

Vankomicin rezistentni *Enterococcus faecium* u priobalnim vodama istočnog Jadrana

Dželalija, Mia; Kvesić, Marija; Maravić, Ana

Source / Izvornik: Zajednički temelji 2023. - uniSTem : deseti skup mladih istraživača iz područja građevinarstva i srodnih tehničkih znanosti, Split, 14.-17. rujna, 2023. : zbornik radova, 2023, 128 - 135

Conference paper / Rad u zborniku

Publication status / Verzija rada: **Published version / Objavljena verzija rada (izdavačev PDF)**

<https://doi.org/10.31534/10.ZT.2023.21>

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:123:096646>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[FCEAG Repository - Repository of the Faculty of Civil Engineering, Architecture and Geodesy, University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



VANKOMICIN REZISTENTNI *ENTEROCOCCUS FAECIUM* U PRIOBALNIM VODAMA ISTOČNOG JADRANA

Mia Dželalija¹, Marija Kvesić^{2,3}, Ana Maravić¹

(1) Department of Biology, Faculty of Science, University of Split, Croatia,
mdzelalij@pmfst.hr

(2) Center of Excellence for Science and Technology-Integration of Mediterranean Region,
University of Split, Croatia

(3) Doctoral study of Biophysics, Faculty of Science, University of Split, Croatia

Sažetak

Vankomicin rezistentan *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}) nalazi se među najvišim globalnim prioritetima u pogledu javnog zdravstva i okoliša kao važan oportunistički patogen. Sveobuhvatnim pristupom po pitanju javnog zdravlja po prvi put smo determinirali otpornost na antibiotike, gene virulencije te pripadnost ST- grupama u VRE_{fm} izolatima prikupljenim u priobalnim vodama. VRE_{fm} izolati iz priobalnih voda te efluenta otpadnih voda pokazali su sličnost po pitanju gena virulencije, ST profila i gena rezistencije na antibiotike. Svi izolati su nosili gen *vanA* te aminoglikozidne gene *aph(2'')-Ib* i *aph(2'')-Id*. Gen *hyl* bio je najrašireniji gen virulencije. Izolati se nalaze u deset ST grupa koje su dio CC17 klonalnog kompleksa, glavne epidemijske grupe povezane s bolničkim infekcijama, pri čemu prevladavaju ST117 i ST889 grupe koje su zajedničke za vodene i bolničke izolate što ukazuje na njihovo širenje u okoliš putem kanalizacije.

Ključne riječi: VRE_{fm}, morski okoliš, HLAR, rezistom, more, rezistencija, vankomicin

VANCOMYCIN-RESISTANT *ENTEROCOCCUS FAECIUM* IN THE COASTAL WATERS OF THE EASTERN ADRIATIC

Abstract

Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* (VRE_{fm}) is an opportunistic pathogen among the highest global priorities regarding public and environmental health. Following the One Health approach, we determined for the first time the antibiotic resistance and virulence genes and sequence type (ST) affiliation of VRE_{fm} recovered simultaneously from marine beach waters, the submarine outfall of a wastewater treatment plant and untreated discharge of sewage into the sea. Importantly, VRE_{fm} recovered from wastewater and coastal bathing waters shared similar virulence, multidrug resistance and ST profiles, posing a major threat to public health. All isolates carried the *vanA* gene, aminoglycoside-resistance genes *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, and *aph(2'')-Ib* and *aph(2'')-Id*. The *hyl* gene was the most prevalent virulence gene. The isolates belonged to 10 STs of the CC17 clonal complex, a major epidemic lineage associated with hospital-acquired infections and outbreaks, with ST117 and ST889 common to waterborne and hospital isolates, suggesting their sewage-driven dissemination.

