов и инвазинов и 2 патогенных серотипа. ПЦР-детекцию генов антибиотикорезистентности карбапенемаз и детекцию патотипов *E. coli* проводили с помощью коммерческих наборов «Амплиценс» согласно протоколу производителя. Проанализировано 47 изолятов *E. coli*, выделенных из водных объектов окружающей среды (ВООС), 44 изолята из кала практически здоровых людей, 43 изолята из кала больных воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК).

Результаты. В целом выявлено сходство группы ВООС и группы, выделенной от здоровых людей. В этих группах выявили 2 типа патогенных детерминант — токсины CNF1, CNF2 и инвазин e1p. Значительно отличаются от этих групп изоляты группы ВЗК. Только в этой группе детектированы регулятор адезии aggR, инвазивный плазмидный антиген irpH, гемолизин hly и ген антибиотикоустойчивости NDM. Ген CNF1 выявлялся среди ВЗК достоверно чаще, чем в других группах. Единственный выявленный патотип *E. coli*, энтероагрегационный, присутствовал исключительно среди изолятов этой группы.

Ограничения исследования. В рамках данного исследования не удалось сравнить между собой различные объекты внешней среды (поверхностные воды и сточные, объекты очистных сооружений и т. д.) по патогенному бактериальному потенциалу в силу недостаточной представленности каждого типа таких объектов в анализируемой выборке. Это будет предметом наших дальнейших исследований.

Заключение. Патогенный потенциал изолятов *E. coli* из водных источников близок к таковому у изолятов из кала здоровых людей.

Ключевые слова: *Escherichia coli*; вирулентность; металло-β-лактамаза NDM-типа; поверхностные воды; сточные воды; воспалительные заболевания кишечника

Соблюдение этических стандартов: исследование биологического материала от людей было одобрено Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 98А заседания Локального независимого этического комитета ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России от 16.07.2018 г.).

Для цитирования: Пай Г.В., Ракитина Д.В., Панькова М.Н., Федец З.Е., Мания Т.Р., Загайнова А.В., Юдин С.М. ПЦР-анализ присутствия вирулентных генов в изолятах *E. coli* из внешней среды в сравнении с изолятами из кала здоровых и больных воспалительными заболеваниями кишечника людей. *Гигиена и санитария*. 2022; 101(5): 503–510. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-503-510>

Для корреспонденции: Мания Тамари Резовна, науч. сотр. лаб. микробиологии и паразитологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, 119121, Москва, Россия. E-mail: TManiya@csp.mz.ru

Участие авторов: Пай Г.В. — концепция и дизайн исследования, выполнение экспериментальной работы, статистическая обработка, написание текста, редактирование; Ракитина Д.В. — выполнение экспериментальной работы, написание текста, редактирование; Панькова М.Н. — сбор и обработка материала, выделение изолятов и посев культур; Федец З.Е. — сбор и обработка материала, выделение изолятов и посев культур; Мания Т.Р. — редактирование; Загайнова А.В. — редактирование; Юдин С.М. — редактирование. Все соавторы — утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов в связи с публикацией данной статьи.

Финансирование. Исследование проведено в рамках НИР «Разработка технологий криоконсервации и архивирования биообразцов микробиологических ресурсов человека (шифр «Криобанк»)», № АААА-А18-118020590091-2, НИР «Разработка унифицированных методов, включающих отбор проб, для осуществления определения микробиологического и паразитологического загрязнения сточных вод» (шифр «Сточные воды») № АААА-А21-121011190012-3.

Поступила: 01.03.2022 / Принята к печати: 12.04.2022 / Опубликована: 31.05.2022

Galina V. Pay, Darya V. Rakitina, Marina N. Pankova, Zlata E. Fedez, Tamari R. Maniya,
Angelika V. Zagaynova, Sergey M. Yudin

PCR analysis of the presence of virulent genes *E. coli* isolates from external environmental in comparison with isolates from feces of healthy people and patients with inflammatory bowel diseases

Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russian Federation

Introduction. Pathogenic *Escherichia coli* presents a real threat to human health. One of the ways of transmission of these isolates is via environmental water sources. Therefore, evaluation of pathogenic potential of *E. coli* population in water is of great interest.

Purpose of the study was to compare *E. coli* isolates from wells, sewers, water pools and surface waters with two control groups — “non-pathogenic” isolates from feces of healthy people and “potentially pathogenic” from feces of people with inflammatory bowel diseases (IBD).

Materials and methods. PCR-assay was used to detect potential virulence genes. 19 *E. coli* virulence genes were analyzed: 11 toxins, 5 adhesion and invasion proteins and 2 diarrheogenic serotypes. The PCR identification of carbapenemase genes and various *E. coli* pathotypes was performed with the commercial “Amplisense” kits according to the manufacturer’s instruction. The assay was performed on 47 *E. coli* isolates from water environmental sources (WES), 44 isolates from feces of “practically healthy” people, 43 isolates from feces from IBD patients.

Results. Isolates from WES were found to be similar to the group of isolates from healthy people. Only 2 types of virulence *E. coli* were detected in these groups – toxins CNF1 and 2 and invasin *invA*. IBD group of isolates demonstrated striking difference from the others. Only IBD isolates demonstrated such genes as adhesion regulator *aggR*, invasive antigen *ipaH*, hemolysin *hly* and antibiotic resistance gene *NDM*. *CNF1* gene was found in IBD group significantly more often, than in two other groups. The only pathotype detected in the samples analyzed, enteroaggregative, was limited to the IBD group, too.

Limitations. To compare the pathogenic potential of *E. coli* from human feces and environment, 134 isolates were tested for 19 pathogenic genetic determinants, which is a representative selection. Within the analysis, we were unable to compare bacterial pathogenic potential from various environmental sources (surface waters and sewage, treatment facilities etc.) due to the uneven representation of these objects in the selection. It will be the subject of our future studies.

Conclusion. Pathogenic potential of *E. coli* isolates from environmental water sources was close to that from healthy human feces.

Keywords: *Escherichia coli*; virulence; metallo- β -lactamase *NDM*; surface waters; sewage waters; IBD

Compliance with ethical standards: the study of biological material from humans was approved by the Local Independent Ethics Committee (Minutes No. 98A of the meeting of the Local Independent Ethics Committee of the Federal State Budgetary Institution “GNCC named after A.N. Ryzhikh” of the Ministry of Health of the Russian Federation dated 16.07.2018).

