

ОСЕТЉИВОСТ СОЈЕВА *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ИЗОЛОВАНИХ ИЗ ВОДЕ ЗА ПИЋЕ И ПОВРШИНСКИХ ВОДА НА АНТИБИОТИКЕ

Дејан Добријевић¹, Аника Трудић^{1,2}, Владан Борчић¹, Маја Бекут¹

¹ Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду, Нови Сад

² Институт за плућне болести Војводине,
Центар за микробиологију, Сремска Каменица

ANTIBIOTIC SUSCEPTIBILITY PROFILE OF *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* STRAINS ISOLATED FROM DRINKING AND SURFACE WATER

Dejan Dobrijević¹, Anika Trudić^{1,2}, Vladan Borčić¹, Maja Bekut¹

¹ Faculty of Medicine, University of Novi Sad, Novi Sad

² Institut for Pulmonary Diseases of Vojvodina,
Center for Microbiology, Sremska Kamenica

Примљен/Received: 22.9.2016.

Прихваћен/Accepted: 19.11.2016.

САЖЕТАК

Присуство *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) у пијаћим и површинским водама представља индикатор фекалне контаминације хуманог и животињског порекла. *K. pneumoniae* има способност да стекне и пренесе гене резистенције. Изолати из животне средине могу представљати резервоар ових гена који се могу пренети и на друге бактеријске врсте. Циљ рада је изолација, идентификација и тестирање антибиотске осетљивости *K. pneumoniae* из пијаћих и површинских вода. Проспективна студија (спроведена од 1. октобра до 31. децембра 2015. године) испитала је 1276 узорака воде. Узорци су обрађени мембран-филтерском методом. За идентификацију *K. pneumoniae* коришћени су стандардни биохемијски тестови. Осетљивост на антибиотике је тестирана диск-дифузионом методом. *K. pneumoniae* је пронађена у 2,98% (38/1276) узорака, од којих су 42,11% (16/38) били узорци површинских, а 57,89% (22/38) узорци пијаће воде. Тестирани изолати су били резистентни на ампицилин, док рези-

ABSTRACT

Presence of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) in drinking and surface water indicates fecal contamination of human or animal origin. *K. pneumoniae* has the ability to acquire and transfer resistance genes. Isolates found in the environment may represent a reservoir of these genes, which can be transmitted among different bacterial species. The aim of the study was identification and testing susceptibility of *K. pneumoniae* to antibiotics after isolation from drinking and surface water. Prospective study (conducted from October the 1st 2015 to December the 31st 2015) included 1276 samples of drinking and surface water. The samples were processed by membrane-filter technique. Standard biochemical tests were used for identification of *K. pneumoniae*. Antimicrobial susceptibility was determined by disk-diffusion method. *K. pneumoniae* was found in 2.98% (38/1276) of samples, from both surface 42.11% (16/38) and drinking water 57.89% (22/38). Tested strains were resistant to ampicillin, but resistance to other antibiotics was not confirmed. *K. pneumoniae* could be found in drinking

стенција на друге антибиотике није забележена. *K. pneumoniae* се може наћи у пијаћој води упркос пречишћавању и хлоринацији. У нашем испитивању, изоловани сојеви су били осетљиви на уобичајено коришћене антибиотике, без стечених детерминанти резистенције.

Кључне речи: *Klebsiella pneumoniae*, осетљивост на антибиотике, пијаћа вода, површинска вода.

УВОД

Микробиолошки исправна вода за пиће је есенцијална за здравље људи¹ и њена доступност је главна брига сваке заједнице^{2,3}. Контаминација различитим патогенима указује на неадекватну обраду, због чега вода за пиће подлеже строгој микробиолошкој контроли хигијенске исправности⁴.

Површинске воде, као што су реке, често садрже велики број патогених микроорганизама, чије је присуство, у највећој мери, последица деловања људи⁵. Представљајући природно место за отпадне продукте различитих индустрија, болничких установа и фармацеутских компанија, површинске воде чине повољну средину за пролиферацију фекалних колиформних бактерија^{6,7}.

Налаз колиформних бактерија у води (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*) указује да постоји фекална контаминација људског или животињског порекла⁸. Иако ови микроорганизми представљају део физиолошке флоре доњих партија интестиналног тракта и примарно нису патогени, ипак могу да изазову различита обољења⁴.

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) је фекална, колиформна бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae*⁹, која се описује као једна од најчешћих узрочника болничких и ванболничких инфекција, јер се лако преноси контактом и путем заражене хране и воде⁴. Ова бактерија има велику способност стицања и преноса гена резистенције^{10,11}. Изолати који се нађу у животној средини, представљају резервоар тих гена, који се даље могу преносити и на друге бактеријске врсте. Тиме се резистентни сојеви могу јавити, не само у болничким срединама, где су најчешћи услед селективног притиска насталог нерационалном употребом антибиотика, већ и у општој популацији¹⁰⁻¹⁴. Лечење инфекција узрокованих резистентним сојевима је све већи јавно-здрав-

water despite the purification and chlorination. In our study strains isolated from drinking and surface water were susceptible to commonly used antibiotics, without any markers of acquired resistance.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, antibiotic susceptibility, fecal contamination, drinking water, surface water.

INTRODUCTION

Microbiologically safe drinking water is essential for human health¹ and its availability is a major concern of global community^{2,3}. Contamination by different pathogens indicates an inadequate treatment, which is the reason why drinking water undergoes through strict microbiological control of hygienic quality⁴.