Keywords: VRE_{fm}, marine environment, HLAR, resistome, seawater, vancomycine, resistance

1. Uvod

Najnoviji podaci o antibiotskoj rezistenciji ukazuju da su infekcije uzrokovane višestruko rezistentnim bakterijama među glavnim uzrocima smrti ljudi svih dobni skupina što je rezultiralo s ukupno 4,95 milijuna smrti u 2019. godini [1]. S obzirom na ograničeni broj učinkovitih terapijskih opcija i nedostatak novih antibakterijskih lijekova, borba protiv ovoga fenomena postaje sve izazovnije. 2017. godine Svjetska zdravstvena organizacija objavila je listu bakterija koje su prioritet za razvoj novih antibiotika, a ista je podijeljena na 3 dijela koja uključuju podjelu na: 'patogeni od kritične važnosti', 'patogeni velike važnosti' i 'patogeni srednje važnosti'. U srednjoj kategoriju, od velike važnosti, navedeni su i vankomicin-rezistentni *Enterococcus faecium* (VREfm)[2].

Enterokoki kao fekalne bakterije uključujući i VREfm, mogu dospjeti u vodeni okoliš putem otpadnih voda iz bolnica i komunalnih sustava [3,4]. Na temelju pregleda literature pronađeno je pet VREfm izolata pozitivnih na *vanA* ili *vanB* u morskoj vodi na javnim plažama i ribarskim molovima [5,6,7,8]. Važno je napomenuti da prethodne studije nisu sveobuhvatno analizirale VREfm povezujući morsko okruženje, ispuštanje otpadnih voda i bolnička okruženja kao rezervoare VREfm. Stoga smo molekularno okarakterizirali okolišne VREfm izolate dobivene istovremeno iz neobrađenih i obrađenih otpadnih voda, morske vode blizu izljeva otpadnih voda na javnoj plaži te usporedili s izolatima iz sveučilišne bolnice KBC Split. Cilj je bio prvi put testirati hipotezu da se VREfm sličnih genotipova šire u južnoj Hrvatskoj i dopijevaju u priobalne vode putem obrađenih i neobrađenih otpadnih voda.

2. Materijali i metode

2.1 Lokacije istraživanja

Studija se fokusirala na visoko urbaniziranu obalu Kaštelanskog zaljeva koja je konglomerat gradova Trogira, Kaštela, Solina i Splita s oko 350.000 stanovnika. Prva lokacija (BW: 43°32'42.1"N, 16°25'41.0"E) je javna plaža koja se nalazi u gradu Kaštela i koristi se za kupanje i druge rekreacijske svrhe, ranije identificirana kao fekalno onečišćena [9] i moćan rezervoar gram-negativnih patogena otpornih na više antibiotika [10]. Drugo mjesto uzorkovanja (SW: 43°32'41.2"N, 16°25'37.3"E) najbliži je izlaz gore spomenutoj plaži. Treća lokacija je podmorski ispust pročišćenih otpadnih voda (SB: 43°28'53.6" N, 16°31'04.3 "E), koji se nalazi na dubini od 37 m u Bračkom kanalu. Uzorkovanje i fizikalno-kemijska analiza otpadnih voda s ovog lokaliteta provedena je u sklopu našeg prethodnog istraživanja [15]. Svi uzorci vode prikupljeni su u tri primjerka. Voda s plaže (BW) prikupljena je 1 m od obale i otprilike 20 cm ispod površine u sterilne boce od boro silikatnog stakla od 1 L. Nepročišćena otpadna voda (SW) uzorkovana je približno 50 cm od obalnog ispusta i 20 cm ispod površine mora. Efluent iz podmorskog kanalizacijskog ispusta Stobreč-Stupe (SB) sakupljen je pri morskom dnu uz pomoć Niskin uzorkivača. Svi uzorci su tijekom transporta pohranjeni u prijenosnom hladnjaku i analizirani unutar 4 sata.

2.2 Fizikalno-kemijski parametri i fekalno onečišćenje

Razina fekalnog onečišćenja na istraživanim lokacijama procijenjena je brojanjem *E. coli* (ISO 9308-1:2014) [30] i fekalnih enterokoka (ISO 7899-2:2000) [31]. Fizikalno-kemijske parametre uzoraka SB odredili su Kvesić i sur. [12]. Temperatura, salinitet i pH uzoraka BW i SW zabilježeni su ručnim YSI Pro1030 mjeracom pH i vodljivosti s pH 1002 senzorom. Koncentracije otopljenih anorganskih nutrijenata (nitrati, nitriti, amonijak i ortofosfati) te koncentracije ukupnog dušika i fosfora (nakon UV oksidacije) određene su kolorimetrijski u nefiltriranim uzorcima pomoću kolorimetra AutoAnalyzer III (Seal Analytical). Ukupni dušik (NTOT) i fosfor (PTOT) analizirani su u nefiltriranim uzorcima nakon autoklaviranja u kiseloj otopini kalijevog persulfata na 130 °C tijekom 120 minuta [13].

