



# NAČRT EPIDEMIOLOŠKEGA SPREMLJANJA SARS-CoV-2 V ODPADNIH VODAH V SLOVENIJI

---

## Načrt epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji

### Avtorji dokumenta

#### Nacionalni inštitut za javno zdravje

asist. An Galičič, mag. san. inž.

Natalija Kranjec, dipl. san. inž. (UN)

#### Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano

doc. dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikr.

dr. Tjaša Cerar Kišek, univ. dipl. mikr.

Tom Koritnik, prof. biol.

Tea Janko, dipl. bioinf.

Vid Vedlin, mag. farm.

**Strokovni pregled** | dr. Veronika Učakar, dr. med., spec. javnega zdravja

**Oblikovanje naslovnice** | Tadeja Horvat

**Izdajatelj** | Nacionalni inštitut za javno zdravje, Trubarjeva ulica 2, Ljubljana

**Izdaja** | 1. izdaja

**Kraj in leto izdaje** | Ljubljana, 2023

**Elektronska izdaja**

**Spletni naslov** | [www.nijz.si](http://www.nijz.si)

**Besedilo ni lektorirano.**

**Zaščita dokumenta** | © 2023 NIJZ

Vse pravice pridržane. Reprodukcijska po delih ali v celoti na kakršenkoli način in v kateremkoli mediju je dovoljena le z navedbo vira.

---

## Kazalo vsebine

<b>1</b>	<b>Uvod.....</b>	<b>4</b>
<b>2</b>	<b>Strokovna izhodišča za epidemiološko spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji. 5</b>	
2.1	Ključne značilnosti covida-19 .....	5
2.2	Epidemiologija covida-19 v Sloveniji .....	7
2.3	Spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah.....	9
<b>3</b>	<b>Načrt epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji.....</b>	<b>11</b>
3.1	Namen spremljanja .....	11
3.2	Frekvenca in lokacije vzorčenja .....	11
3.3	Vzorčenje in transport vzorcev odpadnih vod .....	12
3.4	Obdelava vzorcev v laboratoriju odpadnih vod .....	12
3.5	Dokaz SARS-CoV-2 v vzorcih odpadnih vod.....	13
3.6	Natančna karakterizacija genomov SARS-CoV-2 .....	13
3.7	Poročanje rezultatov laboratorijskih preiskav Nacionalnemu inštitutu za javno zdravje .....	13
3.8	Priprava epidemioloških kazalnikov .....	14
3.9	Javne objavljanje rezultatov epidemiološkega spremljanja .....	15
3.10	Interpretacija rezultatov epidemiološkega spremljanja .....	16
3.11	Redno usklajevanje med Nacionalnim inštitutom za javno zdravje in Nacionalnim laboratorijem za zdravje, okolje in hrano.....	16
<b>4</b>	<b>Reference .....</b>	<b>17</b>

---

## Kazalo preglednic

Preglednica 1: Seznam komunalnih čistilnih naprav v Sloveniji, na katerih se izvaja redno vzorčenje odpadnih vod za spremljanje SARS-CoV-2 po statističnih regijah in pripadajočih občinah. .... 11

## Kazalo slik

Slika 1: Dnevno število potrjenih primerov okužb s SARS-CoV-2 in število umrlih v 28 dneh po diagnozi okužbe s SARS-CoV-2 v Sloveniji v obdobju 4. 3. 2020–31. 8. 2023 [12]. .... 7

Slika 2: Tedenska splošna presežna umrljivost v standardnih odklonih (z-vrednost), Slovenija, 2018–2023 [15]. .... 8

Slika 3: Geografski prikaz mreže vzorčenja odpadnih vod za sistem spremljanja SARS-CoV-2, pokritost občin in statističnih regij Slovenije. .... 12

## Uporabljene kratice

<b>ECDC</b>	Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
<b>KČN</b>	komunalna čistilna naprava
<b>KPK</b>	kemijska potreba po kisiku
<b>NIJZ</b>	Nacionalni inštitut za javno zdravje
<b>NLZOH</b>	Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano
<b>RNK</b>	ribonukleinska kislina
<b>SZO</b>	Svetovna zdravstvena organizacija (angl. World Health Organization)

---

## 1 Uvod

Covid-19 je nalezljiva respiratorna virusna bolezen, ki jo povzroča virus SARS-CoV-2. Prve zbolele in okužene osebe s SARS-CoV-2 so odkrili decembra 2019 v Vuhanu na Kitajskem [1]. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) je 30. januarja 2020 izbruh okužb s SARS-CoV-2, ki se je naglo začel širiti po svetu, razglasila za mednarodno nevarnost javnemu zdravju [2]. V Sloveniji je bil prvi primer okužbe s SARS-CoV-2 potrjen 4. marca 2020 [3]. 11. marca 2020 je SZO razglasila pandemijo bolezni covid-19 [4], dan zatem, 12. marca 2020, je tudi Vlada Republike Slovenije razglasila epidemijo bolezni covid-19 tudi pri nas [5]. SZO je fazo pandemije covida-19 preklical 5. maja 2023 [6].

Od aprila 2023 je bil nato v Sloveniji covid-19, glede javnozdravstvenih ukrepov za njegovo preprečevanje in obvladovanje, izenačen z ostalimi endemičnimi akutnimi okužbami dihal [7]. SARS-CoV-2 še naprej kroži v populaciji, vendar na nižjih in bolj obvladljivih ravneh, zbolelih s hudimi oblikami covida-19 je manj, obstoječe kapacitete zdravstvenega sistema večinoma niso več preobremenjene. Kljub temu je nujno vzdrževati sisteme epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v populaciji, saj zaradi mutacij virusa pogosto prihaja do pojava novih različic virusa, ki bi potencialno lahko predstavljale izziv pri obvladovanju covida-19, saj bi se lahko hitreje širile med prebivalci, cepljenje in drugi farmakološki ukrepi pa bi bili manj učinkoviti [8].

SZO kot pomemben sistem spremljanja pojavljanja SARS-CoV-2 v populaciji priporoča tudi spremljanje v odpadnih vodah [9], k vzpostavitvi katerega je pristopila tudi Slovenija. Za namen vzpostavitve spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah so bila pripravljena strokovna izhodišča in predlog vzpostavitve [10]. Rezultati vzpostavljenega sistema spremljanja SARS-CoV-2 v odpadni vodi v Sloveniji so od konca februarja 2023 redno tedensko objavljeni na spletni strani Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ) [11]. Na podlagi vzpostavljenega sistema spremljanja in pridobljenih izkušenj je v pričujočem dokumentu natančno opisan postopek epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji. Postopek se prične z odvzemom vzorca na komunalni čistilni napravi (KČN) in zaključí z interpretacijo rezultatov epidemiološkega spremljanja.

Pričujoči dokument je nastal v sodelovanju strokovnjakov NIJZ s strokovnjaki Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH). Pri razvoju epidemiološkega kazalnika spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah (ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev) smo sodelovali s prof. dr. Herbertom Oberacherjem z Institute of Legal Medicine and Core Facility Metabolomics, Medical University of Innsbruck.

