

PREDLOG NAČRTA EPIDEMIOLOŠKEGA SPREMLJANJA PROTI KARBAPENEMOM ODPORNIH BAKTERIJ V ODPADNI VODI V SLOVENIJI

NIJZ Nacionalni inštitut za javno zdravje

NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO

Univerza v Ljubljani | Medicinska fakulteta
INŠTITUT ZA MIKROBIOLOGIJO IN IMUNOLOGIJO

Predlog načrta epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji

Avtorji (po abecednem redu)

Nacionalni inštitut za javno zdravje

Eva Drobnič, mag. san. inž.
doc. dr. An Galičič, mag. san. inž.
Natalija Kranjec, dipl. san. inž. (UN)
Anja Mikuž, mag. san. inž.
Matija Mozetič, dr. med., spec. javnega zdravja
Jan Rožanec, mag. san. inž.
prim. Zoran Simonović, dr. med., spec. javnega zdravja
prim. dr. Alenka Trop Skaza, dr. med., spec. epidemiologije
dr. Veronika Učakar, dr. med., spec. javnega zdravja

Nacionalni laboratorij za okolje, zdravje in hrano

dr. Tjaša Cerar Kišek, univ. dipl. mikr.
Danijela Fras, univ. dipl. ing. kem. tehnolog.
Tea Janko, mag. bioinf.
Tom Koritnik, prof. biol.
dr. Boštjan Križanec, univ. dipl. ing. kem. tehnolog.
Arnela Kuzma, univ. dipl. ing. kem. tehnolog.
Verica Mioč, univ. dipl. mikr.
prim. Helena Ribič, dr. med., spec. klinične mikrobiologije
doc. dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikr.
Maša Škrobar Klonfar, univ. dipl. ing. kem. tehnolog.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

izr. prof. dr. Mateja Pirš, dr. med., spec. klinične mikrobiologije
asist. dr. Katja Strašek Smrdel, univ. dipl. mikr.
dr. Nataša Švent Kučina, spec. klinične mikrobiologije

Oblikovanje naslovnice | Tadeja Horvat

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

Kraj in leto izdaje | Ljubljana, 2026

Elektronska izdaja

Spletni naslov | www.nijz.si

Besedilo ni lektorirano.

Zaščita dokumenta | © 2026 NIJZ
Vse pravice pridržane. Reprodukcija po delih ali v celoti na kakršenkoli način in v kateremkoli mediju je dovoljena le z navedbo vira.

Dokument je nastal v okviru Ciljnega raziskovalnega projekta Pilotno epidemiološko spremljanje na karbapeneme odpornih bakterij v odpadni vodi (V3-24040), katerega izvedbo sta sofinancirala Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije in Javna agencija za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije.

Kazalo vsebine

1. **Uvod** ... 1

2. **Strokovna izhodišča za vzpostavitev epidemiološkega spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi** ... 3

2.1 Mikrobna odpornost in bakterije, odporne proti karbapenemom ... 3

2.2 Mikrobna odpornost in bakterije, odporne proti karbapenemom v Sloveniji ... 3

2.3 Spremljanje odpornosti bakterij proti antibiotikom v odpadni vodi ... 4

3. **Načrt spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi** ... 5

3.1 Namen in cilji spremljanja ... 5

3.2 Kazalniki spremljanja in ciljni mikroorganizmi/bakterije, geni - determinante odpornosti ... 5

3.3 Lokacija in frekvenca vzorčenja ... 5

3.4 Vzorčenje in transport vzorcev ... 6

3.5 Mikrobiološke laboratorijske preiskave za določanje proti karbapenemom odpornih bakterij v vzorcih odpadne vode ... 7

3.6 Kemijske laboratorijske preiskave za določanje ostankov antibiotikov v vzorcih odpadne vode ... 7

3.7 Poročanje rezultatov laboratorijskih preiskav Nacionalnemu inštitutu za javno zdravje ... 7

4. **Upravljanje in analiza podatkov** ... 8

4.1 Zbiranje in upravljanje podatkov ... 8

4.2 Preverjanje kakovosti podatkov ... 8

4.3 Analiza podatkov ... 8

4.4 Interpretacija rezultatov spremljanja ... 8

4.5 Javno objavljanje rezultatov ... 9

5. **Omejitve** ... 10

6. **Reference** ... 11

Kazalo preglednic

Tabela 1: Seznam komunalnih čistilnih naprav, vključenih v redno spremljanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze, v odpadni vodi v Sloveniji. 6