Surface waters, such as rivers, often contain large number of pathogenic microorganisms whose presence is mostly caused by human activity⁵. Being common place for waste products of industries, hospitals and pharmaceutical companies, these surface waters are favorable environment for proliferation of fecal coliform bacteria^{6,7}.

Detection of coliform bacteria in water (*Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacter spp.*, *Serratia spp.*) indicates that there was fecal contamination of human or animal origin⁸. Although these microorganisms represent the portion of physiological flora of lower intestinal tract and are primarily not considered to be pathogenic, they can still cause different diseases⁴.

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is fecal coliform bacteria from the family *Enterobacteriaceae*⁹, which is described as one of the most common causative agents of hospital and non-hospital infections, because it is easily transmitted through personal contact and by contaminated food and water⁴. This bacterium has large potential to acquire and to transfer genes of resistance^{10,11}. Isolates that are found in the environment may represent a reservoir of these genes, which could further be transferred among the other bacterial species. Thereby these resistant strains can appear not only in hospital settings, where they are the most common due to selective pressure caused by irrational use of antibiotics, but also in community¹⁰⁻¹⁴. Treatment of infections caused by resistant strains is growing public health problem, primarily due to limited choice of effective antimicrobial agents and absence of effective therapy¹⁵. Ability of this bacterial spe-

ствени проблем, пре свега због суженог избора ефикасних антимикуробних лекова па чак и одсуства делотворне терапије¹⁵. Способност ове бактеријске врсте да се брзо шири у болничкој, али и ванболничкој, као што је водена средина, и њена потенцијална резистенција на природне и синтетске антимикуробне лекове сврстава *K. pneumoniae* у високо ризичне микроорганизме, посебно када се ради о осетљивим групама као што су имунокомпромитовани пацијенти¹⁶. Циљ рада је утврдити присуство *K. pneumoniae* у узорцима површинских вода и воде за пиће, као и одређивање осетљивости изолата на антимикуробне лекове.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

Узорковање воде

Спроведена је проспективна студија која је обухватила 1276 узорака сакупљаних у периоду од три месеца (од 1. 10. 2015. до 31. 12. 2015. године). Узорци површинских вода су прикупљени из неколико река, са више различитих места која се уобичајено користе као пунктови за санитарна испитивања. Из појединих река је узет већи број узорака са различитих места речног корита, при чему је из већих река узет већи број узорака. Узорци пијаће воде су узети из неколико извора (централне и локалне водоводне мреже и јавни водни објекти - бунари, каптиране чесме и отворена изворишта) како би се покрили сви могући начини водоснабдевања. Даље су узорци пијаће воде класификовани према начину обраде воде пре употребе. Сви узорци описани у раду су изабрани методом случајног одабира од већег броја узорака коришћених за рутинске анализе.

Узорци су сакупљани у стерилне, затворене боце користећи стандардну технику у складу са ISO 5667-1, ISO 5667-2 и ISO 5667-3¹⁷. Све боце су транспортоване у фрижидеру на температури од 4°C у року од 2 до 4 сата од узорковања. Испитивање је обављено на Одељењу за санитарну бактериологију Центра за хигијену Института за јавно здравље Војводине у Новом Саду.

Изолатија бактерија

Као метода за доказивање укупних и фекалних колиформних бактерија коришћена је мембран-филтер техника. Апарат за филтрацију (Sartorius Membranfilter, Немачка) је ка-

cies to expand rapidly inside hospitals, but also in natural surroundings such as an aqueous environment, and its potential resistance to natural and synthetic antimicrobial drugs, classifies *K. pneumoniae* as highly dangerous microorganism, particularly when it comes to vulnerable groups such as immunocompromised patients¹⁶. The aim of this study was to investigate presence of *K. pneumoniae* in samples of surface and drinking water as well as to test sensitivity of isolates to antimicrobial drugs.

MATERIAL AND METHODS

Sampling of water

A prospective study that included 1276 samples collected in a period of three months (from 01 October 2015 until 31 December 2015) was conducted. Samples of surface waters were collected from several rivers and from several different places established as sampling points for sanitary testings. In cases of some rivers several samples were taken from different parts of the same riverbed, with larger number of samples in cases of bigger rivers. Samples of drinking waters were taken from several sources (central and local water supplying network and public water supplying objects - wells, capped faucet and open springs) in order to cover all possible water supplying sources. Further on, drinking water samples were classified according to the treatment method before its use. All of the processed samples in this paper were chosen randomly from a larger group of samples used for routine analyses.

The samples were collected in sterile sealed bottles using standard technique in accordance with ISO 5667-1, ISO 5667-2 and ISO 5667-3¹⁷. All bottles were transported in a refrigerator at 4°C within 2 to 4 hours of sampling. The testing was conducted in the Department for sanitary bacteriology of the Center for Hygiene in Institute of Public Health of Vojvodina, Novi Sad.

Isolation of the bacteria

Membrane-filter technique was used as a method for detection of total and fecal coliform bacteria. Apparatus for filtration (Sartorius Membranfilter, Germany) had a capacity of 500 ml (Figure 1). Sterile nitrocellulose membranes of 50 mm in diameter with pore diameters of 0.45 µm (Millipore, USA) were used. Before the start of

пацитета 500 ml (Слика 1). Коришћене су стерилне мембране од нитроцелулозе, дијаметра 50 mm са порама промера 0,45 μm (Milipore, САД). Пре почетка филтрације воде, сви делови апарата су стерилисани.

Запремина испитиваних узорака воде је била 100 ml. У циљу брже и ефикасније филтрације, коришћена је вакуум пумпа. По обављеној филтрацији, мембрана се стерилно скида и поставља у Петријеву шољу на подлогу.