---

## 2 Strokovna izhodišča za epidemiološko spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji

### 2.1 Ključne značilnosti covid-19

#### **Povzročitelj**

Povzročitelj covid-19 je virus SARS-CoV-2, ki spada med koronaviruse. Zaradi mutacij virusa SARS-CoV-2 pogosto prihaja do pojava novih različic virusa. Nove različice virusa lahko potencialno predstavljajo izziv pri obvladovanju covid-19, saj se lahko hitreje širijo med prebivalci in so lahko manj občutljive za cepiva in obstoječa zdravila.

#### **Inkubacijska doba**

Inkubacijska doba (čas od okužbe do pojava bolezni) je 2 do 14 dni, v povprečju 5 do 6 dni. Inkubacijska doba se razlikuje med posameznimi različicami povzročitelja. V času prevladovanja različice omikron je ocenjena mediana inkubacijske dobe 3 do 4 dni.

#### **Način prenosa**

Virus se prenaša s kužnimi kapljicami, vključno z aerosoli, ki nastanejo ob kašljanju, kihanju, govorjenju ali pospešenem dihanju okužene osebe. Lahko pa se prenaša tudi posredno preko onesnaženih površin ali predmetov. Virus se zlahka širi v prenatrpanih ali slabo prezračevanih notranjih prostorih.

#### **Dovzetnost za okužbo**

Za okužbo so dovzetni vsi. Bolezen ne zapušča trajne imunosti oziroma se ta zmanjšuje s časom, zato lahko zbolijo tudi osebe, ki so bolezen že prebolele.

#### **Simptomi in znaki bolezni**

Simptomi covid-19 se gibljejo od blage okužbe zgornjih dihal do hude prizadetosti pljuč z dihalno stisko, ki se lahko konča celo s smrtjo. Okužba s SARS-CoV-2 pa lahko poteka tudi brez simptomov. Pri večini okuženih se pojavijo vročina, bolečine v žrelu, kašelj, izcedek iz nosu, slabo počutje, utrujenost, bolečine v mišicah in sklepih, lahko tudi izguba vonja in okusa ter prebavne težave.

Bolezen včasih lahko poteka težje. Najpogostejši zaplet covid-19 je pljučnica. Lahko se pojavijo krvni strdki in prizadetost drugih organov, kot so npr. srce, ledvica, možgani. Večje tveganje za težji potek bolezni imajo starejši ljudje in kronični bolniki.

Pri nekaterih osebah simptomi bolezni lahko vztrajajo še več tednov, mesecev ali celo let, kar imenujemo dolgi covid ali postcovidni sindrom. Med težavami so v ospredju utrujenost, zasoplost, zmanjšana telesna zmogljivost, rahlo povišana telesna temperatura, problemi s koncentracijo, težave pri iskanju besed, motnje spanja, mišične bolečine, glavobol. Dolgi covid se lahko razvije pri vsakem bolniku s covidom-19, ne glede na resnost bolezni ali načine zdravljenja. Povečano tveganje za dolgi covid imajo ženske, kronični bolniki in necepljene osebe.

---

## Diagnoza

Okužbo z virusom SARS-CoV-2 se lahko dokaže z mikrobiološkim testiranjem: verižno reakcijo s polimerazo ali hitrim antigenim testom brisa nosnega oz. nosno-žrelnega prostora.

## Kužnost

Okužena oseba seba je kužna že dva dni pred pojavom simptomov in do največ 10 dni po pojavu simptomov. Osebe s težko obliko covid-19 in imunsko oslABLJENE osebe so lahko kužne dlje časa, in sicer do 20 dni po pojavu simptomov.

## Zdravljenje

Pri osebah z blago obliko covid-19 zadostuje počitek in lajšanje simptomov (npr. zdravila za zniževanje telesne temperature in lajšanje glavobola ter bolečin v mišicah in sklepih).

Odobrenih je nekaj protivirusnih zdravil za zgodnje zdravljenje covid-19 pri osebah z večjim tveganjem za težji potek in neugoden izid covid-19. Pri osebah s težjo obliko covid-19 je potrebno zdravljenje v bolnišnici.

## Preprečevanje okužbe

Za preprečevanje širjenja okužbe, tako kot pri drugih akutnih okužbah dihal, so pomembni naslednji ukrepi:

- pogosto si umivamo ali razkužujemo roke;
- z neumitimi rokami se ne dotikamo ust, nosu in oči;
- izogibamo se zadrževanju v natrpanih zaprtih prostorih oz. če je mogoče, vzdržujemo medosebno razdaljo (2 metra);
- prostore redno zračimo;
- osebe s simptomi in znaki covid-19 naj ostanejo doma dokler simptomi ne izzvenijo in po potrebi kontaktirajo svojega izbranega zdravnika;
- kašljamo in kihamo v rokav ali robček za enkratno uporabo, ki ga po uporabi odvržemo v koš in si nato umijemo ali razkužimo roke;
- pred okužbo se lahko dodatno zaščitimo z uporabo maske, posebej če spadamo v skupino, ogroženo za težek potek bolezni.

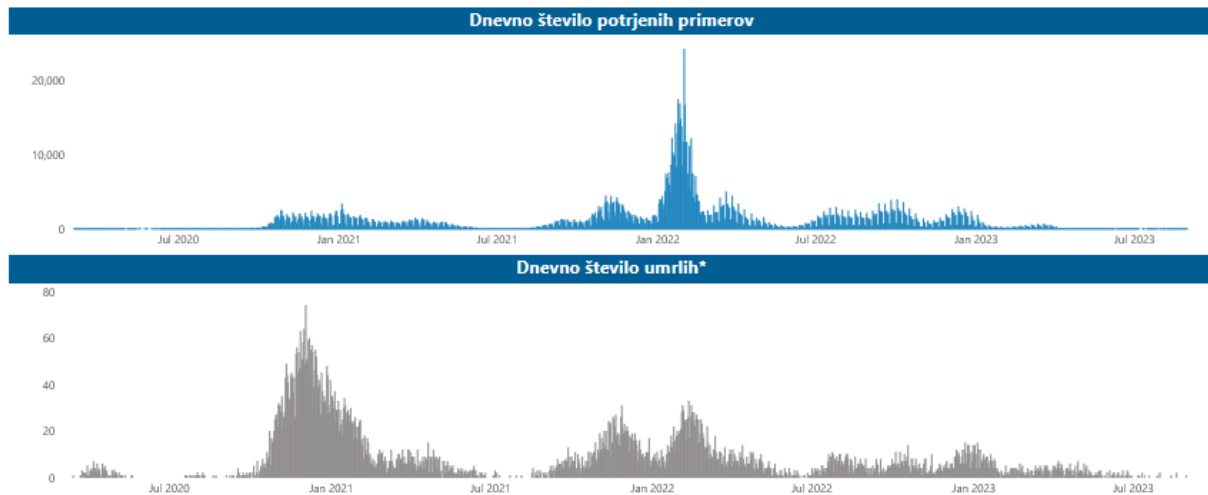
Za zaščito pred covidom-19, zlasti pred težjo obliko bolezni, je na voljo cepljenje proti covidu-19, ki je priporočljivo za osebe s povečanim tveganjem za težji potek bolezni (starejši, posebej ranljivi kronični bolniki, oskrbovanci domov za starejše občane in drugih socialno-varstvenih zavodov).