Kazalo slik

Slika 1: Prostorski prikaz občin, vključenih v spremljanje enterobakterij, ki so odporne proti karbapenemom in izločajo karbapenemaze, v odpadni vodi v Sloveniji (lasten vir). 6

Uporabljene kratice

AMR	odpornost mikrobov proti protimikrobnim zdravilom (angl. Antimicrobial Resistance)
EARS-Net	Mednarodna mreža nacionalnih sistemov spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom v Evropi (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network)
CČN	centralna čistilna naprava
CPE	enterobakterije, ki izločajo karbapenemaze (angl. Carbapenemase-Producing Enterobacterales)
CRE	enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom (angl. Carbapenem-Resistant Enterobacterales)
CRE-CPE	enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom in izločajo karbapenemaze (angl. Carbapenem-Resistant Enterobacterales that Produce Carbapenemases)
CRP	ciljni raziskovalni projekt
dPCR	digitalna verižna reakcija s polimerazo (angl. digital Polymerase Chain Reaction)
ECDC	Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
ESBL	betalaktamaze razširjenega spektra (angl. Extended-Spectrum Beta-Lactamases)
EU-WISH	Wastewater Integrated Surveillance for Public Health in Europe
IMI	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
KČN	komunalna čistilna naprava
NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje
NLZOH	Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PE	populacijski ekvivalent
rRNK	ribosomska ribonukleinska kislina
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki (angl. Vancomycin-Resistant Enterococci)

Povzetek

Spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi predstavlja pomemben dopolnilni pristop k obstoječim sistemom spremljanja v humani medicini, saj omogoča pridobivanje informacij o pojavljanju odpornih bakterij in genov za odpornost na ravni populacije. V okviru ciljnega raziskovalnega projekta Pilotno epidemiološko spremljanje na karbapeneme odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji (V3-24040) smo pripravili predlog načrta epidemiološkega spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi v Sloveniji. Načrt temelji na strokovnih izhodiščih, izkušnjah pilotnega spremljanja ter priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije in Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni.

Namen predlaganega spremljanja je vzpostaviti dopolnilni sistem spremljanja mikrobne odpornosti na ravni populacije, ki bo omogočal prepoznavanje geografskih in časovnih trendov ter podpiral javnozdravstveno ukrepanje v okviru pristopa »Eno zdravje«. Spremljanje je predvideno enkrat mesečno na treh komunalnih čistilnih napravah v Sloveniji: Centralna čistilna naprava (CČN) Ljubljana, CČN Maribor in CČN Domžale-Kamnik.

Načrt vključuje odvzem 24-urnih sestavljenih vzorcev neobdelane odpadne vode ter uporabo kultivacijskih, fenotipskih in molekularnih metod za spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom in genov za karbapenemaze. Predvideno je določanje izbranih genov za odpornost v bakterijskih izolatih ter njihovo neposredno količinsko določanje v odpadni vodi, vključno z normalizacijo glede na gen za bakterijsko 16S rRNK. Načrt opredeljuje tudi postopke poročanja, zbiranja, preverjanja kakovosti, analize in interpretacije podatkov ter javnega objavljanja rezultatov.

Predlagani sistem predstavlja strokovno podlago za vzpostavitev rednega epidemiološkega spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi v Sloveniji. Pridobljeni podatki bodo lahko dopolnjevali obstoječe sisteme spremljanja v humani medicini ter prispevali k boljšemu razumevanju pojavljanja in širjenja mikrobne odpornosti v populaciji.

Summary

Wastewater-based surveillance of antimicrobial resistance provides an important complementary approach to existing surveillance systems in human healthcare by offering population-level information on the occurrence of resistant bacteria and antimicrobial resistance genes. As part of the targeted research project Pilot Epidemiological Surveillance of Carbapenem-Resistant Bacteria in Wastewater in Slovenia (V3-24040), a proposed plan for epidemiological surveillance of antimicrobial resistance in wastewater in Slovenia was developed. The plan is based on scientific evidence, experience gained from pilot surveillance, and recommendations from the World Health Organization and the European Centre for Disease Prevention and Control.

The aim of the proposed surveillance system is to complement existing clinical surveillance by providing population-level information on antimicrobial resistance, enabling the identification of geographical and temporal trends, and supporting public health action within the One Health framework. Monthly surveillance is planned at three municipal wastewater treatment plants in Slovenia: Ljubljana, Maribor, and Domžale-Kamnik.