Слика 1. Апарат за филтрацију са узорцима воде и припремљеним хранљивим подлогама

Figure 1. An apparatus for filtration of water samples with prepared agar plates

the water filtration all parts of the apparatus were sterilized.

Volume of the water samples was 100 ml. In order to perform faster and more efficient filtration vacuum pump was used. Upon completion of filtration the membrane was aseptically removed and placed in the Petri dish.

Изолација *Klebsiella pneumoniae*

За укупне колиформне бактерије се користи ендо-агар који се инкубира на температури од 37°C у току 24 часа, а за фекалне колиформне бактерије МекКонки агар који се инкубира на 44°C у току 24 часа. МекКонки агар и ендо-агар су подлоге на којима *Klebsiella pneumoniae* расте у виду појединачних, крупних, лактоза-позитивних колонија, величине до 3 mm. Колоније су конвексне у М форми.

Биохемијска идентификација *Klebsiella pneumoniae*

Биохемијски тестови коришћени за идентификацију *K. pneumoniae* су подразумевали: тест ферментације декстрозе и лактозе, способност коришћења цитрата, тест разлагања уреје, реакцију метил-црвено, тест стварања водоник-сулфида, тест покретљивости и тест стварања индола из триптофана.

Тестирање антибиотске осетљивости

За сваки идентификовани сој израђен је антибиограм. Коришћена је бактеријска су-

Isolation of *Klebsiella pneumoniae*

For examination of total coliform bacteria, endo agar was incubated at 37° C for 24 hours, whereas for the fecal coliform bacteria MacConkey agar was incubated at 44° C for 24 hours. MacConkey agar and endo agar are substrates on which *Klebsiella pneumoniae* grows in single large lactose-positive colonies of up to 3 mm in diameter. The colonies are convex in M shape.

Biochemical identification of *Klebsiella pneumoniae*

Biochemical tests used to identify *K. pneumoniae* included: fermentation test of dextrose and lactose, ability to utilize citrates, test of urea decomposition, the reaction of methyl red, test of hydrogen sulphide production, motility test and test of indole production from tryptophan.

Antibiotic susceptibility testing

For each identified strain an antibiogram was made. The bacterial suspension prepared from a pure culture, which was no more than 24 hours

спензија припремана од чисте културе, не старије од 24 часа (Слика 2), густине 0,5 МекФарланд стандарда.

Након инокулације на површину Милер-Хинтон агара, стерилном пинцетом су стављени дискови са антибиотикима (BIO-RAD, Француска) (Табела 1), а затим су плоче инкубиране у току 18-24 часа на 35-37°C. За испитивање антибиотске осетљивости су коришћени стандарди и препоруке Европског комитета за испитивање антимикробне осетљивости (EUCAST)¹⁸.

old (Figure 2), with the density of 0.5 McFarland standard, was used.

After inoculation on the surface of Mueller-Hinton agar, discs with antibiotics (Bio-Rad, France) were placed with sterile forceps (see Table 1) and then the plates were incubated for the next 18-24 hours at 35-37° C. For the testing of antibiotics, standards and recommendations of the European Committee for antimicrobial susceptibility testing (EUCAST)¹⁸ were used.



Слика 2. Чиста култура *Klebsiella pneumoniae* на крвном агару (лево) и на ендо-агару (десно)
Figure 2. Mono-cultures of *Klebsiella pneumoniae* on blood agar (left) and endo-agar (right)

Табела 1. Приказ антибиотика коришћених за испитивање антимикробне осетљивости

| класа антибиотика | назив антибиотика | концентрација антибиотика по диску |
|--|---------------------------------------|------------------------------------|
| пеницилини | ампицилин | 10 µg |
| пеницилини + инхибитори бета- лактамаза | амоксацилин + клавуланска киселина | 30 µg |
| | пиперацилин + тазобактам | 30 + 6 µg |
| цефалоспорини | цефуросим | 30 µg |
| | цефтриаксон | 30 µg |
| | цефепим | 30 µg |
| карбапенеми | имипенем | 10 µg |
| | меропенем | 10 µg |
| | ертапенем | 10 µg |
| | дорипенем | 10 µg |
| аминогликозиди | гентамицин | 10 µg |
| | амикацин | 30 µg |
| флуорисани хинолони | ципрофлоксацин | 5 µg |
| | левофлоксацин | 5 µg |
| антагонисти фолата | сулфаметоксазол + триметоприм | 25 µg |

Table 1. Overview of antibiotics used for antimicrobial susceptibility testing

| class of antibiotics | used antibiotic | concentration of antibiotic per disc |
|--|----------------------------------|--------------------------------------|
| penicillins | ampicillin | 10 µg |
| penicillins + beta-lactamase inhibitors | amoxicillin + clavulanic acid | 30 µg |
| | piperacillin + tazobactam | 30 + 6 µg |
| cephalosporins | cefuroxime | 30 µg |
| | ceftriaxone | 30 µg |
| | cefepime | 30 µg |
| carbapenems | imipenem | 10 µg |
| | meropenem | 10 µg |
| | ertapenem | 10 µg |
| | doripenem | 10 µg |
| aminoglycosides | gentamicin | 10 µg |
| | amikacin | 30 µg |
| fluoroquinolones | ciprofloxacin | 5 µg |
| | levofloxacin | 5 µg |
| folate antagonists | sulfamethoxazole + trimethoprim | 25 µg |

РЕЗУЛТАТИ

Присуство *K. pneumoniae* је пронађено у 2,98% (38/1276) испитаних узорака воде. Од укупног броја позитивних узорака, 42,11% (16/38) су чиниле површинске воде, а 57,89% (22/38) пијаће воде.