For citation: Pay G.V., Rakitina D.V., Pankova M.N., Fedez Z.E., Maniya T.R., Zagaynova A.V., Yudin S.M. PCR analysis of the presence of virulent genes *E. coli* isolates from external environmental in comparison with isolates from feces of healthy people and patients with inflammatory bowel diseases. *Gigiena i Sanitariya (Hygiene and Sanitation, Russian journal)*. 2022; 101(5): 503–510. <https://doi.org/10.47470/0016-9900-2022-101-5-503-510> (In Russian)

For correspondence: Tamari R. Maniya, researcher of Microbiology and Parasitology laboratory in the Centre for Strategic Planning of FMBA of Russia, Moscow, 119121, Russia. E-mail: TManiya@cspmpz.ru

Information about authors:

Pay G.V., <https://orcid.org/0000-0001-7086-0899> Rakitina D.V., <https://orcid.org/0000-0003-3554-7690> Maniya T.R., <https://orcid.org/0000-0002-6295-661X>
Pankova M.N., <https://orcid.org/0000-0002-9133-3665> Fedets Z.E., <https://orcid.org/0000-0002-2396-9231>
Zagaynova A.V., <https://orcid.org/0000-0003-4772-9686> Yudin S.M., <https://orcid.org/0000-0002-7942-8004>

Contribution: Pay G.V. – research concept and design, experimental work, statistical processing, text writing, editing. Rakitina D.V. – performing experimental work, writing a text; editing. Pankova M.N., Fedez Z.E. – collection and processing of material, isolation of isolates and sowing of crops. Maniya T.R., Zagaynova A.V., Yudin S.M. – editing. All authors are responsible for the integrity of all parts of the manuscript and approval of the manuscript final version.

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

Acknowledgement. The research was carried out within the framework of the research work “Development of technologies for cryopreservation and archiving of biological samples of human microecological resources (code “Cryobank”)” No. AAAA-A18-118020590091-2, “Development of unified methods, including sampling, for the determination of microbiological and parasitological contamination of wastewater” (code “Wastewater”) No. AAAA-A21-12101190012-3.

Received: March 1, 2022 / Accepted: April 21, 2022 / Published: May 31, 2022

Введение

Escherichia coli классифицируется как палочковидная грамотрицательная бактерия в семействе *Enterobacteriaceae*. Бактерия в основном обитает в нижних отделах кишечника теплокровных животных, включая людей, и часто попадает в окружающую среду через фекалии или сточные воды, где считается индикатором недавнего фекального загрязнения (согласно МУ 2.1.4.1184-03 и МУК 4.2.1884-04^{1,2}). В то же время некоторые штаммы *E. coli* сами выступают как патогенные, вызывающие множество различных заболеваний человека, в результате чего ежегодно умирают миллионы людей [1]. Есть сообщения об обнаружении в поверхностных водах таких патогенов *кишечной палочки*, как энтерогеморрагические (ЕНЕС, в том числе диаррогенные серотипы (например, O157:H7 [2]), энтеротоксигенные (ЕТЕС) [3], энтеропатогенные (ЕРЕС) [4, 5], энтероагрегирующие (ЕАЕС) [6] и шига-токсин-продуцирующие (СТЕС, в почвенных водах) [7].

Фактором патогенности микробов, вызывающим всё большую озабоченность, является их устойчивость и мультиустойчивость к антибиотикам – продукция карбапенемаз, бета-лактамаз, оксациллиназ и др. Из стран с различным климатом и отличающейся практикой оборота антибиотиков и медицинских отходов сообщается о выделении антибиотикоустойчивых *E. coli* из разных водных источников. Среди них, например, поверхностные воды (более 60% изолятов, Швеция [8]; 11% образцов, Швейцария [9]; 0,06% изо-

лятов, Великобритания; 2,5% образцов, Южная Корея [10]), питьевая вода (до 6% источников, Ливан [11]), ирригационные воды (17%, Эквадор [12]), сточные воды больниц (Испания) [13] и т. д. Показательно сообщение [14] об отсутствии Нью-Дели бета-лактамаз в образцах из Великобритании при наличии их в 4% образцов питьевой воды и в 30% образцов поверхностных вод в Индии.

Дополнительная опасность нахождения патогенных *E. coli* в окружающей среде заключается в том, что вода, почва и очистные сооружения считаются бактериальными генетическими реакторами, в которых может происходить активный генетический обмен между различными бактериями [15]. Насчёт активности жизненных процессов *E. coli* во внешней среде существуют разные мнения – как за [16], так и против [17]. Но для других представителей семейства *Enterobacteriaceae*, например *Klebsiella*, однозначно показаны, с одной стороны, активное размножение во внешней среде [18], а с другой – возможность передачи мобильных элементов генома к *E. coli* путём горизонтального переноса [19]. При этом именно в мобильных элементах генома (плазмидах, транспозонах и т. д.) содержатся гены устойчивости к лекарствам и патогенные детерминанты, повышающие способность бактерии колонизовать кишечник хозяина [20].

На основании вышеизложенного произведено исследование вирулентного потенциала штаммов *E. coli*, обнаруженных во внешней среде (в том числе в сточных и поверхностных водах), выделенных от здоровых лиц и от больных с воспалительными заболеваниями кишечника (в частности, с язвенным колитом). Полученные результаты могут представлять не только научный интерес, но и практическую значимость для клиницистов и врачей-эпидемиологов, поскольку роль окружающей среды для штаммов *E. coli* в отношении распространения устойчивости к антибиотикам и вирулентности в естественной среде в настоящее время недостаточно изучена и требует уточнения в будущем.

¹ МУ 2.1.4.1184-03 «Методические указания по внедрению и применению санитарно-эпидемиологических правил и нормативов СанПиН 2.1.4.1116-02 “Питьевая вода. Гигиенические требования к качеству воды, расфасованной в ёмкости. Контроль качества”».

² МУК 4.2.1884-04 «Санитарно-микробиологический и санитарно-паразитологический анализ воды поверхностных водных объектов».

Материалы и методы

Изоляты и пациенты. Изоляты *E. coli* выделены культуральным методом на плотных дифференциальных средах (Эндо (HiMedia), Агар ВСР (Conda), Chromocult Coliform Agar (Merk)) из человеческого кала и образцов сточных и поверхностных вод. Видовую идентификацию изолятов проводили методом матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации с времяпролётной масс-спектрометрией (MALDI-TOF MS) на анализаторе Microflex MALDI-TOF MS (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) с использованием базы бактериальных белковых спектров и программного обеспечения MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) согласно протоколу производителя.

Образцы кала получены из ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России. Забор и исследование биологического материала от людей одобрены Локальным независимым этическим комитетом (протокол № 98А заседания Локального независимого этического комитета ФГБУ «ГНЦК им. А.Н. Рыжих» Минздрава России от 16.07.2018 г.).

Критериями включения для группы практически здоровых людей являлись: возраст старше 18 лет, отсутствие жалоб на проблемы, связанные с желудочно-кишечным трактом, нормальный стул, отсутствие антибиотикотерапии в течение последних трёх месяцев. Критерии включения в группу пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК): возраст старше 18 лет, диагностированное гастроэнтерологом ВЗК (язвенный колит или болезнь Крона), отсутствие антибиотикотерапии в течение последних трёх месяцев. Все пациенты дали письменное информированное согласие на сбор материала и проведение исследования.