The proposed plan includes the collection of 24-hour composite samples of untreated wastewater and the application of culture-based, phenotypic, and molecular methods to monitor carbapenem-resistant bacteria and carbapenemase-encoding genes. Selected resistance genes will be investigated in bacterial isolates and quantified directly in wastewater, including normalisation to the bacterial 16S rRNA gene. The plan also defines procedures for reporting, collecting, validating, analysing, and interpreting surveillance data, as well as for publicly disseminating the results.

The proposed surveillance system provides a scientific and methodological basis for establishing routine epidemiological surveillance of antimicrobial resistance in wastewater in Slovenia. The resulting data could complement existing clinical surveillance systems and contribute to a better understanding of the occurrence and spread of antimicrobial resistance at the population level.

1. Uvod

Odpornost mikrobov proti protimikrobnim zdravilom (AMR) predstavlja eno največjih groženj javnemu zdravju. Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) jo uvršča med deset največjih groženj globalnemu zdravju [1], za okužbe, ki jih povzročajo odporni mikrobi, nimamo ustreznega antibiotičnega zdravljenja. Sistematično spremljanje bakterijske odpornosti je po usmeritvah SZO in Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) ključno za zagotavljanje varnosti pacientov, saj je podlaga za smernice za protimikrobno zdravljenje, preprečuje neuspehe zdravljenja ter omogoča spremljanje neposrednega bremena okužb in smrtnosti v zdravstvenih ustanovah. V Sloveniji je ta osrednji in najpomembnejši steber epidemiološkega spremljanja že uspešno vzpostavljen na podlagi spremljanja odpornosti invazivnih bakterij v mreži EARS-Net (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network). Odpadna voda se je izkazala kot pomemben dopolnilen in izrazito komplementaren vir za spremljanje odpornosti mikrobov, saj vsebuje širok spekter mikroorganizmov iz človeške populacije. Ta neinvazivna metoda omogoča vpogled v pojavnost odpornih mikrobov v splošni populaciji ter omogoča zgodnje prepoznavanje novih sevov odpornih mikrobov, ki se lahko širijo med ljudmi [2].

SZO in Priporočilo Sveta o krepitvi ukrepov Evropske unije v boju proti odpornosti mikrobov v okviru pristopa »Eno zdravje« (2023/C 220/01) poudarjata potrebo po interdisciplinarni obravnavi tega področja in njegovi uvrstitvi med prednostne naloge držav članic. Interdisciplinarni pristop vključuje spremljanje treh ključnih področij: ljudi (klinični vzorci), živali (kmetijstvo/prehranska veriga) in okolja (odpadne in površinske vode).

Nekatere pilotne študije so pokazale neposredno povezavo med odpornostjo izolatov izoliranih pri ljudeh in odpornostjo izolatov iz odpadne vode. Epidemiološko spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi je tehnično in operativno izvedljivo in lahko na uporaben in sprejemljiv način dopolniobstoječe sisteme spremljanja [3]. V okviru evropskega povezovalnega projekta Wastewater Integrated Surveillance for Public Health in Europe (EU-WISH), v katerem aktivno sodeluje tudi Slovenija, je bila med državami članicami izvedena obsežna raziskava o trenutnem stanju spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi. Analiza je pokazala, da ima 11 od 27 evropskih držav že vzpostavljen delujoč sistem, bodisi v obliki pilotnih projektov bodisi kot institucionalizirane javnozdravstvene pobude. Večina teh držav (8 od 11) sistem primarno uporablja za prepoznavanje širših populacijskih trendov odpornosti, v okviru katerih ugotavljajo prisotnost bakterij iz reda Enterobacterales, ki izločajo beta-laktamaze razširjenega spektra (angl. Extended-Spectrum Beta-Lactamases, ESBL) in karbapenemaze (angl. Carbapenemase-Producing Enterobacterales, CPE), proti vankomicinu odporne enterokoke (angl. Vancomycin-Resistant Enterococci, VRE) in nekaterih genov, ki kodirajo encime ESBL (kot je *bla*CTX-M) ali karbapenemaze (kot sta *bla*NDM, *bla*OXA-48) [4].