У укупно 16 узорака површинских вода које су пореклом из 6 различитих река потврђена је *K. pneumoniae*. У табели 2 је дат приказ узорака позитивних на *K. pneumoniae* у зависности од реке из које је узет узорак (Табела 2).

K. pneumoniae је пронађена и у узорцима пијаћих вода. Пијаће воде су биле класификоване у зависности од тога да ли су пречишћене/непречишћене и хлорисане/нехлорисане. У табели 3 је дат приказ узорака позитивних на *K. pneumoniae* у зависности од начина обраде воде (Табела 3).

Код свих испитаних изолата *K. pneumoniae* нађена је резистенција на ампицилин. Резистенција на остале испитиване антибиотике није утврђена. Изолати *K. pneumoniae* су били осетљиви на пеницилине са инхибиторима бета-лактамаза, цефалоспорине, карбапенеме, аминогликозиде, флуорисане хинолоне и антагонисте фолата (Табела 4).

RESULTS

Presence of *K. pneumoniae* was confirmed in 2.98% (38/1276) of tested water samples. Out of total number of positive samples, 42.11% (16/38) were surface waters and 57.89% (22/38) were drinking waters.

Presence of *K. pneumoniae* has been confirmed in 16 samples of surface waters (originating from 6 different rivers). In Table 2 the samples positive on presence of *K. pneumoniae* are presented, depending on the river where the sample was taken (Table 2).

K. pneumoniae was also found in the samples of drinking water. Drinking waters were classified depending on whether the water was purified/unpurified and chlorinated/unchlorinated. In the Table 3 samples positive on the presence of *K. pneumoniae* are shown with reference to the mode of water treatment (Table 3).

In all tested *K. pneumoniae* isolates resistance to ampicillin was found. Resistance to other tested antibiotics was not proved. *K. pneumoniae* isolates were sensitive to penicillins with beta-lactamase inhibitors, cephalosporins, carbapenems, aminoglycosides, fluorinated quinolones and folate antagonists (Table 4).

Табела 2. Узорци површинских вода у којима је нађена *K. pneumoniae* према месту узорковања

| место узорковања | број позитивних узорака | број тестираних узорака | процент позитивних узорака |
|------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| Дунав | 7 | 303 | 2,31 |
| Бегеј | 3 | 76 | 3,95 |
| Нера | 2 | 37 | 5,41 |
| Моравица | 2 | 41 | 4,88 |
| Тиса | 1 | 183 | 0,55 |
| Тамиш | 1 | 96 | 1,04 |
| Σ | 16 | 736 | 2,18 |

Table 2. The samples of surface water in which *K. pneumoniae* was found classified by sampling points

| sampling point | number of positive samples | number of tested samples | percent of positive samples |
|----------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| Danube | 7 | 303 | 2.31 |
| Begej | 3 | 76 | 3.95 |
| Nera | 2 | 37 | 5.41 |
| Moravica | 2 | 41 | 4.88 |
| Tisa | 1 | 183 | 0.55 |
| Tamiš | 1 | 96 | 1.04 |
| Σ | 16 | 736 | 2.18 |

Табела 3. Узорци пијаћих вода у којима је нађена *K. pneumoniae* према начину обраде.

| начин третмана воде | број позитивних узорака | број тестираних узорака | процент позитивних узорака |
|----------------------------|-------------------------|-------------------------|----------------------------|
| непречишћена и нехлорисана | 16 | 109 | 14,68 |
| пречишћена и нехлорисана | 3 | 72 | 4,17 |
| непречишћена и хлорисана | 1 | 152 | 0,66 |
| пречишћена и хлорисана | 2 | 207 | 0,97 |
| Σ | 22 | 540 | 4,08 |

Table 3. The samples of drinking water in which *K. pneumoniae* was found, classified by water treatment method

| water treatment method | number of positive samples | number of tested samples | percent of positive samples |
|------------------------------|----------------------------|--------------------------|-----------------------------|
| unpurified and unchlorinated | 16 | 109 | 14.68 |
| purified and unchlorinated | 3 | 72 | 4.17 |
| unpurified and chlorinated | 1 | 152 | 0.66 |
| purified and chlorinated | 2 | 207 | 0.97 |
| Σ | 22 | 540 | 4.08 |

Табела 4. Заступљеност сензитивних (С) и резистентних (Р) сојева у односу на различите антибиотике

| класа антибиотика | назив антибиотика | С(%) | Р(%) |
|---|---------------------------------------|------|------|
| пеницилини | ампицилин | 0 | 100 |
| | амоксицилин + клавуланска киселина | 100 | 0 |
| пеницилини + инхибитори бета- лактамаза | пиперацилин + тазобактам | 100 | 0 |
| | цефуроксим | 100 | 0 |
| цефалоспорини | цефтриаксон | 100 | 0 |
| | цефепим | 100 | 0 |
| | имипенем | 100 | 0 |
| карбапенеми | меропенем | 100 | 0 |
| | ертапенем | 100 | 0 |

| | | | |
|---------------------|-------------------------------|-----|---|
| | дорипенем | 100 | 0 |
| аминогликозиди | гентамицин | 100 | 0 |
| | амикацин | 100 | 0 |
| флуорисани хинолони | ципрофлоксацин | 100 | 0 |
| | левофлоксацин | 100 | 0 |
| антагонисти фолата | сулфаметоксазол + триметоприм | 100 | 0 |