Образцы воды из водных объектов окружающей среды (ВООС) отбирали на территории г. Москвы и Московской области. Образцы сточных вод отбирали внутри станций аэрации (Курыновской, Зеленоградской, Люберецкой, Подольской) на разных стадиях очистки 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».

Все выделенные изоляты хранились в рабочей коллекции ФГБУ «ЦСП» ФМБА в среде для длительного хранения живых бактериальных клеток в условиях низких температур (патент на изобретение № 2019128097 от 06.09.2019 г.) при температуре минус 70 °С.

В данной работе исследованы 47 изолятов *E. coli*, выделенных из ВООС (скважин, сточных вод, вод бассейнов и из поверхностных водных источников), 44 изолята, выделенные из кала практически здоровых людей, 43 штамма – из кала больных воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК). *Изоляты* проанализированы методом ПЦР на наличие потенциальных генов вирулентности, патогенности и резистентности.

Выделение ДНК. Изоляты, полученные из единичной колонии, после видовой идентификации методом MALDI-TOF MS рассевали на плотной среде штрихом. Культивированные при 37 °С в течение 12–16 ч бактериальные клетки собирали шпателем с поверхности среды, промывали стерильным физраствором, собирали центрифугированием, ресуспендировали в стерильном физрастворе и лизировали 15-минутным прогреванием при 70 °С. Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 10 мин при 3500 g, а надосадочную жидкость, содержащую бактериальную ДНК, использовали для постановки ПЦР.

ПЦР-анализ. ПЦР-анализ производили на приборах Bio-Rad Thermal Cycler T100 и Bio-Rad Real-Time PCR CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) с использованием син-

тетических олигонуклеотидов (табл. 1) и реактивов набора для ПЦР с Таq-полимеразой (PK114, Евроген) согласно протоколу производителя.

Анализ проводили, используя предложенные в литературе наборы олигонуклеотидов, объединённые в мультиплексные наборы для одновременной детекции нескольких генов.

Мультиплексный анализ № 1 на гены *VT1*, *VT2*, *VT2e*, *eaeA*, *CNF1*, *CNF2*, *eagg*, *einv*, *LTI*, *STI*, *STII* проводили при следующих условиях реакции: 5 циклов (плюс 95 °С, время 30 с; плюс 72 °С, время 1 мин), 20 циклов (плюс 95 °С, время 30 с; плюс 63 °С, время 30 с; плюс 72 °С, время 30 с), затем 5 мин инкубации при плюс 72 °С [21].

Мультиплексный анализ № 2 на гены *stx1*, *stx2*, *hlyA*, *sero-typin O157*, *O11* проводили при следующих условиях реакции: 35 циклов (1 мин при температуре плюс 95 °С; 2 мин при температуре плюс 65 °С (в течение 10 циклов, затем температура снижается до плюс 60 °С к 15-му циклу), затем 1,5 мин при температуре плюс 72 °С (стадия элонгации удлиняется до 2,5 мин с 25-го цикла по 35-й) [22].

Мультиплексный анализ № 3 на гены *aggR* и *ipaH* проводили следующим образом: 30 циклов (температура плюс 95 °С в течение 1 мин; плюс 52 °С в течение 1 мин; плюс 72 °С в течение 1 мин), плюс 72 °С в течение 10 мин [23].

Мультиплексный анализ № 4 на наличие предположительно патогенных генов, характерных для *Klebsiella pneumoniae* (*entB*, *ybtS*, *iutA*, *kfu*, *mrkD*, *magA*, *rmpA*, *k2*, *alls*), использовал следующую программу: 15 мин при температуре плюс 95 °С, 30 циклов (плюс 95 °С, время 30 с; плюс 60 °С, время 90 с; плюс 72 °С, время 60 с), финальная стадия элонгации – температура плюс 72 °С, время 10 мин [24].

Мультиплексный анализ № 5 на гены *chuA*, *ybtS* и *TSPE4*. С2 для определения филогрупп *E. coli*, как предложено [25], проводили следующим образом: 5 мин при температуре плюс 94 °С; 30 циклов (30 с при температуре плюс 94 °С; 30 с при температуре плюс 55 °С; 30 с при температуре плюс 72 °С) и финальная достройка при температуре плюс 72 °С в течение 7 мин.

Продукты реакций детектировали методом электрофореза в 1,2%-м агарозном геле на буфере ТВЕ (трис-борат-ЭДТА) с окрашиванием бромистым этидием. Детекцию производили с помощью системы гель-документации BioRad Gel Doc XR+ (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Анализ на наличие генов резистентности к антибиотикам проводили с использованием коммерческих наборов «АмплиСенс® MDR MBL-FL» (гены *IMP*, *NDM*, *VIM*), «АмплиСенс® MDR KPC/OXA-48-FL» (гены *KPC*, *OXA-48*) производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора в соответствии с инструкцией производителя.

Скрининг в группах изолятов на наличие определенных диарогенных патотипов *E. coli* (*EPEC*, *EPEC*, *EIEC*, *EHEC*, *EAgEC*) проводили с использованием набора «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» («АмплиСенс®») производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора согласно инструкции производителя.

Детекцию флуоресцентных продуктов реакции коммерческих наборов проводили при помощи Bio-Rad Real-Time PCR CFX96 (Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Статистический анализ. Анализ статистической достоверности различий представленности патогенных детерминант между группами изолятов проводили с помощью программного обеспечения Statistica (Statsoft, Dell) методом критерия согласия Пирсона (χ^2) [26].

Результаты

Анализ наличия вирулентных генов, характерных для *E. coli*. При анализе 134 изолятов *E. coli* на наличие 19 патогенных генетических детерминант обнаружено всего 6 генов (*CNF1*, *CNF2*, *einv*, *hlyA*, *aggR*, *ipaH*). В наших выборках отсутствовали гены, продуцирующие энтеротоксины, такие как *VT1*, *VT2*, *VT2e*, *LTI*, *STI*, *STII*, *stx1*, *stx2*. Также нами не найдены провоцирующие диарею серотипы *O157* и *O11* и ген интимина *eaeA*.