Vsebina poglavja 2.1 *Ključne značilnosti covid-19* je bila povzeta s spletne strani NIJZ (oktober 2023): <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/covid-19/> [8], na kateri se značilnosti covid-19 redno posodablja.

## 2.2 Epidemiologija covida-19 v Sloveniji

### 2.2.1 Kratek povzetek podatkov iz sistemov epidemiološkega spremljanja covida-19 v Sloveniji

Od prvega potrjenega primera okužbe s SARS-CoV-2 v Sloveniji, 4. 3. 2020, do 31. 8. 2023 je bilo v Sloveniji potrjenih 1.344.875 primerov. Do vključno 31. 8. 2023 je umrlo 9.437 oseb, pri katerih je bila okužba s SARS-CoV-2 potrjena v 28 dneh pred smrtjo [11]. Na Sliki 1 sta prikazana dnevno število potrjenih primerov in dnevno število umrlih od pojava prvega potrjenega primera covida-19 v Sloveniji.



\*Število umrlih, pri katerih je bila okužba s SARS-CoV-2 potrjena v 28 dneh pred smrtjo glede na datum smrti med vsemi prebivalci. [5]

Slika 1: Dnevno število potrjenih primerov okužb s SARS-CoV-2 in število umrlih v 28 dneh po diagnozi okužbe s SARS-CoV-2 v Sloveniji v obdobju 4. 3. 2020–31. 8. 2023 [12].

Na dan 26. 11. 2021 je SZO razglasila različico SARS-CoV-2 B.1.1.529 (omikron) kot različico posebnega pomena (angl. variant of concern) zaradi številnih mutacij, ki bi lahko vplivale na prenosljivost in potencialni imunski pobeg [13]. V začetku leta 2022 je različica omikron hitro nadomestila druge različice in postala prevladujoča na globalni ravni. Istočasno je povzročila bliskovit porast števila okuženih oseb, ki je hitro preseгла vse predhodne vrhove. Število okuženih oseb je s pričetkom februarja 2022 pričelo postopoma upadati, vendar je zaradi hitrega mutiranja in pojava novih podlinij različice omikron prišlo do ponovnega porasta števila okuženih oseb najprej aprila in nato še julija 2022.

Pri spremljanju širjenja podlinij različice omikron SARS-CoV-2 je Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (ECDC) med letoma 2022 in 2023 med različice, ki jih podrobneje spremljamo (angl. variants of interest) uvrstil BQ.1 in njene podlinije (hčerinska linija BA.5), BA.2.75 s podlinijami (hčerinska linija BA.2) in XBB (rekombinanta med BJ.1 in BM.1.1.1) ter njena hčerinska linija XBB.1.5, katerih deleži so v posameznih obdobjih naraščali (ECDC, 2023). Podatki spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji kažejo, da smo v zadnjem tednu avgusta 2023 imeli zastopane različice SARS-CoV-2 z mutacijami genoma, ki so značilne za omikron. Zastopane so naslednje mutacije genoma SARS-CoV-2: XBB s podlinijami, BA s podlinijami, BQ.1 s podlinijami in EG.5 s podlinijami. V tem obdobju je ECDC med različice, ki jih podrobneje spremljamo uvrstil tudi različico BA.2.86, katere v vzorcih odpadne vode do konca avgusta 2023 v Sloveniji nismo zaznali.

Cepljenje proti covidu-19 se je v Sloveniji pričelo 27. 12. 2020. Po podatkih, pridobljenih dne 31. 8. 2023 na spletnem mestu »Interaktivni prikaz cepljenja proti covidu-19« je bilo v Sloveniji do konca



avgusta 2023 z vsemi odmerki osnovne sheme (osnovno) cepljenih 68 % prebivalstva, v starosti 18 let in več. Med osebami, stari 60 let in več jih je bilo 80 % osnovno cepljenih, 60 % z enim dodatnim odmerkom in 11 % z dvema dodatnima odmerkoma [14].

Ko je različica omikron v Sloveniji postala prevladujoča, se je pomembno spremenilo razmerje med številom potrjenih primerov okužb s SARS-CoV-2 in številom primerov s hudim potekom covid-19, kar se odražalo pri sprejemih v enote intenzivnega zdravljenja.

V sklopu mreže EuroMOMO (angl. European mortality monitoring) [15] je bilo vzpostavljeno tedensko spremljanje splošne umrljivosti v Sloveniji, v katero so vključeni vsi umrli ne glede na vzrok smrti. Pri tem se ocenjuje odstopanja opazovane umrljivosti od pričakovane, modelirane na podatkih o splošni umrljivosti v letih 2015–2019. V času epidemije covid-19 smo v Sloveniji trikrat pomembno presegli pričakovano število umrlih, prvič ob koncu leta 2020, nato ob koncu leta 2021 (delta) in še v začetku leta 2022 (omikron) (Slika 2).



Slika 2: Tedenska splošna presežna umrljivost v standardnih odklonih (z-vrednost), Slovenija, 2018–2023 [15].

### 2.2.2 Aktualni izzivi pri spremljanju in obvladovanju covid-19 v Sloveniji

Od aprila 2023 je bil nato v Sloveniji covid-19, glede javnozdravstvenih ukrepov za njegovo preprečevanje in obvladovanje, izenačen z ostalimi endemičnimi akutnimi okužbami dihal [7]. SARS-CoV-2 še naprej kroži v populaciji, vendar na nižjih in bolj obvladljivih ravneh, zbolelih s hudimi oblikami covid-19 je manj, obstoječe kapacitete zdravstvenega sistema večinoma niso več preobremenjene. Izenačitev covid-19 z drugimi endemičnimi akutnimi okužbami dihal je vključevala tudi spremembe javnozdravstvenih ukrepov, kot so protokoli testiranja in odprava strogih izolacijskih ukrepov. Zdravstvenim zavodom ni bilo več potrebno zagotavljati vstopne točke za odvzem brisov za ugotavljanje okužbe z virusom SARS-CoV-2. Hkrati je Ministrstvo za zdravje prenehalo z dnevnim zbiranjem podatkov o zasedenosti bolnišničnih postelj zaradi covid-19 na standardnih in intenzivnih oddelkih [16].