2.3 Izolacija, identifikacija te antibiotska osjetljivost vankomicin rezistentnih sojeva

Volumeni od 100 ml filtrirani su kroz 0.45- μ m membranske filtere (Sartorius, Njemačka) te su membrane stavljene na kromogeni agar ChromID VRE (bioMerieux, Francuska) za selekciju fenotipova otpornih na vankomicin (VAN). Ploče su inkubirane aerobno na 37°C i pregledane nakon 24 h i 48 h inkubacije. Ljubičasto obojene kolonije odabrane su kao pretpostavljeni VREfm i identificirane na razini vrste korištenjem masene spektrometrije uz pomoć laserske ionizacije (MALDI-TOF, MALDI-Biotyper), (Bruker Daltonics, Bremen, Njemačka) u skladu s uputama proizvođača.

Testiranje osjetljivosti na antibiotike provedeno je metodom disk-difuzije na ampicilin (AMP, 2 μ g), gentamicin (GEN, 30 μ g), VAN (5 μ g), tetraciklin (TEC, 30 μ g), tigeciklin (TGC, 15 μ g) i linezolid (LZD, 10 μ g) prema smjernicama Europskog odbora za ispitivanje osjetljivosti na antimikrobne lijekove [14]. Fenotip visoke razine otpornosti na aminoglikozide (HLAR) definiran je ako zone inhibicije GEN diskom (30 μ g/ml) <8 mm korištenjem disk-difuzijskog testa [14].

2.4 Molekularna identifikacija gena rezistencije na antibiotike

Izolatima su određeni geni koji kodiraju faktore virulencije, uključujući tvar agregacije (*asa1*), citolizin (*cyIA*), enterokokni površinski protein (*esp*), želatinazu (*gelE*), protein koji veže kolagen (*ace*), antigen endokarditisa (*efaA*) i hijaluronidazu (*hyl*) korištenjem početnica i protokola za PCR koje su opisali Golob i sur. [15], kao i serin proteaze (*sprE*) prema Stępień-Pyśniak i sur. [16].

Multiplex PCR je proveden kako bi se otkrili geni koji kodiraju rezistenciju na vankomicin i aminoglikozide. Geni *vanA*, *vanB*, *vanC1* i *vanC2/C3* određeni su prema protokolu Saida i Abdelmegeeda [17], dok su geni koji kodiraju AME, uključujući *aph(3')-IIIa*, *ant(4')-Ia*, *aac(6')-Ie-aph(2'')-Ia*, *aph(2'')-Ib*, *aph(2'')-Ic* i *aph(2'')-Id* određeni kako su prethodno opisali Özdemir i Tuncer [18].

Svi izolati VREfm uključeni u ovu studiju okarakterizirani su MLST-om. Pojedinačne PCR reakcije provedene su upotrebom početnica i uvjeta koje su opisali Homan i sur. [19] kako bi detektirali sedam kućnih gena (*atpA*, *ddl*, *gdh*, *purK*, *gyd*, *adk* i *pstS*). PCR produkti su pročišćeni i sekvencirani u oba smjera korištenjem Sanger metode u MacroGen Europa servisu (Amsterdam, Nizozemska). Dobivene sekvence su poravnate pomoću alata Clustal

Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) i uspoređene s referentnim alelima dostupnim u PubMLST bazi podataka (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium>).

3. Rezultati

3.1. Fizikalno-kemijski parametri i fekalno onečišćenje

Fizikalno-kemijski i mikrobiološki parametri vode na plaži i morske vode koja prima otpadne vode prikazani su u tablici 1. Očekivano, najveće koncentracije hranjivih tvari, kao i fekalnih indikatorskih bakterija (FIB; ≥ 105 CFU/100 mL), zabilježene su na SW (netretirana otpadna voda). Slijedom toga, u uzorcima s obližnje javne plaže (BW) otkriveno je fekalno onečišćenje, ali su vrijednosti FIB-a bile unutar vrijednosti definiranih za izvrsnu kakvoću mora za kupanje prema hrvatskom zakonodavstvu (Uredba o kakvoći mora za kupanje; NN 73/08).