Таблица 1 / Table 1

Используемые в работе последовательности для синтетических олигонуклеотидов
Specific oligonucleotides sequences used in PCR assay

Ген Gene	Функция Function	Название и последовательность олигонуклеотидов Oligonucleotide name and sequence	Источник, год Reference, year
<i>Адгезия и инвазия / Adhesion and invasion</i>			
<i>aggR</i>	Регулятор адгезии Adhesion regulator	AggRkas2 ACAGAATCGTCAGCATCAGC AggRks1 GTATACACAAAAGAAGGAAGC	Томы и соавт. (Toma et al.), 2003
<i>ipaH</i>	Инвазивный плазмидный антиген Invasive plasmid antigene	IpaH1 GTTCCTTGACCGCCTTTCCGATACCGTC IpaH2 GCCGGTCAGCCACCCTCTGAGAGTAC	Томы и соавт. (Toma et al.), 2003
<i>eaeA</i>	Интимин (адгезия) Intimin adhesion	eaeA-f TGAGCGGCTGGCATGATCATA eaeA-r TCGATCCCCATCGTCACCAGAGG	Pass и соавт. (Pass et al.), 2000
<i>eagg</i>	Энтероагрегация Enterocoaggregation	Eagg-f AGACTCTGGCGAAAGACTGTATC Eagg-r ATGGCTGTCTGTAATAGATGAGAAC	Pass и соавт. (Pass et al.), 2000
<i>Einv</i>	Инвазия Invasion	Einv-f TGGAAAAACTCAGTGCCTCTGCGG Einv-r TTCTGATGCCTGATGGACCAGGAG	Pass и соавт. (Pass et al.), 2000
<i>Токсины / Toxins</i>			
<i>VT1, VT2, VT2e</i>	Веротоксин тип 1,2,2e Verotoxin type 1,2,2e	VT1-f ACGTTACAGCGTGTTCGRGGGATC VT1-r TTGCCACAGACTGCGTCAGTRAGG VT2-f TGTGGCTGGGTTTCGTTAATACGGC VT2-r TCCGTTGTCATGGAAACCGTTGTC VT2e-f CCAGAAATGTCAGATAACTGGCGAC VT2e-r GCTGAGCACTTTGTAACAATGGCTG	Paton и соавт. (Paton et al.), 1998
<i>CNF1, CNF2</i>	Токсин, влияет на актиновый цитоскелет хозяина, адгезия Toxin influencing host cytoskeleton, adhesion	CNF1-f GGGCACAATGCAGTATTGCTTGG CNF1-r GACGTTGGTTGCGGTAATTTTGGG CNF2-f GTGAGGCTCAACGAGATTATGCACTG CNF2-r CCACGCTTCTTCTTCAGTTGTTCCCT	Paton и соавт. (Paton et al.), 1998
<i>LTI</i>	Термолabile энтеротоксин, подобен холерному токсину по структуре и функциям Thermolabile enterotoxin similar to cholera toxin	LTI-f TGGATTTCATCATGCACCACAAGG LTI-r CCATTTCTCTTTTGCCTGCCATC	Paton и соавт. (Paton et al.), 1998
<i>STI, STII</i>	Термостабильный энтеротоксин тип 1,2 Thermostable	STI-f TTTCCCTCTTTTGTAGTCAGTCAACTG STI-r GGCAGGATTACAACAAGTTCACAG STII-f CCCCTCTCTTTTGCATTTCTTTCC STII-r TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACC	Paton и соавт. (Paton et al.), 1998
<i>stx1, stx2</i>	Шига токсина Shiga-toxin	stx1F ATAATCGCCATTCGTTGACTAC stx1R AGAACGCCCACTGAGATCATC stx2F GGCAGTGTCTGAAACTGCTCC stx2R TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	Paton и соавт. (Paton et al.), 1998
<i>hlyA</i>	Гемолизин Hemolysin	hlyAF GCATCATCAAGCGTACGTTCC hlyAR AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT	Paton и соавт. (Paton et al.), 1998
<i>Патотипы, патогенные серотипы / Pathotype, pathogenic serotypes</i>			
<i>O157, O11</i>	Патогенный серотип Pathogenic serotype	O111F TAGAGAAATTATCAAGTTAGTTCC O111R ATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC O157F CGGACATCCATGTGATATGG O157R TTGCCTATGTACAGCTAATCC	Paton и соавт. (Paton et al.), 1998
<i>Потенциально патогенные гены Klebsiella pneumoniae / Potentially pathogenic genes of Klebsiella pneumoniae</i>			
<i>entB</i>	Сидерофоры Siderophores	entB_for GTCAACTGGGCCTTTGAGCCGTC entB_rev TATGGGCGTAAACGCCGGTGAT	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>ybtS</i>	Сидерофоры Siderophores	ybtS_for GACGGAAACAGCACGGTAAA ybtS_rev GAGCATAATAAGGCGAAAGA	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>iutA</i>	Сидерофоры Siderophores	iutA_for GGGAAAGGCTTCTCTGCCAT iutA_rev TTATTCGCCACCACGCTCTT	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>kfu</i>	Транспорт железа Iron transporter	kfu_for GGCCTTTGTCCAGAGCTACG kfu_rev GGGTCTGGCGCAGAGTATGC	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>mrkD</i>	Адгезин 3-го типа Adhesin 3 type	mrkD_for AAGCTATCGCTGTACTTCCGG CA mrkD_rev GGCGTTGGCGCTCAGATAGG	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>magA</i>	Гипермукоидный фенотип Hypermucooid phenotype	magA_for GGTGCTCTTTACATCATTGC magA_rev GCAATGGCCATTTGCGTTAG	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>rmpA</i>	Гипермукоидный фенотип Hypermucooid phenotype	rmpA_for CATAAGAGTATTGGTTGACAG rmpA_rev CTTGCATGAGCCATCTTTCA	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>k2</i>	K2 серотип капсулы K2 serotype	K2_for CAACCATGGTGGTTCGATTAG K2_rev TGGTAGCCATATCCCTTTGG	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014
<i>allS</i>	Метаболизм аллантаина Allantoine metabolism	allS_for CATTACGCACCTTTGTCAGC allS_rev GAATGTGTGCGGATCAGCTT	Compain и соавт. (Compain et al.), 2014

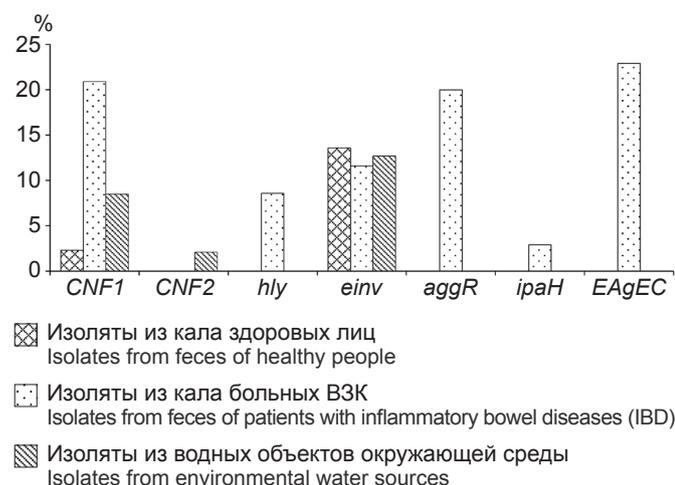


Рис. 1. Процентное содержание патогенных генетических детерминант в группах изолятов *E. coli* различного происхождения.