S prehodom covid-19 v endemično fazo je bilo potrebno prilagoditi tudi sisteme epidemiološkega spremljanja same bolezni in njenega povzročitelja. Za potrebe učinkovitega odzivanja na področju javnega zdravja je ključno spremljanje trendov kroženja virusa v populaciji, odkrivanje izbruhov in sledenje različicam, ki se pojavljajo v populaciji. Tako imamo trenutno vzpostavljene naslednje sisteme epidemiološkega spremljanja: spremljanje potrjenih primerov okužb s SARS-CoV-2 in smrti v 28 dneh po diagnozi okužbe s SARS-CoV-2 v celotni populaciji; spremljanje resnih akutnih okužb dihal, potrjenih covid-19 v slovenskih bolnišnicah (EPISARI); spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah; spremljanje primerov okužb s SARS-CoV-2 v mreži za spremljanje gripe in ostalih akutnih okužb dihal in spremljanje

---

presežne splošne umrljivosti (EuroMOMO). Vsi ti sistemi spremljanja se med seboj pomembno dopolnjujejo, podatki iz teh sistemov omogočajo pravočasno odkrivanje morebitnega povečanja števila okuženih oseb, težkih potekov bolezni in pojava novih različic, ki bi lahko privedle do spremenjenih epidemioloških razmer. V okviru pripravljenosti na grožnje javnemu zdravju so podatki, zbrani s spremljanjem v odpadnih vodah, izredno pomembni za proaktivne ukrepe, ki prispevajo k učinkovitemu nadzoru in obvladovanju bolezni [17].

Sistem za spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah, ki je bil vzpostavljen v Sloveniji, nam zagotavlja potrebna orodja za spremljanje okužb s SARS-CoV-2 v endemični fazi bolezni v Sloveniji. Ta sistem nam omogoča spremljanje trendov kroženja virusa v populaciji in razumevanje pojavljanja njegovih različic. To je osnova za obveščanje splošne in strokovne javnosti, odločevalcev ter hitro in učinkovito odzivanje [18].

## 2.3 Spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah

### 2.3.1 *Strokovna utemeljenost spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah*

Spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah temelji na naslednjih strokovnih izhodiščih:

- SARS-CoV-2 v blatu izloča 48,1 % okuženih [19];
- zajete so vse okužene osebe s SARS-CoV-2, ki imajo prebivališče na prispevnem območju KČN. To pomeni, da so vključene vse osebe, neodvisno od tega ali imajo izražene bolezenske znake ali ne [20];
- v primerjavi s sistemi spremljanja, ki temeljijo na testiranjih okuženih ali zbolelih oseb, omogoča zgodnejši prikaz sprememb trendov in posledično hitrejše odzivanje [21–23];
- poleg določevanja in kvantifikacije prisotnosti virusa SARS-CoV-2 je možno tudi določevanje sekvenc genoma virusa [24–26]. Ugotovljeno je bilo, da je bila identifikacija genomskih različic virusa v odpadni vodi zaznana že pred potrditvijo sekvence virusa v kliničnem vzorcu osebe s potrjeno okužbo [25];
- poda informacije o prostorskih in časovnih trendih širjenja okužb;
- odpadna voda, ki se steka na KČN, najpogosteje vsebuje komunalne vode iz gospodinjstev in drugih dejavnosti, padavinske vode ter predhodno obdelane industrijske vode. Odpadna voda tako predstavlja izjemno kompleksen sistem mikrobioloških organizmov in kemijskih spojin, katerih vrednosti v odpadni vodi so odvisne od številnih antropoloških in okoljskih dejavnikov. Navedene dejavnike, ki vplivajo na količino odpadne vode in njihovo sestavo, je v fazi analize rezultatov z ustreznimi metodološkimi pristopi mogoče v veliki meri izključiti;
- s finančnega in izvedbenega vidika ta sistem zahteva manj sredstev v primerjavi z množičnim in presejalnim testiranjem posameznikov [23].

### 2.3.2 *Vrednotenje rezultatov spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah*

Rezultati epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah izhajajo iz kvantitativnega določevanja prisotnosti SARS-CoV-2 v odpadni vodi in določanje njegove sekvence/mutacij.

Epidemiološki kazalnik, ki se uporablja za spremljanje trendov SARS-CoV-2 v odpadni vodi je semi-kvantitativne narave, saj nam poda podatke o širjenju virusa v opazovani populaciji, tako imenovanih trendih. Pri tem ne poznamo natančnega števila okuženih oseb s SARS-CoV-2, temveč le ocenjeno vrednost, spremljanje teh vrednosti v času pa nam omogoča ocenjevanje trendov širjenja virusa.

---

### 2.3.3 Spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v evropskih državah

Sisteme epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah imajo vzpostavljene številne države Evrope. V nadaljevanju je povzetek ključnih značilnosti tega spremljanja v nekaterih državah:

- **Nemčija:** v letih 2023 in 2024 krepijo mrežo spremljanja povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadnih vodah (financirano s strani ministrstva, pristojnega za zdravje) [27];
- **Avstrija:** redno spremljanje v celi državi, katerega mrežo so v začetku leta 2023 razširili, s čimer danes pokrivajo 58 % prebivalstva Avstrije [28];
- **Švica:** nadaljuje redno spremljanje v celi državi, vzorce odvzemajo tri do štirikrat tedensko [29];
- **Nizozemska:** večkrat tedensko vzorčijo odpadno vodo na več kot 300 lokacijah v državi, ki pokriva odpadne vode skoraj vsakega nizozemskega gospodinjstva. Z ministrstvom, pristojnim za zdravje, imajo dogovor, da bodo nadaljevali spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih voda vsaj do konca leta 2025 [30]. Vzorčijo tudi vodo iz letališča Schiphol, trenutno 4-krat na teden [31];
- **Irska:** januarja 2023 so zmanjšali število prispevnih območij, a še vedno ohranjajo 70 % pokritost prebivalstva priključenega na javne KČN in široko geografsko zastopanost vseh regij Irske. Pogostost vzorčenja na prispevnih območjih ostaja nespremenjena 2-krat tedensko [32];
- **Belgija:** redno spremljanje na 42 KČN, ki pokriva približno 45 % prebivalstva Belgije. Vzorčenje se izvaja 2-krat tedensko [33,34];
- **Finska:** redno spremljanje na 9 KČN 1-krat tedensko in na 2 KČN 1-krat mesečno, s čemer pokrijejo približno 44 % prebivalstva Finske [35];
- **Švedska:** redno spremljanje, ki pokriva 34 % prebivalstva Švedske [36].

### 3 Načrt epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji

#### 3.1 Namen spremljanja

Namen epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji je spremljanje trendov okuženih oseb s SARS-CoV-2 v populaciji in zastopanost različic SARS-CoV-2 v populaciji.