Parameter	Unit	BW	SW	SB
Microbiological				
<i>E. coli</i>	CFU/100 mL	21.67	4.1×10^5	123.9
<i>Intestinal enterococci</i>	CFU/100 mL	53.33	1×10^5	33.33
Physical				
Temperature	°C	22.9	12.2	16.25
Salinity	‰	33.3	20.2	38.73
pH		8.17	7.99	8.1
Chemical				
NO ₃	µmol/L	5.81	3.03	0.07
NO ₂	µmol/L	0.021	3.32	0.03
N-NH ₄	µmol/L	0.37	135.6	0.04
PO ₄	µmol/L	0.085	6.2	0.05
PTOT	µmol/L	0.242	9.27	0.15
NTOT	µmol/L	11.92	174	6.29

Tablica 1. Fizikalno-kemijski i mikrobiološki parametri obalne vode (BW), neobrađene otpadne vode (SW) i morske vode koja prima otpadne vode uz podzemski kanalizacijski ispust UPOV-a Stobreč-Stupe (SB). Kratice: TDS, Ukupne otopljene soli; SO₄²⁻, sulfati; NO₃⁻ nitriti; NO₂⁻, nitriti; N-NH₄, amonijak; NTOT, ukupan dušik; PO₄³⁻, fosfati; PTOT, ukupni fosfor.

3.2 Molekularna karakterizacija izolata i osjetljivost na antibiotike

Ukupno je izolirano 35 vankomicin (VAN) rezistentnih izolata, uključujući 4 s javne plaže (BW) i 31 iz morskih ispusta pročišćene (SB) i netretirane kanalizacije (SW). Osim prisutne rezistencije na VAN, svi izolati bili su otporni na AMP i TEC, dok su gotovo svi izolati iz okoline (34/35) bili otporni na GEN pokazujući HLAR fenotip. Gen *vanA* identificiran je u svim izolatima iz okoline. Što se tiče gena rezistencije na aminoglikozide geni *aph(2''-Ib)* i *aph(2''-Id)* bili su dominantni u izolatima iz okoliša (32/35), ali istovremeno prisutni u 19 izolata. Gen virulencije *hyl* koji kodira hijaluronidazu bio je najzastupljeniji u svim vodenim VREfm izolatima.

MLST analiza dodijelila je izolate 10 ST grupa, a sve su pripadale CC17. ST1888, ST1889 i ST1890 bili su novo identificirani ST grupe u ovoj studiji i otkriveni samo među izolatima iz morske vode koja prima otpadne vode (SW i SB). ST177 i ST889 bili su najčešći i bili su povezani s bolničkim i okolišnim VREfm, bez obzira na njihovo podrijetlo. Izolati iz vode s plaže i ispusta nepročišćenih otpadnih voda uglavnom su povezani s ove dvije ST grupe.

Gotovo polovica (15/35) izolata iz okoliša, uključujući 14 iz ispusnih otpadnih voda i 1 s plaže, pripadalo je ST117, dok je 13 izolata (9 iz otpadnih voda, 2 s plaže) pripadalo ST889.

4. Diskusija

Cilj ovog istraživanja bio je utvrditi molekularne karakteristike rezistencije na antibiotike i virulencije VREfm-a koji postoji u otpadnim i obalnim morskim sredinama u Hrvatskoj. VREfm prikupljeni su iz vode javne plaže, podmorskog ispusta UPOV-a na 37 m dubine i iz ispusta neobrađene otpadne vode u more kako bi se procijenila epidemiološka opasnost za njihov prijenos i puteve unošenja u prirodni okoliš.

Važno je napomenuti da nedostaju studije koje su se sveobuhvatno bavile ovim rastućim zdravstvenim problemom u morskom okolišu. Samo je nekoliko studija identificiralo *van* genotip morskih VREfm izolata, što je relevantno iz epidemiološke perspektive. Geni *vanA* ili *vanB* identificirani su u VREfm iz morske vode s javnih plaža u Sjedinjenim Državama [8] i u VRE iz vode s plaža u Portoriku [20], ali izolati nisu dodatno molekularno karakterizirani.