Fig. 1. Percentage content of virulent genes in *E. coli* isolates from various sources: «1» – isolates from feces of healthy people.

Результаты исследования представлены на рис. 1 и в табл. 2. Изоляты, выделенные из ВООС, статистически ($p > 0,05$) оказались неразличимы с изолятами, выделенными из кишечной микробиоты практически здоровых людей. В этих группах выявили два типа патогенных детерминант: *CNF1* и *CNF2*, а также *einv*. Значительно отличались от этих групп изоляты группы ВЗК. Только в ней был детектирован регулятор адгезии (*aggR*) (20%), инвазивный плазмидный антиген (*ipaH*) (2,9%) и гемолизин (*hly*) (8,6%). Ген *CNF1* выявляли в группе ВЗК чаще, чем в других группах.

ПЦР-скрининг имеющейся выборки для выявления патотипов *E. coli* показал наличие только EAgEC (энтероагрегационных) генетических признаков и только в группе изолятов от лиц с ВЗК (22,9%) (см. рис. 1).

Таким образом, группа изолятов от больных ВЗК выделяется тем, что в ней статистически достоверно чаще встречаются гены *CNF1*, *hly*, *aggR* и признаки патотипа EAgEC (см. табл. 2). К тому же в этой группе в отличие от двух других процент изолятов с патогенными детерминантами выше, чем без таковых: 60 и 40% соответственно.

Анализ наличия вирулентных генов, характерных для *Klebsiella*. При сравнительном анализе распределения и выявления потенциальных факторов патогенности, характерных для *Klebsiella* (рис. 2, табл. 3), в изученных выборках обнаружены все исследуемые гены, за исключением гена *K2* (капсульного серотипа), остальные варианты встречались с разной частотой и статической значимостью. В группе лиц с ВЗК по сравнению с другими группами достоверно чаще выявляли ген *mrkD*, отвечающий за адгезию ген *iutA* (захват и транспорт железа, рецептор аэробактерии). Эта разница оказалась статистически значимой и составила $p < 0,01$ для обоих генов, что вновь подчёркивает обособленность данной группы. Также обращает на себя внимание высокое содержание гена *ybts* во всех изученных выборках (70–93%). Вероятно, наличие сидерофора *ybts* не является патогенным признаком, но принципиально для выживания *E. coli*.

Антибиотикорезистентность. Нами проведён анализ наличия генов металло-β-лактамаз (*IMP*, *VIM*, *NDM*) и β-лактамаз, ингибируемых клавулановой кислотой (*KPC*), и оксацилина расширенного спектра (*OXA-48*) с использованием коммерческого набора. В группе здоровых доноров и изолятах *E. coli* гены антибиотикоустойчивости не выявлены, в группе больных ВЗК 35% изолятов содержали ген *NDM*, причём была обнаружена ассоциация гена *EAgEC* с

Таблица 2 / Table 2

Анализ достоверности различий между изучаемыми группами изолятов по представленности патогенных детерминант
Analysis of the significance of differences between the studied groups of isolates in terms of the presence of pathogenic determinants

Ген Gene	χ^2	Уровень значимости, p Significance level, p	
<i>CNF1</i>	7.3	0.025	< 0.05
<i>CNF2</i>	1.8	0.407	> 0.05
<i>hly</i>	6.1	0.049	< 0.05
<i>einv</i>	0.32	0.852	> 0.05
<i>aggR</i>	14.6	< 0.001	< 0.01
<i>IpaH</i>	1.9	0.37	> 0.05
<i>EAgEC</i>	16.8	< 0.001	< 0.01
<i>NDM</i>	31.1	< 0.001	< 0.01

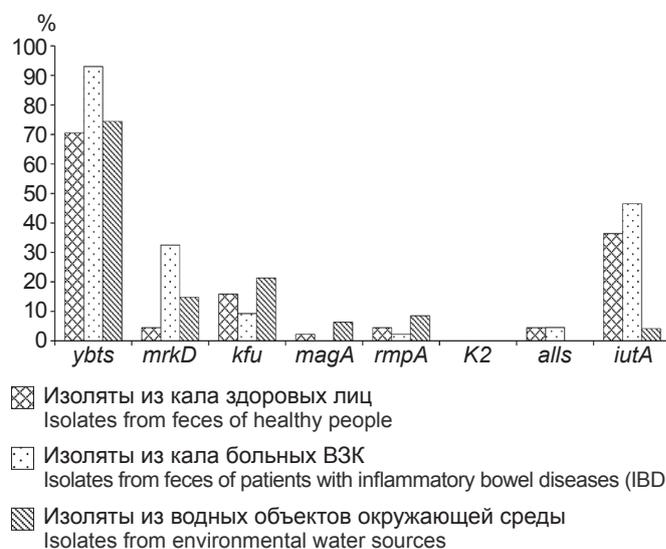


Рис. 2. Процентное содержание патогенных генетических детерминант, характерных для *Klebsiella*, в группах изолятов *E. coli* различного происхождения.

Fig. 2. Percentage content of *Klebsiella* virulence genes in *E. coli* isolates from various sources: «1» – isolates from feces of healthy people.

Таблица 3 / Table 3

Анализ достоверности различий между изучаемыми группами изолятов по представленности патогенных детерминант, характерных для *Klebsiella*

Analysis of the significance of differences between the studied groups of isolates in terms of the presence of pathogenic determinants characteristic of *Klebsiella*

Ген Gene	χ^2	Уровень значимости, p Significance level, p	
<i>Ybts</i>	5.6	0.06	< 0.05
<i>mrkD</i>	10.9	0.005	< 0.01
<i>kfu</i>	2.5	0.286	> 0.05
<i>magA</i>	3.06	2.4	> 0.05
<i>rmpA</i>	3.7	0.16	> 0.05
<i>K2</i>	—	—	—
<i>Alls</i>	2.9	0.29	> 0.05
<i>iutA</i>	22.3	< 0.001	< 0.01

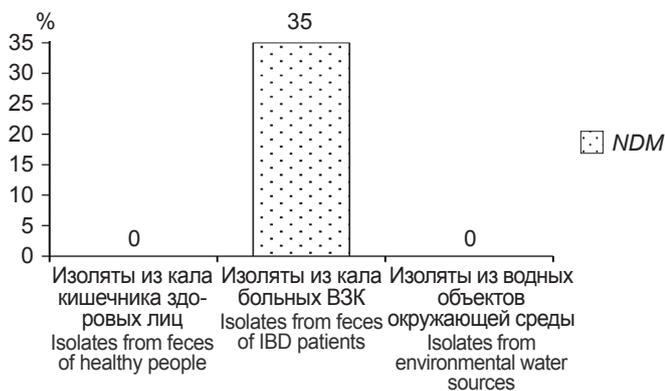


Рис. 3. Процентное содержание генов антибиотикорезистентности в группах изолятов E. coli различного происхождения.