Med ključne dejavnike, ki vplivajo na pojavljanje bakterij, odpornih proti antibiotikom, sodijo pretirana oziroma nepravilna uporaba antibiotikov, uporaba antibiotikov v veterini in kmetijstvu ter pomanjkanje učinkovitih nacionalnih politik in sistemov spremljanja bakterijske odpornosti [5]. Karbapenemi so širokospektralni betalaktamski antibiotiki, ki imajo pomembno vlogo pri zdravljenju bolnišničnih okužb, vključno okužb z večkratno po Gramu negativnimi bakterijami [6]. Pojav rezistence proti tem antibiotikom ima zelo resne posledice za javno zdravje. Zato smo se v našem ciljnem raziskovalnem projektu (CRP) Pilotno epidemiološko spremljanje na karbapeneme odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji (V3-24040) osredotočili na to področje mikrobne odpornosti [7].

Spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, in genov za karbapenemaze v odpadni vodi je smiselno dopolniti s kemijskimi analizami ostankov teh antibiotikov, saj mikrobiološko spremljanje ne zagotavlja podatkov o njihovi dejanski prisotnosti in koncentracijah. Kemijske analize omogočajo

določanje koncentracij karbapenemov v odpadni vodi ter ob ustreznem vzorčenju v različnih fazah čiščenja tudi spremljanje njihovega vnosa in odstranjevanja na komunalni čistilni napravi (KČN). Povezovanje kemijskih in mikrobioloških podatkov lahko prispeva k boljšemu razumevanju potencialnega vpliva ostankov antibiotikov na selekcijo in širjenje mikrobne odpornosti ter omogoča celovitejšo oceno njihovega pomena z vidika javnega zdravja in varovanja okolja.

Pričujoči Načrt epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji je nastal v okviru tega CRP [7]. Načrt je bil oblikovan na podlagi strokovnih podlag [8] in izkušenj pilotnega spremljanja bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi [9]. Upoštevana so bila tudi priporočila SZO [3] in ECDC [10]. Rezultati in vzpostavljeni laboratorijski protokoli so lahko neposredno uporabni za izpolnjevanje zahtev Direktive (EU) 2024/3019 Evropskega parlamenta in Sveta o čiščenju komunalnih odpadnih voda, ki državam članicam od leta 2030 nalaga obvezno spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi večjih aglomeracij (> 100.000 populacijskih ekvivalentov (PE)). Pridobljeno znanje bi lahko služilo kot pomembna strokovna podlaga za prenos te evropske zakonodaje v nacionalni okvir [11].

Skladno z Direktivo (EU) 2024/3019 Evropskega parlamenta in Sveta o čiščenju komunalne odpadne vode [11] bo sprejet izvedbeni akt o spremljanju mikrobne odpornosti v odpadni vodi. Po sprejetju izvedbenega akta bo potrebna njegova implementacija v Načrt epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji.

Poleg zakonskih obveznosti Direktive (EU) 2024/3019 Evropskega parlamenta in Sveta o čiščenju komunalne odpadne vode [11] tudi nov predlog Državne strategije »eno zdravje« za obvladovanje odpornosti mikrobov (2026-2030) med ključnimi izzivi navaja »Vzpostavitev nacionalnega sistema spremljanja AMR v odpadni vodi«. Pričujoči Načrt epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji tako predstavlja potrebne podlage za realizacijo navedenega ključnega izziva Državne strategije »Eno zdravje« za obvladovanje odpornosti mikrobov (2026-2030).

Načrt je nastal v sodelovanju strokovnjakov Nacionalnega inštituta za javno zdravje (NIJZ), Nacionalnega laboratorija za zdravje, okolje in hrano (NLZOH) ter Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo (IMI) Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

2. Strokovna izhodišča za vzpostavitev epidemiološkega spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi

2.1 Mikrobna odpornost in bakterije, odporne proti karbapenemom

Naraščajoča odpornost bakterij proti antibiotikom zmanjšuje razpoložljivost protimikrobnih zdravil za zdravljenje in predstavlja pomemben izziv za zdravstvene sisteme po svetu. Uporaba pristopa »Eno zdravje« lahko prispeva k zmanjšanju pojavljanja in širjenja odpornih bakterij, omeji s tem povezane ekonomske posledice ter služi kot podlaga za smernice za odgovorno in smotrno rabo antibiotikov. Spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi se vse bolj uveljavlja kot pomembno orodje za ocenjevanje razširjenosti odpornih bakterij v populaciji, saj odpadna voda združuje mikroorganizme iz bolnišnic, skupnosti in drugih virov ter omogoča spremljanje njihovega pojavljanja in širjenja v populaciji [2].