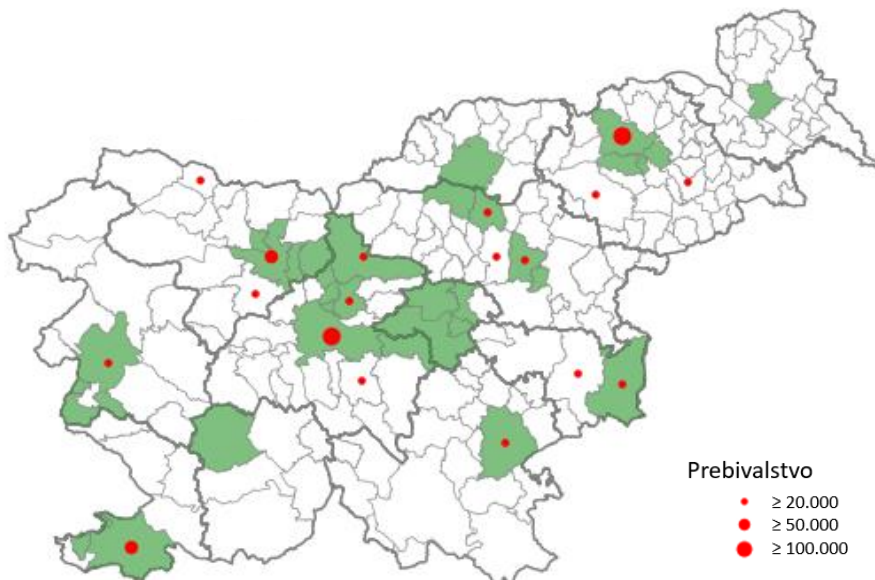
#### 3.2 Frekvenca in lokacije vzorčenja

Spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah je **redno spremljanje**, ki se izvaja **enkrat tedensko**. Vzorčenje se izvaja **vsak ponedeljek** skupaj za vse povzročitelje nalezljivih bolezni, ki jih spremljamo v odpadnih vodah KČN.

Spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah se izvaja na 16 KČN v Sloveniji. Spremljanje se izvaja v vseh 12 statističnih regijah v Republiki Sloveniji. V spremljanje je preko prispevnih območij 16 KČN vključenih 726.612 (34,2 %) prebivalcev Slovenije iz 33 občin (Preglednica 1 in Slika 1).

Preglednica 1: Seznam komunalnih čistilnih naprav v Sloveniji, na katerih se izvaja redno vzorčenje odpadnih vod za spremljanje SARS-CoV-2 po statističnih regijah in pripadajočih občinah.

Statistična regija	Komunalne čistilne naprave	Občine
Osrednjeslovenska	KČN Ljubljana, KČN Domžale-Kamnik	Ljubljana, Kamnik, Domžale, Mengeš, Trzin, Komenda
Gorenjska	KČN Kranj, KČN Domžale-Kamnik	Cerklje na Gorenjskem, Kranj, Naklo, Šenčur
Savinjska	KČN Celje, KČN Šaleške doline	Celje, Štore, Velenje, Šoštanj
Obalno-kraška	KČN Koper	Koper, Izola, Ankaran
Podravska	KČN Maribor	Maribor, Miklavž na Dravskem polju, Duplek, Hoče-Slivnica
Goriška	KČN Nova Gorica	Nova Gorica, Brda, Šempeter-Vrtojba, Miren-Kostanjevica
Zasavska	KČN Trbovlje, KČN Litija in Šmartno pri Litiji, KČN Zagorje	Trbovlje, Litija, Šmartno pri Litiji, Zagorje ob Savi
Primorsko-notranjska	KČN Postojna	Postojna
Jugovzhodna Slovenija	KČN Novo mesto	Novo mesto
Posavska	KČN Brežice	Brežice
Koroška	KČN Slovenj Gradec	Slovenj Gradec
Pomurska	KČN Murska Sobota	Murska Sobota



Legenda: zelena osenčenost – občine vključene v mrežo spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah  
 rdeča pika – velikost populacije v občini (samo občine z  $\geq 20.000$  prebivalci)  
 debelejši rob – meje statističnih regij  
 tanjši rob – meje občin

Slika 3: Geografski prikaz mreže vzorčenja odpadnih vod za sistem spremljanja SARS-CoV-2, pokritost občin in statističnih regij Slovenije.

### 3.3 Vzorčenje in transport vzorcev odpadnih vod

Redno vzorčenje se izvaja po principu 24-urnega združenega vzorca z avtomatskim pretočno sorazmernim vzorčevalnikom. Po predhodni nastavitvi avtomatskega vzorčevalnika se izvede reprezentativno vzorčenje odpadne vode v obdobju 24-ih ur z odvzemom delnih vzorcev v skupnem volumnu 1 L. Ob odvzemu vzorca se pripravi zapis z natančnimi podatki o kraju, času vzorčenja, temperaturi vode in pretoku (vtoku) v KČN. Zapis se izvede na terenskem *Zapisniku o vzorčenju in meritvah na terenu – odpadne vode*. O izvedenem vzorčenju se pripravi *Poročilo o izvedeni nalogi*, ki se ga v elektronski obliki posreduje laboratoriju. Vzorec se v sterilni embalaži prenese v laboratorij z zagotavljanjem hladne verige  $+5\pm 3$  °C in se pri tej temperaturi tudi shrani do pričetka analize. Analize v laboratoriju začnemo najpozneje 48 ur od odvzema vzorca.

### 3.4 Obdelava vzorcev v laboratoriju odpadnih vod

Za vsak vzorec odpadne vode v laboratorijih NLZOH izvedejo kemijske analize za parametre, potrebne za informacijo o stanju vzorca in za pridobitev vrednosti za normalizacijo koncentracije dokazane tarčne virusne nukleinske kisline na enoto populacije (električna prevodnost, pH, neraztopljene snovi, celotni dušik, fosfor, kemijska potreba po kisiku). Podatki o vzorcih se vnesejo v laboratorijski informacijski sistem in do analize shranijo pri  $+4$  °C. Delovne procese vodijo v ločenem laboratoriju obdelave okoljskih vzorcev in ne prihajajo v stik s kliničnimi vzorci pacientov. Za procesiranje vzorcev odpadnih vod uporabljamo interne in procesne kontrole za zagotavljanje uspešnosti izvedbe procesov.

---

### 3.5 Dokaz SARS-CoV-2 v vzorcih odpadnih vod

Mikrobiološka analiza dokazuje in določa količino kopij specifičnega gena SARS-CoV-2 v litru odpadne vode, kar omogoča natančno opredelitev vseh parametrov in s tem celostno interpretacijo rezultatov. Proces mikrobiološke analize vzorcev odpadne vode se prične v roku 24-ih ur po odvzemu. Vzorce do obdelave shranijo pri temperaturi od +4 do +8 °C. V mikrobiološkem laboratoriju vzorce po predhodnem centrifugiranju (odstranitev neraztopljenih snovi), koncentriramo z ultrafiltracijo, iz koncentrata nato osamimo ribonukleinsko kislino (RNK) ter kvantitativno določimo genomske kopije SARS CoV-2 ob uporabi ustreznih standardnih reagentov. Za zagotavljanje kvalitete so v postopek vključene kontrole v vseh fazah procesa.

### 3.6 Natančna karakterizacija genomov SARS-CoV-2

V vseh testiranih vzorcih s sekvenciranjem in bioinformatično obdelavo podatkov izvedemo še določanje mutacij genoma SARS CoV-2 in identificiramo tiste, ki so značilne za posamezne različice. S pomočjo bioinformatičnega orodja Freyja [37], specializiranega za analizo kompleksnih vzorcev, izvedemo meritve frekvence točkovnih mutacij in globino sekvenciranja na vsakem mestu v genomu, kar se nato uporabi za oceno zastopanosti deležev posameznih različic v vzorcih odpadnih vod.