Table 4. The presence of sensitive (S) and resistant (R) isolates to different antibiotics

| Antibiotic class | Antibiotic | S(%) | R(%) |
|--|----------------------------------|------|------|
| penicillins | ampicillin | 0 | 100 |
| penicillins + beta-lactamase inhibitors | amoxicillin + clavulanic acid | 100 | 0 |
| | piperacillin + tazobactam | 100 | 0 |
| cephalosporins | cefuroxime | 100 | 0 |
| | ceftriaxone | 100 | 0 |
| | cefepime | 100 | 0 |
| | imipenem | 100 | 0 |
| carbapenems | meropenem | 100 | 0 |
| | ertapenem | 100 | 0 |
| | doripenem | 100 | 0 |
| aminoglycosides | gentamicin | 100 | 0 |
| | amikacin | 100 | 0 |
| fluoroquinolones | ciprofloxacin | 100 | 0 |
| | levofloxacin | 100 | 0 |
| folate antagonists | sulfamethoxazole + trimethoprim | 100 | 0 |

ДИСКУСИЈА

Налаз *K. pneumoniae* у води представља индикатор фекалног загађења. Уколико се изолује из узорак пијаће воде указује на лошу обраду те воде у смислу пречишћавања и хлоринације. Одређени сојеви показују значајну резистенцију на хлоринацију посредством бројних механизма, као што је измена мембранских липида бактеријске ћелије, због чега се доводи у питање погодност хлоринације као методе за третман пијаћих вода¹⁶. Као што је било и очекивано, највећи број позитивних узорак пијаће воде припадао је групи непречишћених, нехлорисаних вода. Ипак, у нашем испитивању, 2 узорка у којима је потврђена *K. pneumoniae* су биле пречишћене, хлорисане, а 1 узорак непречишћена, хлорисана вода, што потврђује сумњу у ефикасност ове методе. Најновији приступ ефикасној инактивацији перзистирајућих патогена у води јесте оксидација титанијум-диокси-дом^{16,19}.

Много година је водена средина била непрепозната као потенцијални извор гена рези-

DISSCUSION

Detection of *K. pneumoniae* in the water is an indicator of fecal contamination. If it is isolated from a sample of drinking water, it can indicate poor treatment of water in terms of purification and chlorination. Certain strains show significant resistances to chlorination which is mediated through a number of mechanisms, such as change of bacterial cell lipid membrane which can consequently bring into question the adequacy of chlorination as a method for treatment of drinking water¹⁶. As it was expected, the highest number of positive drinking water samples belonged to the group of unpurified and unchlorinated waters. However, in our examination, 2 of the drinking water samples, that were positive on *K. pneumoniae*, were previously purified and chlorinated and 1 sample was from unpurified and chlorinated water, which raises doubts about the effectiveness of this method. The newest approach to effective inactivation of persistent pathogens in water is oxidation with titanium dioxide^{16,19}.

стенције који се могу пренети на клинички значајне бактерије. Гени могу да се пренесе, не само унутар исте, већ и на различите бактеријске врсте. Стога клинички значајни сојеви, ако се нађу у таквој средини, могу стећи резистенцију на антибиотике са којима никада нису интераговали^{12,14,20}. Посебну пажњу привлачи чињеница да су бројне бета-лактамазе (цефалоспориназе, карбапенемазе), као и други ензими одговорни за резистенцију, који се уобичајено не налазе код *K. pneumoniae*, идентификовани код ове бактеријске врсте много пре у односу на остале припаднике ентеробактерија. Овај процес је двосмеран у бактеријама као што су *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* и *Acinetobacter spp.* се често налазе гени резистенције за које је молекуларним методама утврђено да су пореклом из *Klebsiella spp.*¹⁰.

Гени резистенције су убиквитарни и потичу из древних времена¹⁴. Бактерије које настају водену средину и датирају милиони година пре антибиотске ере носе у себи гене који су одговорни за настанак резистенције на неке од есенцијалних антибиотика за данашњу медицину^{21,22}. Неколико студија је показало да поједине бактерије, које се природно налазе у води, могу продуковати антибиотске супстанце као секундарне метаболите који перзистирају у воденој средини и ступају у контакт са бактеријама присутним у том екосистему. На те метаболите бактерије могу стећи резистенцију која може бити укрштена са неком значајном групом антибиотика коришћених у савременој терапији инфекција^{12,23}. У многим студијама је потврђено присуство резистентних изолата *K. pneumoniae*, посебно у одводним цевима болница. На основу епидемиолошких студија се сумња да те клебсијеле потичу из спољашње средине, а да одатле носе и резистенцију^{10,24}.

Утицај човека на развој резистенције непобитно је огроман. Још од периода индустријализације па све до данас, у спољашњу средину су испуштене милијарде тона антибиотика, што омогућава бактеријама у таквој средини да развијају механизме борбе против њих¹⁴. Хоспитализовани пацијенти су често колонизовани резистентним бактеријским сојевима, који у реке могу доспети преко отпадних болничких вода. Испуштање отпадних продуката из болничких установа, посебно је интересантно и са аспекта фармакокинетице одређених антибиотика, који се излучују из организма непромењени те испуштањем отпадних вода, испуштамо и анти-

For many years aquatic environment remained unrecognized as a potential source of resistance genes that can be transferred to clinically relevant bacteria. Genes can be transmitted not only within the same species, but also between different bacterial species. Therefore, clinically relevant strains, when found in suitable environment, can acquire resistance to antibiotics with whom they have never previously interacted^{12,14,20}. It is especially interesting that numerous beta-lactamases (cephalosporinases, carbapenemases), as well as other enzymes which are responsible for the resistance and which are usually not found in *K. pneumoniae*, can be identified in these bacterial strains more frequently than in other species of enterobacteria. This is a two-way process: in bacteria such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* and *Acinetobacter spp.* resistance genes originating from *Klebsiella spp.* can often be found (identified by molecular methods)¹⁰.