Enterobakterije so velika skupina po Gramu negativnih bakterij, ki so del normalne črevesne mikrobiote živali, vključno z ljudmi in jih običajno najdemo v iztrebkih. Hkrati spadajo med najpomembnejše človeške bakterijske patogene, zato pojav in širirenje odpornosti proti določem antibiotikom sodi med resne javnozdravstvene probleme [12]. SZO v skupino kritičnih patogenov uvršča enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom (angl. Carbapenem-Resistant Enterobacterales, CRE) [12]. Karbapenemi so betalaktamski antibiotiki z najširšim spektrom delovanja in ena izmed ključnih skupin antibiotikov, ki se uporabljajo za zdravljenje bolnišničnih okužb, vključno z okužbami z nekaterimi večkratno odpornimi po Gramu negativnimi bakterijami. Pojav rezistence proti tem antibiotikom ima zelo resne posledice za javno zdravje. Zmanjšana občutljivost za karbapenem oziroma odpornost proti karbapenemom so lahko posledica 1) kombiniranih mehanizmov odpornosti, običajno ESBL ali cefalosporinaz (ampC) v kombinaciji z izgubo porinov v zunanji membrani ali pa 2) produkcije karbapenemaz, ki razgrajujejo te antibiotike in jih inaktivirajo ali hidrolizirajo, dodatno k odpornosti lahko prispevajo izlivne črpalke [13]. Pri klinično pomembnih po Gramu negativnih bakterijah, kot so *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter cloacae*, je epidemiološko najpomembnejša oblika odpornosti proti karbapenemom posledica izločanja karbapenemaz [13]. Pri enterobakterijah z zmanjšano občutljivostjo za karbapeneme ločimo CRE ter CPE, ki so lahko za karbapeneme še občutljive, ali pa so proti karbapenemom že odporne in izločajo karbapenemaze (angl. Carbapenem-Resistant Enterobacterales that Produce Carbapenemases, CRE-CPE) [14].

2.2 Mikrobna odpornost in bakterije, odporne proti karbapenemom v Sloveniji

V Sloveniji se je sistematično laboratorijsko spremljanje CRE v vzorcih bolnikov začelo v drugi polovici leta 2010. Do konca leta 2014 so bili odkriti le sporadični primeri CRE (do 10 bolnikov na leto), izolirani predvsem iz vzorcev nadzornih kužnin. Jeseni leta 2014 je prišlo do prvega izbruha *K. pneumoniae*, ki je izločala karbapenemazo OXA-48 in/ali NDM. V obdobju 2014-2017 je bilo skupaj opredeljenih 91 bolnikov s *K. pneumoniae*, od tega jih je bila skoraj polovica del prvega izbruha v slovenskih bolnišnicah, ki se je začel leta 2014 in je trajal do februarja 2016 [15]. V preiskavi tega izbruha so analizirali različne klonske skupine *K. pneumoniae*, ki izločajo karbapenemaze v Sloveniji. Pri delu izolatov so odkrili skoraj identičen plazmid, kar kaže na plazmidni prenos gena bla_{OXA-48} in poudarja pomen celotnega sekvenciranja genoma pri odkrivanju in obvladovanju izbruhov v bolnišnicah ter nakazuje potrebo po boljšem spremljanju klonov bakterij z genetskimi determinantami odpornosti [16]. V Sloveniji je bila izvedena tudi nacionalna genomska študija enterobakterij vrste *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, z izolati iz leta 2023 [17]. Nacionalna genomska študija 108 izolatov *E. coli*, ki izločajo karbapenemaze, pridobljenih pri bolnikih v Sloveniji leta 2023, je pokazala veliko genetsko raznolikost in prevlado

karbapenemaz skupine OXA-48-like (70,4 %). Ugotovitve so poleg klonskega širjenja pokazale pomembno vlogo plazmidnega prenosa genov za karbapenemaze ter poudarile pomen genomskega spremljanja za razumevanje širjenja odpornosti [17].