Gen *vanA* otkriven je u svim izolatima iz okoliša. Dominacija rezistencije posredovane *vanA* u VREfm-u u skladu je sa studijama iz nekoliko drugih zemalja [21,22]. Ovaj je gen identificiran u nadzornom izolatu hematološkog bolesnika u splitskoj sveučilišnoj bolnici [28], što ukazuje na širenje ovog genotipa rezistencije u južnoj Hrvatskoj posljednjih godina. Jakovac i sur. [29] utvrdili su da u kliničkim izolatima VREfm iz Hrvatske prevladava rezistencija posredovana *vanB*, a zatim *vanA*.

Važno je napomenuti kako su izolati sadržavali gene otpornosti na aminoglikozide *aph(2'')-Ib* i *aph(2'')-Id* koji su pretežno pronađeni i u izolatima prethodno izoliranih u splitskoj sveučilišnoj bolnici, što uključuje 13 izolata (1 iz vode s plaže i 12 iz netretiranih otpadnih voda). Morski izolati su, također, nosili gen virulencije *hyl*, što dodatno ukazuje na njihovu povezanost s bolnicom. Usprkos tome, činjenica da je većina bolničkih nadzornih izolata pripadala ST117 grupi koja je, također, najzastupljenija među izolatima koji se prenose vodom (15/35) snažno sugerira da je ST117 grupa od posebne važnosti za širenje VREfm-a u Hrvatskoj. Osim toga, bolnički i vodeni izolati ST117 dijele istu virulentnost i slične gene rezistencije na antibiotike, što ukazuje na moguću neotkrivenu cirkulaciju između bolnice i prirodnog okoliša. Grupa ST117 VREfm *vanA* tipa globalno su rašireni (<https://pubmlst.org/organisms/enterococcus-faecium>) i često se otkrivaju u europskim bolnicama, kao i kolonizacijski izolati te uzročnici nozokomijalnih epidemija [21,22,23]. Otkrili su da VREfm tipa *vanA* prevladava u talijanskim bolnicama i da one uglavnom pripadaju ST78, ST80 i ST117.

Prisutnost enterokoka, čak i VRE, i povezanih gena u otpadnim vodama UPOV-a u većoj količini nego u netretiranim otpadnim vodama već je prijavljena. Naime, nekoliko je studija dokazalo da pročišćavanje otpadnih voda može čak doprinijeti obogaćivanju VRE i *vanA* [24,25] dok su VRE otkriveni u različitim fazama procesa pročišćavanja otpadnih voda što sugerira da bi ispuštanje otpadnih voda moglo biti djelomično odgovorno za širenje VRE u okoliš i dalje u širu populacijsku zajednicu [26,27].

5. Zaključak

Ovaj rad izvješćuje o prvoj sveobuhvatnoj studiji visokoprioritetnog patogena VREfm izdvojenog iz obalnog morskog okoliša s fokusom na otpornost na antibiotike, virulenciju i ST pripadnost kako bi se prikazala raznolikost ST i putova uvođenja visokorizičnih klonova u prirodni okoliš. Donosimo i prve podatke o raznolikosti VREfm ST u Hrvatskoj. Genotip *vanA* prevladavao je među vodenim izolatima iz ove studije naglašavajući relevantnost ST117 i ST889 grupe u cirkulaciji okolišnih VREfm izolata iste virulentnosti i sličnih svojstava otpornosti na više antibiotika koji su slični bolničkim. Ispuštanje netretirane gradske kanalizacije u more, kao i ispusti podmorskih UPOV-a, dokazuju se kao kontinuirani putevi za uvođenje nekoliko glavnih ST-ova VREfm-a povezanih sa zdravstvenom skrbi, kao i drugih patogenih i bakterijskih populacija rezistentnih na antibiotike u obalni morski okoliš uključujući vode javnih plaža testvarajući ozbiljnu opasnost za oportunističke infekcije i objektivan rizik za daljnje širenje sojeva i povezanih gena rezistencije u prirodnom okruženju.