### 3.7 Poročanje rezultatov laboratorijskih preiskav Nacionalnemu inštitutu za javno zdravje

Laboratorij Oddelka za javnozdravstveno mikrobiologijo NLZOH NIJZ-u poroča rezultate laboratorijskih analiz vzorcev odpadnih voda odvzetih na 16 KČN v elektronski in strukturirani obliki v skladu z dogovorjenim naborom podatkov navedenim spodaj.

Frekvenca poročanja rezultatov laboratorijskih analiz preteklega tedna: 1-krat tedensko, ob ponedeljkih, najkasneje do 9:00 ure.

Mesto odlaganja podatkov: Platforma Nextcloud na strežnikih NLZOH, NIJZ do podatkov dostopa kot zunanji uporabnik.

Podatki:

1. Podatki o koncentracijah SARS-CoV-2 in drugih mikrobioloških ter kemijskih parametrih določenih v 24-urnem vzorcu odpadne vode za vsako od 16 KČN:

- protokolna številka;
- datum začetka vzorčenja;
- ime KČN;
- pretok odpadne vode na KČN v času vzorčenja [L/dan];
- koncentracija SARS-CoV-2 gen E [gk/L];
- koncentracija SARS-CoV-2 gen N3 [gk/L];
- koncentracija PMMoV [gk/L];
- temperatura odpadne vode [povp. T/dan];
- koncentracija KPK [mg/L];
- koncentracija Ntot [mg/L];
- koncentracija Ptot [mg/L];
- električna prevodnost;
- pH;
- neraztopljene snovi [mg/L];
- opombe - obvezne v primeru, da ni možno pridobiti katerega koli izmed obveznih podatkov, služi kot pojasnilo.

2. Podatki o deležih mutacij značilnih za različice virusa SARS-CoV-2 določenih v 24-urnem vzorcu odpadne vode po 16 KČN:

Izpisi analiz programa za določitev mutacij Freya:

- protokolna številka/vzorci (*Samples*);
- povzetek (*Summarized*);
- linije (*Lineages*);
- deleži (*Abundances*);
- resid;
- obseg (*Coverage*).

### 3.8 Priprava epidemioloških kazalnikov

Na NIJZ na podlagi posredovanih rezultatov laboratorijskih analiz pripravimo 3 kazalnike:

- virusno breme;
- ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev;
- deleži posameznih različic virusa SARS-CoV-2.

#### 3.8.1 Virusno breme

**Virusno breme** je normalizirana vrednost kopij ribonukleinske kisline SARS-CoV-2 gen N3 v litru odpadne vode na 100.000 populacijskih ekvivalentov.

Normalizirano virusno breme se izračuna z množenjem koncentracije virusa SARS-CoV-2, gen N3 [gk/L] in 24-urnega pretoka odpadne vode na KČN v času vzorčenja [L/dan]. Izračunano vrednost se deli z ocenjenim populacijskim ekvivalentom.

Ocenjen populacijski ekvivalent se izračuna z deljenjem kvantificirane vrednosti kemijske potrebe po kisiku (KPK) v istem vzorcu odpadne vode z opredeljenim ekvivalentom izločanja KPK na prebivalca, 120g/dan/prebivalec [38].

#### 3.8.2 Ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev

**Ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev** prikazuje ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev na dan odvzema vzorca odpadne vode na vtoku KČN. Z namenom lažjega razumevanja kazalnika je normalizirana vrednost virusnega bremena ribonukleinske kisline SARS-CoV-2 prilegana na aktivne primere okužb s SARS-CoV-2, izhajajoč iz podatkov testiranja okuženih in zbolelih za klinične namene.

Ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 na 100.000 prebivalcev je izračunano s pretvorbo normaliziranega virusnega bremena s faktorji prileganja. Faktorji prileganja so bili določeni v pilotnem obdobju vzpostavitve sistema spremljanja z linearno regresijo za vsako KČN posebej. Linearna regresija je bila izbrana kot primarna metoda modeliranja razmerja med normaliziranim virusnim bremenom in aktivnimi potrjenimi primeri okužb ugotovljenih s testiranjem okuženih in zbolelih za klinične namene.

---

Za določitev faktorjev prileganja z metodo modeliranja je bilo potrebno podatke predhodno obdelati, da so ustrezali pogojem linearne regresije. V prvi fazi se je iz modela odstranilo vplivajoče osamelce, vplivne meritve, ki bi pomembno vplivale na model. Meja za določitev vplivnih osamelcev je bila postavljena na Cookovi razdalji, ki je presegala 1 ali  $4/n$ , kjer  $n$  predstavlja število vseh meritev. Za stabilizacijo variance podatkov o virusni obremenitvi in aktivnih primerih se je uporabila logaritemska transformacija.

Metodologija priprave tega kazalnika je povzeta iz sistema epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Avstriji [38].

### 3.8.3 Deleži različic virusa SARS-CoV-2

**Delež različic virusa SARS-CoV-2** prikazuje oceno zastopanosti (v %) posamezne različice virusa SARS-CoV-2 v vzorcu odpadne vode na vtoku KČN, ki temelji na določitvi za posamezno različico značilnih mutacij genoma ribonukleinske kisline SARS-CoV-2.

Analiza podatkov naslednje generacije sekvenciranja vključuje več stopenj. Obdelava odčitkov, shranjenih v fastq datotekah, se najprej izvede s pomočjo EPI2ME Labs wf-artic delovnega procesa (ang. "ARTIC SARS-CoV-2 Workflow"), ki vključuje filtriranje odčitkov, odstranitev začetnih oligonukleotidov, mapiranje odčitkov na referenčni genom SARS-CoV-2, klicanje različic in generiranje konsenzusnega zaporedja. Proces se izvede ločeno za dve vrsti začetnih oligonukleotidov - VarSkip in ARTIC (pripadajoči shemi: NEB-VarSkip/v2b in ARTIC/V4.1). Rezultat procesa so BAM datoteke, specifične za vrsto začetnih oligonukleotidov, ki predstavljajo poravnane odčitke za vsak vzorec. BAM datoteke ločenih oligonukleotidnih shem so v drugem koraku združene v skupno BAM datoteko, s pomočjo orodja samtools. Združena BAM datoteka je nato analizirana z orodjem Freya (s privzetimi nastavitvami), ki kot rezultat izda poročilo o relativni prisotnosti različic v vsakem vzorcu. Linije in različice se določijo na podlagi značilnih mutacij, ki so klasificirane s strani SZO. Aktualne klasifikacije in arhiv preteklih so dostopne na spletni strani: <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>.

## 3.9 Javne objavljave rezultatov epidemiološkega spremljanja

### 3.9.1 Javno objavljanje rezultatov na spletni strani Nacionalnega inštituta za javno zdravje

Rezultati spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah so vsem javnostim dostopni na spletni strani NIJZ na naslednji povezavi: <https://modeliranje.nijz.si/epivode/epivode-c19.html>.

### 3.9.2 Javno objavljanje rezultatov v strojno berljivi obliki

Rezultati spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah so v strojno berljivi obliki dostopni na portalu Odprti podatki Slovenije. Dostopni so naslednji podatki:

- KČN;
- statistična regija Republike Slovenije;
- koncentracija SARS-CoV-2 [GC/I with recovery];
- virusno breme (angl. viral loads);



- 
- ocenjeno število okuženih oseb na 100.000;
  - število aktivnih okužb na 100.000 prebivalcev (klinično testiranje);
  - mutacija značilna za različico;
  - prevalenca različice [%].