V Sloveniji aktivno sodelujemo v okviru mreže EARS-Net, kjer zbiramo podatke o povzročiteljih invazivnih bakterijskih okužb pri bolnikih v slovenskih bolnišnicah in njihovi odpornosti proti antibiotikom [18]. Na podlagi analiziranih podatkov za obdobje 2019-2023 so bile v Sloveniji zabeležene pomembne spremembe v incidenci okužb krvi z bakterijami, odpornimi proti ključnim skupinam antibiotikov. Skupno gledano podatki za Slovenijo opozarjajo na nujnost okrepljenega nadzora nad širjenjem bakterij z večkratno odpornostjo, hkrati pa tudi izvajanje ukrepov za zmanjševanje njihovega širjenja [18].

2.3 Spremljanje odpornosti bakterij proti antibiotikom v odpadni vodi

SZO in Priporočilo Sveta o krepitvi ukrepov Evropske unije v boju proti odpornosti mikrobov v okviru pristopa »Eno zdravje« (2023/C 220/01) poudarjata, da je potrebno mikrobno odpornost obravnavati z interdisciplinarnim pristopom. Zelo pomembno je tudi spremljanje mikrobne odpornosti v komunalni odpadni vodi saj vsebuje izločke in odpadne produkte, ki izvirajo iz celotne populacije določenega območja [19]. Odpadna voda je tudi ena od glavnih poti, po kateri protimikrobna sredstva in odporni mikroorganizmi preidejo v okolje. [20].

Med prednosti spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi sodijo možnost zgodnjega zaznavanja širjenja odpornih sevov, neinvazivnost vzorčenja in stroškovno učinkovit način spremljanja ter varovanje zasebnosti posameznikov, saj spremljanje temelji na analizi zbirnih populacijskih vzorcev in ne na podatkih posameznih oseb. Poleg tega lahko posamezen vzorec zagotovi informacije o širši populaciji prispevnega območja [3,21]. Pri interpretaciji rezultatov pa moramo upoštevati tudi omejitve takšnega spremljanja, kot so odsotnost kliničnega konteksta in vpliv okoljskih dejavnikov ter zahtevnost laboratorijskih analiz [21,22].

V podporo ciljem projekta Pilotno epidemiološko spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi v Sloveniji smo izvedli analizo sistematičnega pregleda literature, ki omogoča vpogled v obstoječe metodološke pristope spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom v odpadni vodi v različnih državah. Strokovna izhodišča skupaj z analizo sistematičnega pregleda literature so dostopna v dokumentu Strokovne podlage za vzpostavitev epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji [8].

V skladu s priporočili ECDC naj bi nacionalna strategija spremljanja mikrobne odpornosti združevala oba pristopa. Spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi omogoča spremljanje geografskih in časovnih trendov na ravni populacije, medtem ko spremljanje odpornosti bakterij iz kliničnih in nadzornih kužnin v humani medicini zagotavlja podatke o, ki so ključni za zdravljenje ter preprečevanje in obvladovanje okužb v zdravstvenih ustanovah [10].

3. Načrt spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi

3.1 Namen in cilji spremljanja

Namen spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi je zagotavljanje komplementarnosti oziroma dopolnjevanja sistema spremljanja odpornosti bakterij iz kliničnih in nadzornih kužnin v humani medicini. Takšen pristop predstavlja enega ključnih stebrov pristopa »Eno zdravje« (One Health), ki tesno povezuje zdravje ljudi, živali in okolja. Pridobljeni podatki tako služijo kot neposredna podpora pri ukrepanju v javnem zdravju oziroma javnozdravstvenemu odzivanju na pojav in širjenje odpornih mikrobov v populaciji.

Cilj tega sistema spremljanja je stalno in sistematično spremljanje geografskih in časovnih trendov mikrobne odpornosti v odpadni vodi v Sloveniji. V prihodnje bi ta nadgrajeni sistem spremljanja lahko omogočal tudi zgodnje opozarjanje in zaznavanje novih groženj, povezanih z mikrobno odpornostjo.

3.2 Kazalniki spremljanja in ciljni mikroorganizmi/bakterije, geni - determinante odpornosti

Za program spremljanja CPE v odpadni vodi predlagamo določanje naslednjih parametrov:

- spremljanje koncentracije CPE (CFU/mL);
- spremljanje prisotnosti petih genov za karbapenemaze*: bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{KPC}, bla_{IMP}, bla_{VIM} (gc (genomske kopije) / µL). Določajo se tudi normalizirane vrednosti kot razmerje med številom kopij ciljne tarče in številom kopij gena za 16S rRNK;
- kot fekalni indikator se spremlja še koncentracija *Escherichia coli* in koncentracija *E. coli* (ESBL), kot dodatni kazalnik odpornosti, izraženi v CFU/mL;
- izbrani antibiotiki v vzorcih odpadne vode – kemijske analize.