Resistance genes are ubiquitous and they date from ancient times¹⁴. The bacteria that inhabit the aquatic environment and are dating millions of years before the antibiotic era, carry certain genes which are responsible for development of resistance towards some of the antibiotics essential for modern therapy^{21,22}. Several studies showed that some bacteria, which are naturally found in water, can produce antibiotic substances as secondary metabolites which may persist in aquatic environment and come into contact with the bacteria present in that specific ecosystem. Bacteria can acquire resistance to these metabolites and this can be an opportunity for cross-resistance with important groups of antibiotics used in modern medicine^{12,23}. Many studies have confirmed presence of resistant isolates of *K. pneumoniae*, especially in hospital drainage pipes. Based on epidemiological studies it is believed that these *Klebsiella spp.* are originating from the external environment, from where they also received these resistance genes^{10,24}.

Human impact on the development of resistance is clearly enormous. Since the period of industrialization and until today, billions of tons of antibiotics were released into the environment, allowing the bacteria to develop mechanisms to struggle against them¹⁴. Hospitalized patients are often colonized with resistant bacterial strains, which could enter into rivers through hospital waste water. Therefore the disposal of waste products from hospitals is particularly interesting from the aspect of the pharmacokinetics of certain

биотике^{11,14}. Берглунд и сарадници²⁵ су испитујући реку Стонгон у Шведској квантификовали ципрофлоксацин, кларитромицин и клиндамицин на горњим границама дозвољеним за третиране отпадне воде, а значајно преко дозвољене границе потврђено је присуство триметоприма у концентрацији од 24 ng/L. У току 2013. године на северу Пакистана у 6 различитих река квантификовано је 8 врста антибиотика у концентрацијама и до 49000 ng/L²⁶.

Употреба антибиотика у индустрији меса постала је једна од главних мета за борбу против резистенције због огромних количина утрошених из године у годину. У Данској је у току 2010. године 71% свих антибиотика коришћено за животињску примену. Конзумацијом оваквог меса непотребно се уносе велике количине антибиотика које, осим што нарушавају физиолошки састав интестиналне микрофлоре, путем фекалних отпадних вода доспевају у спољашњу средину¹⁴.

У овој студији нису пронађени резистентни сојеви у испитиваним узорцима из различитих река (Дунав, Тиса, Бегеј, Нера, Тамиш, Моравица) и извора пијаће воде. Утврђена је једино резистенција на ампицилин. Ова резистенција је интринзичка и посредована хромозомским бета-лактамазама¹⁰. Постоје индикације да би резултати били другачији ако би се испитивање поновило у неком другом периоду године, јер је састав површинских вода веома варијабилан и зависи од бројних фактора као што су динамика испуштања отпадних вода, количина падавина, поплаве, температура и слично⁵. Само присуство *K. pneumoniae* у води отвара могућност да ти сојеви стекну одређени ген резистенције^{7,27-31}. Скаријачан и сарадници⁷ су испитујући бактериолошку исправност реке Кавери у Индији утврдили да је 93,51% сојева мултирезистентно, а испитиване клебсијеле су показале резистенцију на чак 26 различитих антибиотика. Клебсијеле из реке Дамбовите у Румунији показале су отпорност на 16 антибиотика, а 60% сојева је било мултирезистентно²⁷. У Турској, у реци Сеихан, изоловане клебсијеле су показале резистенцију на ампицилин, стрептомицин, цефазолин и ко-тримоксазол²⁸. У реци Мхлатхузе у Јужноафричкој Републици нађене су клебсијеле које су резистентне на 10 различитих антибиотика²⁹. Компарацију са студијама у нашој земљи није могуће направити услед недостатка података о бактериолошком саставу

antibiotics. These antibiotics are excreted from the body in unchanged form and disposal of waste waters also consequently expose the environment to these antibiotics^{11,14}. Berglund and coworkers²⁵ have examined Stångån river in Sweden and quantified ciprofloxacin, clarithromycin and clindamycin on the upper limits allowed for treated waste water and confirmed the presence of trimethoprim in levels significantly above the limit, precisely in a concentration of 24 ng/L. In 2013, in the North of Pakistan in 6 different rivers, 8 antibiotics were quantified in concentrations up to 49000 ng/L²⁶.

Use of antibiotics in the meat industry has become one of the main targets for combat against antibiotic resistance due to the enormous quantity of drugs used on a yearly basis. In Denmark during 2010, 71% of all antibiotics were used for treatment of animals. Consumption of such meat can unnecessarily expose an individual to large amount of antibiotics. Besides the fact that they impair physiological intestinal microflora, they can be transferred to local environment through fecal waste water¹⁴.

In our study, resistant strains were not found in the tested samples gained from different rivers (Danube, Tisa, Begej, Nera, Tamiš, Moravica) or in the samples of drinking water and only resistance to ampicillin was determined with statistical significance. This resistance is intrinsic and mediated via chromosomal beta-lactamases¹⁰. There are indications that the results would be different if the study was repeated at some other time of the year because the composition of the surface waters is very variable and depends on the numerous factors such as the dynamics of disposal, rainfall, flooding, temperature and others⁵. The mere presence of *K. pneumoniae* in water creates opportunity for these strains to acquire a certain genes of resistance^{7,27-31}. Skariyachan and coworkers⁷ examined bacteriological quality of the river Kaveri in India and found that 93.51% of strains were multiresistant and *Klebsiella spp.* strains, which were examined in this study, showed resistance to as many as 26 different antibiotics. Strains from Dambovita River in Romania have shown resistance to 16 antibiotics and 60% of them were multiresistant²⁷. In Turkey, in the river Seihan, isolated strains showed resistance to ampicillin, streptomycin, cefazolin and cotrimoxazole²⁸. In river Mhlathuze in South Africa, the detected strains were resistant to 10 different antibiotics²⁹. Comparison with studies in our

површинских вода у доступној литератури.