Navedeni podatki so v strojno berljivi obliki objavljeni na naslednji povezavi: <https://podatki.gov.si/dataset/epidemiolosko-spremljanje-sars-cov-2-v-odpadni-vodi-slovenija>.

### 3.10 Interpretacija rezultatov epidemiološkega spremljanja

Pri interpretaciji rezultatov spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah je potrebno upoštevati naslednje značilnosti tega sistema epidemiološkega spremljanja:

- Cilj epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah je spremljanje **trendov** kroženja virusa SARS-CoV-2 med prebivalstvom, gre za spremljanje na **populacijski ravni**.
- Ocenjeno število okuženih oseb s SARS-CoV-2 **zajema vse okužene osebe s SARS-CoV-2**, ki so na prispevnem območju posamezne KČN priključene na to KČN. To pomeni, da so vključene vse osebe, neodvisno od tega, ali imajo izražene bolezenske znake, lahko tudi le blago izražene ali pa so brez bolezenskih znakov.
- Krivulja aktivnih primerov iz sistemov epidemiološkega spremljanja, ki temeljijo na testiranju okuženih in zbolelih za klinične namene ima od 4 do 14 dnevni **časovnik zamik** glede na krivuljo ocenjenega števila okuženih oseb s SARS-CoV-2 na podlagi rezultatov spremljanja pojavljanja virusa v odpadnih vodah.
- Odpadna voda, ki se steka v KČN, najpogosteje vsebuje komunalne vode iz gospodinjstev in drugih dejavnosti, padavinske vode ter predhodno obdelane industrijske vode, ki so že obdelane. Odpadna voda tako predstavlja izjemno **kompleksen sistem mikrobioloških organizmov in kemijskih spojin**, katerih vrednosti v odpadni vodi so odvisne od številnih dejavnikov. Navedene dejavnike, ki vplivajo na količino odpadne vode in njihovo sestavo, smo z izbranim metodološkim pristopom izračuna epidemiološkega kazalnika izključili v največji možni meri, ne moremo pa jih popolnoma izničiti.

### 3.11 Redno usklajevanje med Nacionalnim inštitutom za javno zdravje in Nacionalnim laboratorijem za zdravje, okolje in hrano

Strokovni skupini za spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah na NIJZ in NLZOH imata skupen sestanek najmanj enkrat letno oziroma pogosteje, če je za to izkazana potreba.

---

## 4 Reference

- [1] Lu, H.; Stratton, C.W.; Tang, Y.W. Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: The mystery and the miracle. *J Med Virol* **2020**, *92* (4), 401-402, doi:10.1002/jmv.25678.
- [2] World Health Organization. *Novel Coronavirus (2019-nCoV): situation report, 12*. World Health Organization, 2020. Dostopno na: <https://iris.who.int/handle/10665/330777> (26. 10. 2023).
- [3] Evidenca nalezljivih boleznih, NIJZ48. Nacionalni inštitut za javno zdravje. 2023.
- [4] World Health Organization. WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020. 2020. Dostopno na: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020> (26. 10. 2023).
- [5] Odredba o razglasitvi epidemije nalezljive bolezni SARS-CoV-2 (COVID-19) na območju Republike Slovenije. 2020. Uradni list RS, št. 19/20 in 68/20.
- [6] World Health Organization. Statement on the fifteenth meeting of the IHR (2005) Emergency Committee on the COVID-19 pandemic. 2023. Dostopno na: [https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-\(covid-19\)-pandemic](https://www.who.int/news/item/05-05-2023-statement-on-the-fifteenth-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-emergency-committee-regarding-the-coronavirus-disease-(covid-19)-pandemic) (26. 10. 2023).
- [7] Ministrstvo za zdravje. Organizacija dela pri izvajalcih zdravstvene dejavnosti na primarni zdravstveni ravni – poziv, št. 166-22/2022/59 z dne 31.3.2023. 2023.
- [8] Nacionalni inštitut za javno zdravje. Covid-19. 2023. Dostopno na: <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/covid-19/> (26. 10. 2023).
- [9] World Health Organization. *Environmental surveillance for SARS-COV-2 to complement public health surveillance – Interim Guidance*. World Health Organization, 2022. Dostopno na: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HEP-ECH-WSH-2022.1> (9. 10. 2023).
- [10] Galičič, A.; Kranjec, N.; Fafangel, M. *Strokovna izhodišča in predlog vzpostavitve epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji*. Nacionalni inštitut za javno zdravje; 2022: 18.
- [11] Nacionalni inštitut za javno zdravje. Odpadne vode – Epidemiološko spremljanje SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji. 2023. Dostopno na: <https://modeliranje.nijz.si/> (9. 10. 2023).
- [12] Nacionalni inštitut za javno zdravje. Dnevni prikaz števila potrjenih primerov in števila umrlih v Sloveniji do vključno 31. 8. 2023. 2023. Dostopno na: <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/koronavirus/spremljanje-okuzb-s-sars-cov-2-covid-19/> (9. 10. 2023).
- [13] World Health Organization. Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern. 2021. Dostopno na: [https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern) (9. 10. 2023).
- [14] Nacionalni inštitut za javno zdravje. Interaktivni prikaz cepljenja proti covidu-19. 2023. Dostopno na: <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/koronavirus/dnevno-spremljanje-okuzb-s-sars-cov-2-covid-19/> (26. 10. 2023).
- [15] EuroMOMO. EuroMOMO Bulletin. 2023. Dostopno na: <https://www.euromomo.eu/> (6. 9. 2023).
- [16] Ministrstvo za zdravje. Poročanje posteljnih kapacitet; št.: 024-24/2022/175, z dne 28.3.2023. 2023.