*nabor genov se sproti preverja in prilagaja glede na pojavljanje specifičnih izolatov in genetskih markerjev odpornosti, ki so epidemiološko pomembni v humani medicini.

Predlagani nabor parametrov predstavlja začetni strokovni okvir, ki se lahko spreminja in prilagaja. Posodobitve se izvajajo glede na nove strokovne usmeritve mednarodnih organizacij (kot sta SZO in–ECDC), zahteve evropske in nacionalne zakonodaje, aktualno epidemiološko situacijo v državi ter usmeritve ključnih javnozdravstvenih deležnikov v Sloveniji, pristojnih za področje mikrobne odpornosti.

3.3 Lokacija in frekvenca vzorčenja

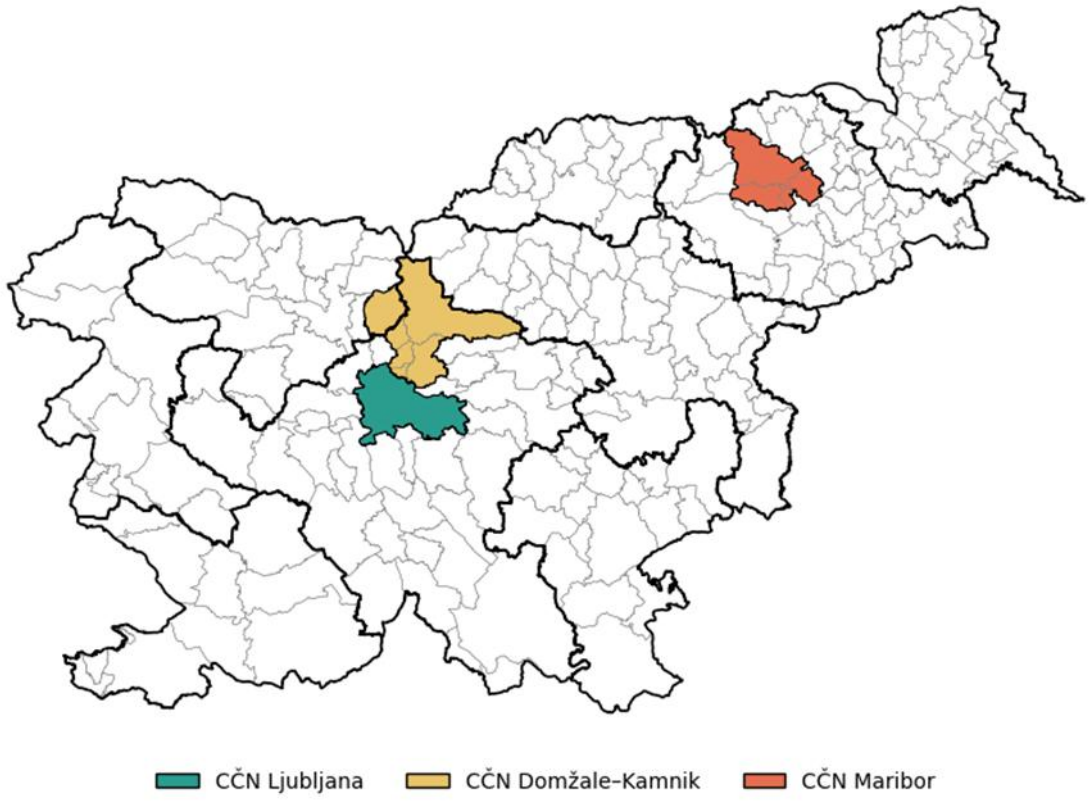
Spremljanje CPE v odpadni vodi se izvaja **1-krat mesečno**: **vsak prvi ponedeljek v mesecu**.

Vzorčenje se izvaja na 3 KČN v Sloveniji: CČN Ljubljana, CČN Maribor in CČN Domžale-Kamnik. V navedene KČN se stekajo odpadne vode 598.394 (28,2 %) prebivalcev Slovenije iz 11 občin. Natančnejši podatki so predstavljeni v Preglednici 1 in Sliki 1. Izbor KČN je skladen z določbo Direktive (EU) 2024/3019 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 27. novembra 2024 o čiščenju komunalne odpadne vode, ki predvideva vzpostavitev spremljanja AMR v odpadni vodi na KČN v aglomeraciji > 100.000 PE.