Literatura

- [1] Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Aguilar, G. R., Gray, A., et al., 2022. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0).
- [2] WHO, 2017. Essential medicines and health products: Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. Available online at: <http://www.who.int/medicines/publications/globalpriority-list-antibiotic-resistant-bacteria> (Last accessed 7th July 2021).
- [3] Ekwanzala, M.D., Dewar, J.B., Kamika, I., Momba, M.N.B., 2020. Comparative genomics of vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. revealed common resistome determinants from hospital wastewater to aquatic environments. *Sci. Total Environ.*, 719, 137275. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137275>.
- [4] Gotkowska-Płachta, A. 2021. The Prevalence of Virulent and Multidrug-Resistant *Enterococci* in River Water and in Treated and Untreated Municipal and Hospital Wastewater. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 18(2), 563. <https://doi.org/10.3390/ijerph18020563>.
- [5] Roberts, M.C., Soge, O.O., Giardino, M.A., Mazengia, E., Ma, G., Meschke, J.S., 2009. Vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. in marine environments from the West Coast of the USA. *J. Appl. Microbiol.* 107(1), 300-307. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04207.x>.
- [6] Monticelli, L. S., Decembrini, F., Bergamasco, A., Caruso, G., 2019. Water quality assessment of transitional and coastal marine Sicilian waters (Italy): Ecological and epidemiological significance of multiple antimicrobial resistant *Enterococcus* spp. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 217, 173-184. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.11.021>.
- [7] de Oliveira, A.J.F.C., Pinhata, J.M.W., 2008. Antimicrobial resistance and species composition of *Enterococcus* spp. isolated from waters and sands of marine recreational beaches in Southeastern Brazil. *Water Res.*, 42(8-9), 2242-2250. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.12.002>.
- [8] Alipour, M., Hajiesmaili, R., Talebjannat, M., Yahyapour, Y., 2014. Identification and antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolated from the river and coastal waters in northern Iran. *Sci. World J.*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/287458>.

- [9] Ordulj, M., Jozić, S., Baranović, M., Krželj, M., 2022. The Effect of Precipitation on the Microbiological Quality of Bathing Water in Areas under Anthropogenic Impact. *Water*, 14(4), 527.
- [10] Maravić, A., Šamanić, I., Šprung, M., Fredotović, Ž., Ilić, N., Dragičević, J., Puizina, J., 2018. Broad-spectrum resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from shellfish: infrequent acquisition of novel resistance mechanisms. *Environ. Monit. Assess.*, 190(2), 81. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6471-3>.
- [11] Knezić, S., Margeta, J., 2002. Integrated management of coastal sewerage systems: the case of Kaštela Bay, Croatia. *Water Resour. Manag.* 16(4), 279-305. <https://doi.org/10.1023/A:1021957308487>.
- [12] Kvesić, M., Kalinić, H., Dželalija, M., Šamanić, I., Andričević, R., Maravić, A., 2022. Microbiome and antibiotic resistance profiling in submarine effluent-receiving coastal waters in Croatia. *Environ. Pollut.*, 292, 118282. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118282>.
- [13] Mckelvie, I.D., Peat D.M.W., Worsfold, P.J., 1995. Techniques for the quantification and speciation of phosphorus in natural waters. *Anal. Proc. Incl. Anal. Comm.*, 32: 437-445.
- [14] EUCAST, 2020. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 10.0. <http://www.eucast.org>. (Last accessed 7th December 2020).
- [15] Golob, M., Pate, M., Kušar, D., Dermota, U., Avberšek, J., Papić, B., et al., 2019. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *Biomed Res. Int.*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2815279>.
- [16] Stępień-Pyśniak, D., Hauschild, T., Kosikowska, U., Dec, M., Urban-Chmiel, R., 2019. Biofilm formation capacity and presence of virulence factors among commensal *Enterococcus* spp. from wild birds. *Sci. Rep.*, 9(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47602-w>.
- [17] Said, H.S., Abdelmegeed, E.S., 2019. Emergence of multidrug resistance and extensive drug resistance among enterococcal clinical isolates in Egypt. *Infect. Drug Resist.*, 12, 1113. <https://doi.org/10.2147/IDR.S189341>.
- [18] Özdemir, R., Tuncer, Y., 2020. Detection of antibiotic resistance profiles and aminoglycoside-modifying enzyme (AME) genes in high-level aminoglycoside-resistant (HLAR) enterococci isolated from raw milk and traditional cheeses in Turkey. *Mol. Biol. Rep.* 47(3), 1703-1712. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05262-4>.
- [19] Homan, W. L., Tribe, D., Poznanski, S., Li, M., Hogg, G., Spalburg, E., et al. (2002). Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.*, 40(6), 1963-1971. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.6.1963-1971.2002>.
- [20] Santiago-Rodriguez, T.M., Rivera, J.I., Coradin, M., Toranzos, G.A., 2013. Antibiotic-resistance and virulence genes in *Enterococcus* isolated from tropical recreational waters. *J. Water Health*, 11(3), 387-396. <https://doi.org/10.2166/wh.2013.005>.
- [21] Freitas, A.R., Tedim, A.P., Francia, M.V., Jensen, L.B., Novais, C., Peixe, L., et al., 2016. Multilevel population genetic analysis of *vanA* and *vanB* *Enterococcus faecium* causing nosocomial outbreaks in 27 countries (1986–2012). *J. Antimicrob. Chemother.*, 71(12), 3351-3366. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw312>.
- [22] Fioriti, S., Simoni, S., Caucci, S., Morrioni, G., Ponzio, E., Coccitto, S. N., et al., 2020. Trend of clinical vancomycin-resistant enterococci isolated in a regional Italian hospital