- 
- [17] Maryam, S.; Ul Haq, I.; Yahya, G.; Ul Haq, M.; Algammal, A.M.; Saber S.; Cavalu, S. COVID-19 surveillance in wastewater: An epidemiological tool for the monitoring of SARS-CoV-2. *Front Cell Infect Microbiol* **2023**, *12*, 978643, doi:10.3389/fcimb.2022.978643.
- [18] Galičič, A.; Kranjec, N.; Fafangel, M. *Epidemiološko spremljanje povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadnih vodah v Sloveniji v letu 2022*. Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2023. Dostopno na: <https://nijz.si/nalezljive-bolezni/spremljanje-nalezljivih-bolezni/epidemiolosko-spremljanje-povzrociteljev-nalezljivih-bolezni-v-odpadnih-vodah-v-sloveniji/> (26. 10. 2023).
- [19] Foladori, P.; Cutrupi, F.; Segata, N.; Manara, S.; Pinto, F.; Malpei, F.; Bruni, L.; La Rosa G. SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci Total Environ* **2020**, *743*, 140444, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.140444.
- [20] Jones, D.L.; Baluja, M.Q.; Graham, D.W.; Corbishley, A.; McDonald, J.E.; Malham, S.K.; Hillary, L.S.; Connor, T.R.; Gaze, W.H.; Moura, I.B.; et al. Shedding of SARS-CoV-2 in feces and urine and its potential role in person-to-person transmission and the environment-based spread of COVID-19. *Sci Total Environ* **2020**, *749*, 141364, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.141364.
- [21] Medema, G.; Been, F.; Heijnen, L.; Petterson, S. Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Curr Opin Environ Sci Health* **2020**, *17*, 49-71, doi:10.1016/j.coesh.2020.09.006.
- [22] Sims, N.; Kasprzyk-Hordern, B. Future perspectives of wastewater-based epidemiology: Monitoring infectious disease spread and resistance to the community level. *Environ Int* **2020**, *139*, 105689, doi:10.1016/j.envint.2020.105689.
- [23] Daughton, C.G. Wastewater surveillance for population-wide Covid-19: The present and future. *Sci Total Environ* **2020**, *736*, 139631, doi:10.1016/j.scitotenv.2020.139631.
- [24] Agrawal, S.; Orschler, L.; Schubert, S.; Zachmann K.; Heijnen, L.; Tavazzi, S.; Gawlik, B.M.; de Graaf, M.; Medema, G.; Lackner, S. Prevalence and circulation patterns of SARS-CoV-2 variants in European sewage mirror clinical data of 54 European cities. *Water Res* **2022**, *214*, 118162, doi:10.1016/j.watres.2022.118162.
- [25] Crits-Christoph, A.; Kantor, R.S.; Olm, M.R.; Whitney, O.N.; Al-Shayeb, B.; Lou, Y.C.; Flamholz, A.; Kennedy, L.C.; Greenwald, H.; Hinkle, A.; et al. Genome Sequencing of Sewage Detects Regionally Prevalent SARS-CoV-2 Variants. *mBio* **2021**, *12* (1), e02703-20, doi:10.1128/mBio.02703-20.
- [26] Jahn, K.; Dreifuss, D.; Topolsky, I.; Kull, A.; Ganesanandamoorthy, P.; Fernandez-Cassi, X.; Bänziger, C.; Devaux, A.J.; Stachler, E.; Caduff, L.; et al. Early detection and surveillance of SARS-CoV-2 genomic variants in wastewater using COJAC. *Nat Microbiol* **2022**, *7* (8), 1151-1160, doi:10.1038/s41564-022-01185-x.
- [27] Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Nuclear Safety and Consumer Protection. *Background information on SARS-CoV-2 monitoring in wastewater in Germany*. Federal Ministry for the Environment, Nature Conservation, Nuclear Safety and Consumer Protection, 2023. Dostopno na: [https://www.bmu.de/fileadmin/Daten\\_BMU/Download\\_PDF/Binnengewasser/sars\\_co\\_v2\\_monitoring\\_abwasser\\_bf.pdf](https://www.bmu.de/fileadmin/Daten_BMU/Download_PDF/Binnengewasser/sars_co_v2_monitoring_abwasser_bf.pdf) (9. 10. 2023). (V nemščini).
- [28] Federal Ministry for Social Affairs, Health, Care and Consumer Protection. SARS-CoV-2 wastewater monitoring in Austria. 2022. Dostopno na: <https://abwassermonitoring.at/> (9. 10. 2023). (V nemščini).
- [29] Federal Office of Public Health. Viral load in wastewater. 2023. Dostopno na: <https://www.covid19.admin.ch/de/epidemiologic/waste-water> (9. 10. 2023). (V nemščini).

- 
- [30] National Institute for Public Health and the Environment. Coronavirus monitoring in sewage research. 2023. Dostopno na: <https://www.rivm.nl/en/coronavirus-covid-19/research/sewage> (9. 10. 2023).
- [31] National Institute for Public Health and the Environment. Coronavirus particles in sewage water. 2023. Dostopno na: <https://www.rivm.nl/rioolwateronderzoek/covid-19> (9. 10. 2023). (V nizozemščini).
- [32] Health Protection Surveillance Centre. 2023 Wastewater Surveillance Programme Reports. 2023. Dostopno na: <https://www.hpsc.ie/a-z/nationalwastewatersurveillanceprogramme/2023wastewatersurveillanceprogrammereports/> (9. 10. 2023).
- [33] Janssens, R.; Maloux, H.; Hanoteaux, S.; Verhaegen, B.; Van Hoorde, K.; Dierick, K.; Blot, K.; Quoilin, S.; De Ridder, K.; Lesenfants, M. *Methodological appendix to the weekly report "Wastewater-based epidemiological surveillance of SARS-CoV-2"*. Sciensano, 2022. Dostopno na: [https://covid-19.sciensano.be/sites/default/files/Covid19/COVID-19-Weekly\\_wastewater\\_surveillance-Annex\\_methodology.pdf](https://covid-19.sciensano.be/sites/default/files/Covid19/COVID-19-Weekly_wastewater_surveillance-Annex_methodology.pdf) (9. 10. 2023).
- [34] Janssens, R.; Maloux, H.; Hanoteaux, S.; Hutse, V.; Van Poelvoorde, L.; Roosens, N.; Verhaegen, B.; Van Hoorde, K.; Dierick, K.; Blot, K.; Lesenfants, M. *Weekly report – Wastewater-based epidemiological surveillance of the SARS-COV-2 – results of 24/05/2023*. Sciensano, 2023. Dostopno na: [https://covid-19.sciensano.be/sites/default/files/Covid19/COVID-19-Weekly\\_wastewater\\_surveillance.pdf](https://covid-19.sciensano.be/sites/default/files/Covid19/COVID-19-Weekly_wastewater_surveillance.pdf) (9. 10. 2023).
- [35] Finnish Institute for Health and Welfare. Coronavirus wastewater monitoring. 2023. Dostopno na: <https://thl.fi/en/web/infectious-diseases-and-vaccinations/surveillance-and-registers/wastewater-monitoring/coronavirus-wastewater-monitoring> (9. 10. 2023).
- [36] Swedish Pathogens Portal. Wastewater-based epidemiology in Sweden. 2023. Dostopno na: <https://www.covid19dataportal.se/dashboards/wastewater/#map-of-sample-collection-sites> (9. 10. 2023).
- [37] Karthikeyan, S.; Levy, J.I.; De Hoff P.; Humphrey G.; Birmingham A.; Jepsen K.; Farmer, S.; Tubb, M.H.; Valles, T.; Tribelhorn, E.C.; et al. Wastewater sequencing reveals early cryptic SARS-CoV-2 variant transmission. *Nature* **2022**, 609, 101-108, doi:<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05049-6>.
- [38] Daleiden, B.; Niederstätter, H.; Steinlechner, M.; Wildt, S.; Kaiser, M.; Lass-Flörl, C.; Posch, W.; Fuchs, S.; Pfeifer, B.; Huber, A.; et al. Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in Austria: development, implementation, and operation of the Tyrolean wastewater monitoring program. *J Water Health* **2022**, 20 (2), 314-328, doi:[10.2166/wh.2022.218](https://doi.org/10.2166/wh.2022.218).