Fig. 3. Percentage content of antibiotic resistance genes in E. coli isolates from various sources: «1» – isolates from feces of healthy people.

геном NDM (рис. 3). Всего выявлено 15 позитивных по NDM изолятов. Все 8 изолятов с наличием генетических детерминант EAgEC содержали ген NDM (3 из них также являются единственными, где был обнаружен hly). Таким образом, E. coli от больных ВЗК несут плазмиды с геном бета-лактамазы расширенного спектра, что не может не настораживать.

Филогенетика различных групп изолятов. Определение филогрупп методом [25] выявило преобладание группы А в имеющейся коллекции образцов (66%), группы В2 и D представлены почти поровну (35 и 27% соответственно), группа В1 – незначительно (4%) (рис. 4, а).

Изоляты из кала здоровых и больных ВЗК людей практически идентичны по составу филогрупп (примерно по одной трети составляют филогруппы А, В2 и D и менее 1% – группа В1). Напротив, в изолятах из ВООС преобладает филогруппа А (80%).

Вирулентные гены различно представлены в разных филогруппах (рис. 4, б). Так, CNF1 и CNF2 почти исключительно встречаются в филогруппе В2, ген IpaH – в филогруппах А и D. Ген einv, патотип EAgEC и ген антибиотикорезистентности NDM обнаруживаются во всех филогруппах, aggR – преимущественно в А (56%), но также и в В2 и D. Среди изолятов без вирулентных генов по сравнению «патогенными» изолятами вдвое больше E. coli с филогруппой А и вдвое меньше – с филогруппой В2. С учётом вышеизложенного, а также того обстоятельства, что в группе А обнаружен наименьший процент изолятов с вирулентными генами (рис. 4, г), может сложиться впечатление, что группа А наименее патогенна, а группа В2 наиболее патогенна. Стоит, однако, принимать во внимание, что в группе А представлены шесть патогенных детерминант, а в группе D – семь, и два изолята с признаками патотипа EAgEC относятся к этой группе.

Условно патогенные гены, характерные для клебсиелл, выявляются в изученной выборке гораздо чаще, чем патогенные детерминанты собственно E. coli. Следует отметить, что видовая идентичность изолятов подтверждена системой MALDI Biotyper (Bruker Daltonics GmbH & Co. KG) с высоким сроком достоверности. Ген YbtS выявляется во всех филогруппах пропорционально их представленности в выборке (рис. 5). Гены MrkD и kfu демонстрируют почти такую же картину. Ген iutA также есть во всех филогруппах, но меньше в филогруппе А (22%) и больше в филогруппе В2 (49%). Сходная представленность у гена alls. Ген magA есть только в филогруппе А, а ген rmpA ещё и в филогруппе D.

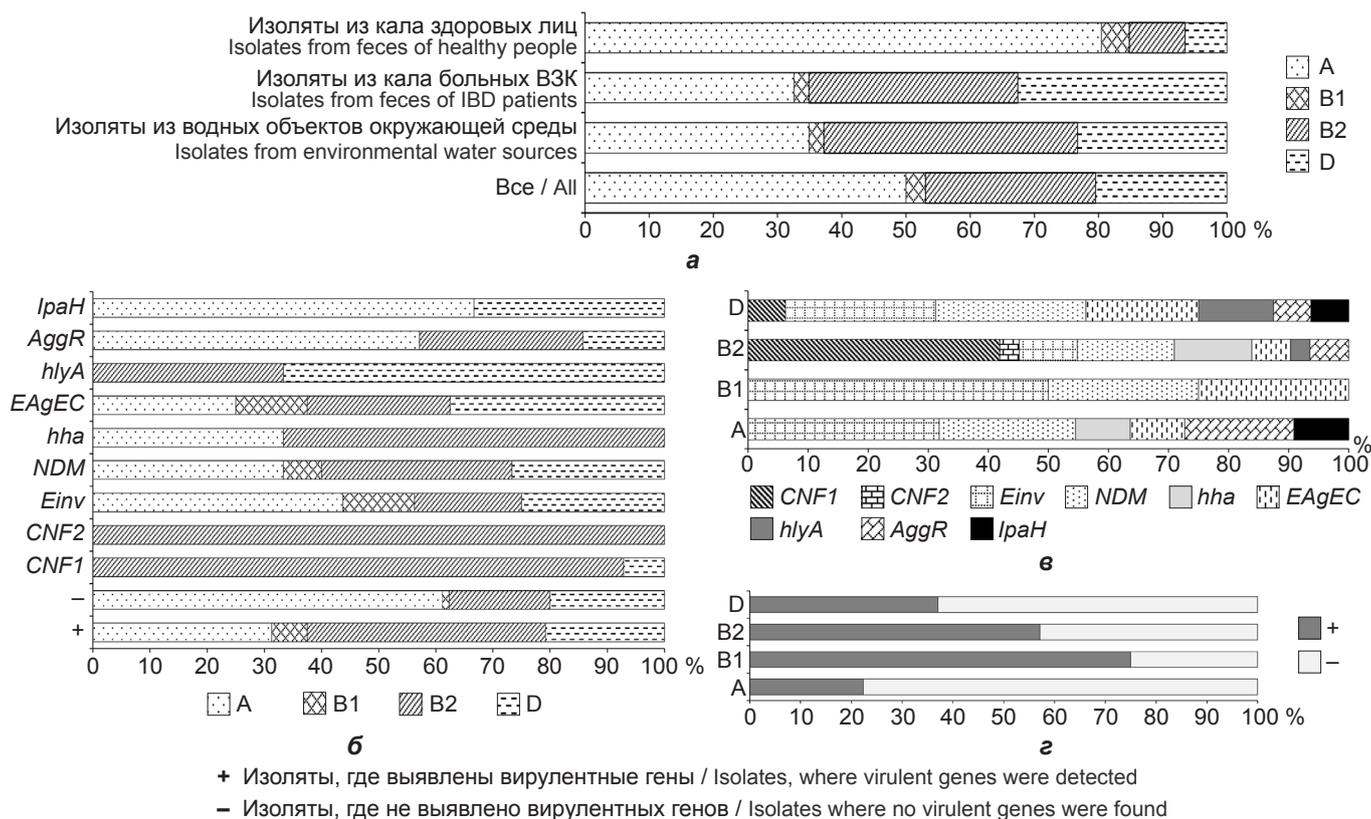


Рис. 4. Филогруппы E. coli и их ассоциация с вирулентными генами E. coli: а – распределение филогрупп по источникам изолятов; б – распределение филогрупп по изолятам, имеющим вирулентные гены; в – распределение вирулентных генов по филогруппам; г – процент вирулентности в филогруппах.