Конзумирање хигијенски неисправне воде или контакт са контаминираним површинским водама могу довести до колонизације интестиналног тракта патогеним, резистентним бактеријским сојевима код потпуно здравих људи, који никада нису боравили у болници, нити узимали антибиотике¹⁴. Инфекције резистентним сојевима постају све већи терапијски проблем, што води до повећања морбидитета, mortalитета, и повећања трошкова лечења³⁰.

Бактеријски геном је велики и хиперваријабилан и то нам отежава да дефинишемо где и када је тачно дошло до стварања и преноса гена резистенције. Важно је разумети значај водене средине у настанку и еволуцији гена резистенције. Потребно је смањити употребу антибиотика у хуманој и ветеринарској медицини. Међутим, само смањење селективног притиска антибиотика неће довести до смањења резистенције уколико се резистентни сојеву буду константно појављивали из различитих извора. Због тога је неопходна стална контрола и микробиолошко испитивање узорака управо из водене средине. Важно је схватити да еволуција резистенције није локална, већ међународни проблем. У томе главну улогу имају путовања и глобална трговина храном¹⁴. Свеопшти надзор је кључ борбе са овим проблемом, због чега је Светска здравствена организација 7. априла 2011. године у Женеви донела одлуку о покретању пројекта "No action today - No cure tomorrow". Ова иницијатива има за циљ смањење употребе антибиотика у болничким и ванболничким условима, као и у месној индустрији^{14,31}.

Овим радом указујемо на значај мониторинга резистенције у воденој средини. Тај мониторинг мора бити континуиран и захтева велике напоре бројних грана науке и индустрије, али једино синергистичким деловањем различитих сектора може се доћи до приметних промена на овом пољу.

Наша студија је указала на присуство *K. pneumoniae* и у водама за пиће и у површинским водама. Овај условно патогени микроорганизам је доказан упркос примени адекватних мера за његову елиминацију. Овим се указује на значај константне микробиолошке контроле, али и поставља питање адекватности примењених санитарних мера. Упркос чињеници да су изолати били очекиване осетљивости и без стечене резистенције, идеални резултати би показали

country is not possible due to lack of data of the bacteriological composition of surface waters in the available literature.

Consumption of hygienically inadequate water or contact with contaminated surface waters can lead to colonization of intestinal tract with pathogenic, resistant bacterial strains in completely healthy individuals who have never been hospitalized or taken antibiotics¹⁴. Infections with resistant strains are becoming an increasing therapeutic problem, which can lead to increased morbidity, mortality and costs of treatment³⁰.

Bacterial genome is large and hypervariable, so it is difficult to define exact place and time of the creation and transfer of resistance genes. It is necessary to understand the importance of the aquatic environment in the development and evolution of resistance genes. Moreover it is mandatory to reduce usage of antibiotics in human and veterinary medicine. However, reducing only the selective pressure of antibiotics will not lead to reduction of resistance if the resistant strains are constantly appearing from different sources. That is why constant control and microbiological testing of samples from the water environment must be performed. It is important to understand that resistance evolution is not local, but international problem, in which the main focus is on travelling and global food market¹⁴. Overzealous control is the key to overcome this problem. Therefore the World Health Organization on April the 7th, 2011 in Geneva decided to launch the project "No action today - No cure tomorrow". This initiative aims to reduce the use of antibiotics in hospitals, community and in the meat industry^{14,31}.

This paper highlights the importance of monitoring the bacteria resistance in aqueous media. This monitoring should be continuous and it requires great effort by many branches of science and industry. However, it is clear that only synergistic efforts of different sectors can bring notable changes in this field.

Our study pointed to the presence of *K. pneumoniae* both in drinking and surface waters. This opportunistic pathogen is detected despite the implementation of appropriate measures for its elimination. This indicates the importance of constant microbiological control, but also raises the question of the appropriateness of sanitary measures. Despite the fact that the isolates were of expected sensitivity and without acquired resistance, ideal results would show absolute absence

апсолутно одсуство сојева *K. pneumoniae* у пијаћим и површинским водама. Само присуство овог микроорганизма у води отвара могућност да она у сваком моменту стекне гене резистенције различитим механизмима, као и да исте пренесе другим бактеријским врстама.

of strains of *K. pneumoniae* from drinking and surface waters. The mere presence of this microorganism in the water creates an opportunity of acquiring resistance genes at any moment by different mechanisms and further transfer of the genes to other bacterial species.