- from 2001 to 2018. *Braz. J. Microbiol.*, 51(4), 1607-1613. <https://doi.org/10.1007/s42770-020-00360-8>.
- [23] Tedim, A. P., Lanza, V. F., Manrique, M., Pareja, E., Ruiz-Garbajosa, P., Cantón, R., et al., 2017. Complete genome sequences of isolates of *Enterococcus faecium* sequence type 117, a globally disseminated multidrug-resistant clone. *Genome Announc.*, 5(13), e01553-16. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01553-16>.
- [24] Rosenberg Goldstein, R. E., Micallef, S. A., Gibbs, S. G., George, A., Claye, E., Sapkota, A., et al., 2014. Detection of vancomycin-resistant enterococci (VRE) at four US wastewater treatment plants that provide effluent for reuse. *Sci. Total Environ.*, 466, 404-411. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.039>.
- [25] Makowska, N., Bresa, K., Koczura, R., Philips, A., Nowis, K., Mokracka, J., 2021. Urban wastewater as a conduit for pathogenic Gram-positive bacteria and genes encoding resistance to β -lactams and glycopeptides. *Sci. Total Environ.* 765:144176. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144176>.
- [26] Guardabassi, L., & Dalsgaard, A. 2004. Occurrence, structure, and mobility of Tn 1546-like elements in environmental isolates of vancomycin-resistant enterococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 70(2), 984-990. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.984-990.2004>
- [27] Caplin, J.L., Hanlon, G.W., Taylor, H.D., 2008. Presence of vancomycin and ampicillin-resistant *Enterococcus faecium* of epidemic clonal complex-17 in wastewaters from the south coast of England. *Environ. Microbiol.*, 10, 885 – 892. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01507.x>.
- [28] Goić-Barišić, I., Radić, M., Novak, A., Rubić, Ž., Boban, N., Lukšić, B., et al., 2020. Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Colonization and *Clostridium difficile* Infection in a Hematologic Patient. *Acta Clin. Croat.* 59(3), 523-528. <https://doi.org/10.20471/acc.2020.59.03.17>.
- [29] Jakovac, S., Bojić, E. F., Ibrišimović, M. A., Tutiš, B., Ostojić, M., Hukić, M., 2017. Characteristics of vancomycin-resistant *Enterococcus* strains in the West Balkans: a first report. *Microb. Drug Resist.*, 23(1), 122-126. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0355>.
- [30] International Organization for Standardization, 2000. Water quality - detection and enumeration of intestinal enterococci. Part 2. Membrane filtration method. ISO 7899-2:2000. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
- [31] International Organization for Standardization, 2014. Water quality - detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Part 1: membrane filtration method. ISO 9308-1:2014. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.