Fig. 4. Phylogroups of E. coli and virulence. а – phylogroups of isolates from various sources; б – phylogroups of isolates with certain virulent genes; в – virulent genes in phylogroups; г – percentage of isolates with virulent genes per phylogroup.

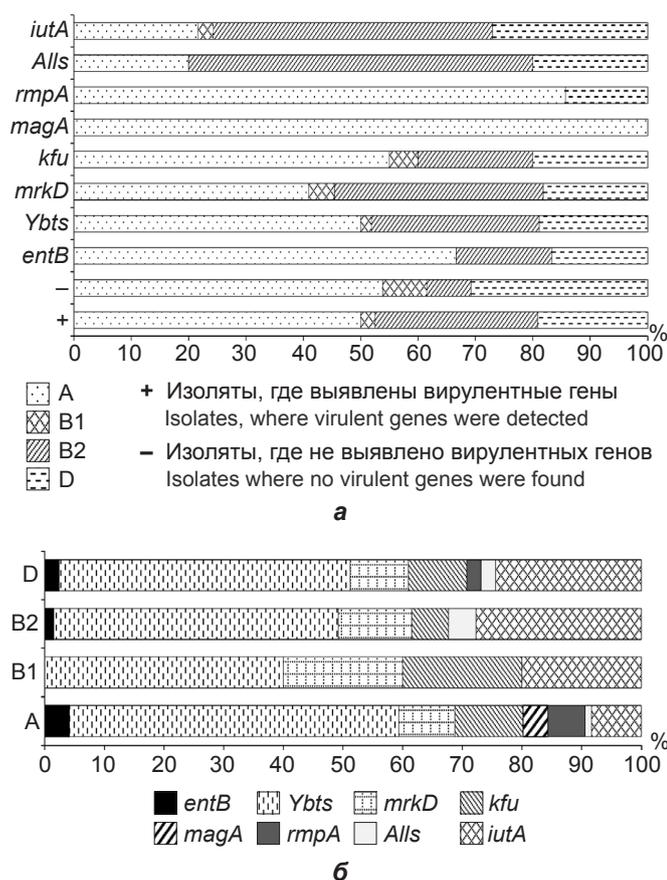


Рис. 5. Филогруппы *E. coli* и их ассоциация с вирулентными генами *Klebsiella*: *а* – распределение филогрупп по изолятам, имеющим вирулентные гены *Klebsiella*; *б* – распределение вирулентных генов *Klebsiella* по филогруппам.

Fig. 5. *E. coli* phylogroups and their association with *Klebsiella* virulent genes. *a* – distribution of phylogroups in isolates with certain *Klebsiella* virulent genes; *б* – distribution of *Klebsiella* virulent genes among phylogroups.

Обсуждение

Обращает на себя внимание факт обнаружения цитонекротического фактора (1 и 2) в изолятах от здоровых лиц и из воды. Однако можно предположить, что здесь он проявляется скорее не как токсин, а как агент адгезии (показано [27]). Это наблюдение особенно интересно, поскольку механизмы действия CNF1 в человеке разнообразны и не вполне ясны до сих пор [28]. За инвазию также отвечает ген *einV*, выявляемый в изолятах от здоровых людей и из воды практически с той же частотой, как и у ВЗК-группы.

Группа изолятов от ВЗК ожидаемо демонстрирует обогащённость патогенными детерминантами: гемолизином и агентами адгезии и инвазии (*hly*, *aggR*, *ipaH*), а также антибиотикоустойчивостью. Выявляемый с помощью коммерческого набора патотип энтероагрегативных *E. coli* сочетается в основном с антибиотикоустойчивостью (*NDM*) (на 100%), в меньшей степени – с гемолизином (на 37,5%) либо с генами, участвующими в адгезии и инвазии (на 50%). Можно предположить, что набор «АмплиСенс® Эшерихиозы-FL» хотя и не охватывает всех потенциально агрегирующих изо-

лятов *E. coli*, но достаточно эффективно выявляет бактерии с наибольшим патогенным потенциалом.

В филогенетической части нашего исследования подтвердились следующие наблюдения: филогруппа А более характерна для внешней среды, а филогруппа В2 преимущественно представлена в кишечнике, при этом логично, что патогенный потенциал филогруппы В2 несколько больше [29]. Однако в филогруппе А довольно часто встречаются изоляты, обогащённые патогенными детерминантами, а в филогруппе В2 – без этих признаков. В связи с этим типирование по крупным филогруппам представляет только исследовательский, а не диагностический интерес.

Тот факт, что гены устойчивости к антибиотикам не выявлены нами нигде, кроме кала больных ВЗК, даже в сточных водах, может свидетельствовать об одном из двух: либо о недостаточном размере нашей выборки (один изолят составил бы 2% от её объема, если же содержание патогенов ниже, мы его не выявим), либо о том (второй вариант), что антибиотикоустойчивость не даёт существенных преимуществ по выживанию во внешней среде или в кишечнике здоровых лиц. Наконец, что было бы наиболее предпочтительным, об эффективности мероприятий по обращению с антибиотиками и очистке воды. В случае подтверждения этих результатов на более широкой выборке можно с осторожностью предположить, что мультирезистентные штаммы передаются больным не такими путями, как обычные бактериальные изоляты. Возможно, это происходит в специфических местах, например, в медицинских учреждениях.

Несколько неожиданным оказался высокий процент выявления в нашей выборке изолятов *E. coli* вирулентных генов, обычно описываемых как вирулентные гены клебсиелл (более чем у 90% изолятов есть такие гены). Это могло быть ожидаемо для генов, широко встречающихся у *E. coli* (особенно уropathogenic): *ybts* в составе патогенного острова, *allS* в составе оперона, плазмидные *iutA* и *mrkD* [30]. Действительно, эти гены встречаются наиболее часто. Есть и гены, имеющие гомологии в *E. coli*, в том числе непатогенных (адгезин *magA* [31]). Особенный интерес представляет случай *kfU*, выявленный у 20 изолятов, – упоминания о его выявлении у *E. coli* нам не удалось обнаружить в литературе. В дальнейшей работе мы предполагаем развить эту тему с использованием полногеномного секвенирования с целью выявления механизмов межвидового переноса генов, возможно, в составе крупных мобильных элементов генома (учитывая, что 14% изученной выборки содержит более трёх вирулентных генов, характерных для клебсиелл).

Ограничения настоящего исследования позволяют применить полученные выводы исследования к регионам, аналогичным Москве и Московской области по климатической зоне, степени урбанизированности и заселённости, а также обладающих сходным уровнем проведения водоочистных мероприятий. Размер сравниваемых групп составлял 43–47 изолятов, что ограничивало возможность детектируемой частоты встречаемости признака (4%): столько составляет один изолят от группы.

Заключение

В целом можно заключить, что патогенный потенциал *E. coli*, выделенных из водных объектов окружающей среды (включая очистные сооружения), сходен с таковым у изолятов из кала здоровых людей в отличие от изолятов от пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника. Вместе с тем во всех группах изолятов выявлены признаки активного межвидового обмена генетическим материалом, что требует дальнейшего изучения.