ЛИТЕРАТУРА

- Gunnarsdottir M, Gardarssona S, Bartramb J. Developing a national framework for safe drinking water- Case study from Iceland. *Int J Hyg Envir Heal*. 2015; 218(2): 196-202.
- Shahid N, Zia Z, Shahid M, et al. Assessing Drinking Water Quality in Punjab, Pakistan. *Pol J Environ Stud*. 2015; 24(6): 597-2606.
- Kostyla C, Bain R, Cronk R, Bartram J. Seasonal variation of fecal contamination in drinking water sources in developing countries: A systematic review. *Sci Total Environ*. 2015; 514: 333-43.
- Cabral JP. Water microbiology- bacterial pathogens and water. *Int J Environ Res*. 2010;7(10): 3657- 703.
- Tran NH, Gin KY, Ngo HH. Fecal pollution source tracking toolbox for identification, evaluation and characterization of fecal contamination in receiving urban surface waters and groundwater. *Sci Total Environ*. 2015; 538: 38-57.
- Gazzaz NM, Yusoff MK, Ramli MF, Aris AZ, Juahir H. Characterization of special patterns in river water quality using chemometric pattern recognition techniques. *Mar Pollut Bull*. 2012; 64(4): 688-98.
- Skariyachan S, Mahajanakatti AB, Grandhi NJ, et al. Environmental monitoring of bacterial contamination and antibiotic resistance patterns of the fecal coliforms isolated from Cauvery River, a major drinking water source in Karnataka, India. *Environ Monit Assess*. 2015;187(5):279. doi: 10.1007/s10661-015-4488-4. Epub 2015 Apr 21.
- Shaw JL, Monis P, Weyrich LS, et al. Using amplicon sequencing to characterize and monitor bacterial diversity in drinking water distribution systems. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81(18): 6163-73.
- Brooks G, Carroll K, Butel J, Morse S. Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology. 24th ed. New York: McGraw-Hill; 2007.
- Tofteland S, Naseer U, Lislevand JH, Sundsfjord A, Samuelsen O. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. *Plos Med*. 2013;8(3):e59015. doi: 10.1371/journal.pone.0059015. Epub 2013 Mar 11.
- Bergeron S, Boopathy R, Nathaniel R, Corbin A, LaFleur G. Presence of antibiotic resistant bacteria and antibiotic resistance genes in raw source water and treated drinking water. *Int Biodeter Biodegr*. 2015; 102: 370-4.
- Caniça M, Manageiro V, Jones-Dias D, et al. Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. *Res Microbiol*. 2015;166(7):594-600.
- Amos GC, Zhang L, Hawkey PM, Gaze WH, Wellington EM. Functional metagenomic analysis reveals rivers are a reservoir for diverse antibiotic resistance genes. *Vet Microbiol*. 2014; 171(3-4): 441-7.
- Finely RL, Collingnon P, Larsson DG, et al. The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(5): 704-10.
- Ho J, Tambyah PA, Paterson DL. Multiresistant Gram-negative infections: a global perspective. *Curr Opin Infect Dis*. 2010; 23(6): 546-53.
- Venieri D, Fraggadaki A, Binas V, Zachopoulos A, Kiriakidis G, Mantzavinos D. Study of the generates genetic polymorphisms during the photocatalytic elimination of *Klebsiella pneumoniae* in water. *Photoch Photobio Sci*. 2015; 14(3): 206-13.
- Kvalitet vode - Otkrivanje i određivanje broja *Escherichia coli* i koliformnih bakterija - Deo 1: Metoda membranske filtracije (ISO 9308-1:2000). II izdanje. Beograd: Institut za standardizaciju Srbije; 2010.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 2.0, valid from 2012-01-01. Available: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_table_v_2.0_120221.pdf Available: 29 June 2012.
- Tsai TM, Chang HH, Chang KC, Liu YL, Tseng CC. Comparative study of the bactericidal effect of photocatalytic oxidation by TiO on antibiotic resistant and antibiotic sensitive bacteria. *J Chem Technol Biotechnol*. 2010; 85(12): 268-75.
- Wright GD. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5(3): 175-86.
- D'Costa VM, King CE, Kalan L, et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*. 2011; 477(7365): 457-61.
- Monier JM, Demaneche S, Delmont TO, Mathieu A, Vogel TM, Simonet P. Metagenomic exploration of antibiotic resistance in soil. *Curr Opin Microbiol*. 2011; 14(3): 229-35.
- Singh RK, Tiwari SP, Rai AK, Mohapatra TM. Cyanobacteria: an emerging source for drug discovery. *J Antibiot*. 2011; 64(6): 401-12.
- Lowe C, Willey B, O'Shaughnessy A, et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections associated with contaminated handwashing sinks. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18(8): 1242-7.
- Berglund B, Fick J, Lindgren PE. Urban waste water effluent increases antibiotic resistance gene concentrations in a receiving northern European river. *Environ Toxicol Chem*. 2015; 34(1): 192-6.
- Ali Khan G, Berglund B, Maqbool Khan K, Lindgren PE. Occurrence and abundance of antibiotics and resistance genes in rivers, canal and near drug

-
- formulation facilities- a study in Pakistan. *PloS One*. 2013;8(6):e62712. doi: 10.1371/journal.pone.0062712
27. Marinescu F, Marutescu L, Savin I, Lazar V. Antibiotic resistance markers among Gram-negative isolates from waste water and receiving rivers in South Romania. *Rom Biotech Lett*. 2015; 20(1): 155-69.
28. Matyar F, Gülnaz O, Guzeldag G, et al. Antibiotic and heavy metal resistance in Gram-negative bacteria isolated from the Seyhan Dam Lake and Seyhan River in Turkey. *Ann Microbiol*. 2014;64(3): 1033-40.
29. Lin J, Biyela PT, Puckree T. Antibiotic resistance profiles of environmental isolates from Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water SA*. 2014; 30(1): 23-8.
30. Carlet J, Collignon P, Golgmann D, et al. Society's failure to protect a precious resource: antibiotics. *Lancet*. 2011; 378 (9788): 369-71.
31. Leung E, Weil DE, Raviglione M, World Health Organization World Health Day Antimicrobial Resistance Technical Working Group. The WHO policy package to combat antimicrobial resistance. *Bull World Health Organ*. 2011;89(5): 390-2.