Литература

(п.п. 1–25, 27–31 см. References)

References

- Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004; 2(2): 123–40. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Mull B., Hill V.R. Recovery and detection of *Escherichia coli* O157:H7 in surface water, using ultrafiltration and real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(11): 3593–7. <https://doi.org/10.1128/AEM.02750-08>
- Chern E.C., Tsai Y.L., Olson B.H. Occurrence of genes associated with enterotoxigenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in agricultural waste lagoons. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(1): 356–62. <https://doi.org/10.1128/aem.70.1.356-362.2004>
- Hamilton M.J., Hadi A.Z., Griffith J.F., Ishii S., Sadowsky M.J. Large scale analysis of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Avalon Bay, CA. *Water Res.* 2010; 44(18): 5463–73. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.06.058>
- Lauber C.L., Glatzer L., Sinsabaugh R.L. Prevalence of pathogenic *Escherichia coli* in recreational waters. *J. Great Lakes Res.* 2003; 29(2): 301–6. [https://doi.org/10.1016/S0380-1330\(03\)70435-3](https://doi.org/10.1016/S0380-1330(03)70435-3)
- Sidhu J.P., Ahmed W., Hodgers L., Toze S. Occurrence of virulence genes associated with Diarrheagenic pathotypes in *Escherichia coli* isolates from surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 2013; 79(1): 328–35. <https://doi.org/10.1128/AEM.02888-12>
- Reynolds C., Checkley S., Chui L., Otto S., Neumann N.F. Evaluating the risks associated with Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in private well waters in Canada. *Can. J. Microbiol.* 2020; 66(5): 337–50. <https://doi.org/10.1139/cjm-2019-0329>
- Fagerström A., Mölling P., Khan F.A., Sundqvist M., Jass J., Söderquist B. Comparative distribution of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from urine infections and environmental waters. *PLoS One.* 2019; 14(11): e0224861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224861>
- Bleichenbacher S., Stevens M.J.A., Zurfluh K., Perreten V., Endimiani A., Stephan R., et al. Environmental dissemination of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rivers in Switzerland. *Environ. Pollut.* 2020; 265(Pt. B): 115081. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115081>
- Jang J., Suh Y.S., Di D.Y.W., Unno T., Sadowsky M.J., Hur H.G. Pathogenic *Escherichia coli* strains producing extended-spectrum β -lactamases in the Yeongsan River basin of South Korea. *Environ. Sci. Technol.* 2013; 47(2): 1128–36. <https://doi.org/10.1021/es303577u>
- Diab M., Hamze M., Bonnet R., Saras E., Madec J.Y., Haenni M. Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)- and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in water sources in Lebanon. *Vet. Microbiol.* 2018; 217: 97–103. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.03.007>
- Montero L., Irazabal J., Cardenas P., Graham J.P., Trueba G. Extended-spectrum beta-lactamase producing-*Escherichia coli* isolated from irrigation waters and produce in Ecuador. *Front. Microbiol.* 2021; 12: 709418. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.709418>
- Scotta C., Juan C., Cabot G., Oliver A., Lalucat J., Bennisar A., et al. Environmental microbiota represents a natural reservoir for dissemination of clinically relevant metallo- β -lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(11): 5376–9. <https://doi.org/10.1128/aac.00716-11>
- Walsh T.R., Weeks J., Livermore D.M., Toleman M.A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect. Dis.* 2011; 11(5): 355–62. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(11\)70059-7](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(11)70059-7)
- Baquero F., Martinez J.L., Canton R. Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008; 19(3): 260–5. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2008.05.006>
- Winfield M.D., Groisman E.A. Role of nonhost environments in the lifestyles of *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003; 69(7): 3687–94.
- Ishii S., Sadowsky M.J. *Escherichia coli* in the environment: implications for water quality and human health. *Microbes Environ.* 2008; 23(2): 101–8. <https://doi.org/10.1264/jsme2.23.101>
- Bagley S.T. Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control.* 1985; 6(2): 52–8. <https://doi.org/10.1017/s0195941700062603>
- Wellington E.M.H., Boxall A.B.A., Cross P., Feil E.J., Gaze W.H., Hawkey P.M., et al. The role of the natural environment in the emergence of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Lancet Infect. Dis.* 2013; 13(2): 155–65. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(12\)70317-1](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(12)70317-1)
- Ramirez M.S., Traglia G.M., Lin D.L., Tran T., Tolmasky M.E. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. *Microbiol. Spectr.* 2014; 2(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.PLAS-0016-2013>
- Pass M.A., Odedra R., Batt R.M. Multiplex PCRs for identification of *Escherichia coli* virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(5): 2001–4. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.5.2001-2004.2000>
- Paton A.W., Paton J.C. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx₁, stx₂, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO11, and rfbO15. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(2): 598–602. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.2.598-602.1998>
- Toma C., Lu Y., Higa N., Nakasone N., Chinen I., Baschkier A., et al. Multiplex PCR assay for identification of human diarrheagenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(6): 2669–71. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2669-2671.2003>
- Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., 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>
- Clermont O., Bonacorsi S., Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000; 66(10): 4555–8. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Analysis of arbitrary conjugacy tables using the chi-square criterion. Online Calculator. Available at: <https://medstatistic.ru/calculators/calchit.html> (in Russian)
- Hofman P., Le Negrate G., Mograbi B., Hofman V., Brest P., Alliana-Schmid A., et al. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor-1 (CNF-1) increases the adherence to epithelia and the oxidative burst of human polymorphonuclear leukocytes but decreases bacteria phagocytosis. *J. Leukoc. Biol.* 2000; 68(4): 522–8.
- Gall-Mas L., Fabbri A., Namini M.R.J., Givskov M., Fiorentini C., Krejsgaard T. The bacterial toxin CNF1 induces activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Int. J. Mol. Sci.* 2018; 19(5): 1408. <https://doi.org/10.3390/ijms19051408>
- Desvaux M., Dalmasso G., Beyrouthy R., Barnich N., Delmas J., Bonnet R. Pathogenicity factors of genomic islands in intestinal and extraintestinal *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 2065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Ong C.L., Beatson S.A., Totsika M., Forestier C., McEwan A.G., Schembri M.A. Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella* and *Citrobacter* species. *BMC Microbiol.* 2010; 10: 183. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-183>
- Yeh K.M., Lin J.C., Yin F.Y., Fung C.P., Hung H.C., Siu L.K., et al. Revisiting the importance of virulence determinant magA and its surrounding genes in *Klebsiella pneumoniae* causing pyogenic liver abscesses: exact role in serotype K1 capsule formation. *J. Infect. Dis.* 2010; 201(8): 1259–67. <https://doi.org/10.1086/606010>