Tabela 1: Seznam komunalnih čistilnih naprav, vključenih v redno spremljanje enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze, v odpadni vodi v Sloveniji.

Komunalna čistilna naprava	Občine prispevnega območja KČN	Zdravstvena regija	Število oseb, priključenih na KČN	Populacijski ekvivalent KČN [23]
CČN Ljubljana	Ljubljana	Ljubljana	225.544	555.000 PE
CČN Maribor	Maribor, Miklavž na Dravskem polju, Duplek, Hoče-Slivnica	Maribor	110.740	190.000 PE
CČN Domžale-Kamnik	Kamnik, Domžale, Mengeš, Trzin, Komenda, Cerklje na Gorenjskem	Ljubljana, Kranj	80.144	149.000 PE

Legenda: CČN – Centralna čistilna naparava; KČN – komunalna čistilna naparava.



Slika 1: Prostorski prikaz občin, vključenih v spremljanje enterobakterij, ki so odporne proti karbapenemom in izločajo karbapenemaze, v odpadni vodi v Sloveniji (lasten vir).

3.4 Vzorčenje in transport vzorcev

Vzorce odvzamemo z avtomatskim vzorčevalnikom, ki je uravnan glede na pretok za zagotovitev 24-urnega sorazmernega sestavljenega vzorca neobdelane odpadne vode na vtoku v KČN. Za spremljanje CRE-CPE v odpadni vodi odvzamemo po 1 L celokupnega sestavljenega vzorca za mikrobiološke analize in 1L celokupnega sestavljenega vzorca za kemijske analize. Uporabimo sterilno embalažo in temni steklenici z navojem. Vzorce v sterilni embalaži prenesemo v laboratorij ob zagotavljanju hladne verige pri temperaturi 5±3 °C ter jih do začetka analize hranimo pri isti temperaturi. Za posamezno vzorčenje beležimo skupni dotok v času vzorčenja, padavine v 24-urnem obdobju vzorčenja in kumulativne padavine v istem obdobju ter dodatno v 48 urah pred začetkom vzorčenja (skupaj 72 ur).

3.5 Mikrobiološke laboratorijske preiskave za določanje proti karbapenemom odpornih bakterij v vzorcih odpadne vode

Za kultivacijo ciljnih bakterij iz vzorcev odpadne vode uporabljamo selektivna kromogena gojišča. Izbrane izolate identificiramo z metodo MALDI TOF (Masna spektrometrija z ionizacijo v matriksu z lasersko desorpcijo – čas preleta ionov (angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight) in določimo občutljivost za antibiotike skladno z EUCAST. Pri izolatih z zmanjšano občutljivostjo za karbapeneme se uporabijo tudi fenotipske metode za ugotavljanje prisotnosti karbapenemaz [14]. Izbor izolatov upošteva presejalna merila za možno prisotnost karbapenemaz, ustrezna posamezni bakterijski skupini, in cilje spremljanja. Pri enterobakterijah izbor ni omejen samo na izolate, razvrščene v kategorijo R.

Pri izbranih izolatih z metodo verižne reakcije s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR) določamo gene za karbapenemaze (npr. bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP} in bla_{OXA-48}. Po potrebi se ločeno evidentirajo fenotipska odpornost proti karbapenemom, dokaz genov, ki kodirajo karbapenemaze, in rezultati fenotipskih potrditvenih preiskav.

Zgoraj navedene preiskave se dopolnjujejo z neposrednim dokazovanjem in količinskim določanjem izbranih genov v odpadni vodi. Po pripravi vzorca in osamitvi nukleinskih kislin se njihove koncentracije določijo z digitalnim PCR (dPCR) ter izrazijo kot število kopij na mikroliter eluata, ob upoštevanju uporabljenih redčitev. Za normalizacijo se določa tudi število kopij gena za 16S rRNK, rezultati pa se dodatno izrazijo kot razmerje med številom kopij ciljne tarče in številom kopij gena za 16S rRNK. Podroben postopek testiranja sledi metodologiji, ki je opisana v dokumentu Rezultati pilotnega epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji [9].

3.6 Kemijske laboratorijske preiskave za določanje ostankov antibiotikov v vzorcih odpadne vode

Vzorce odpadne vode analiziramo z uporabo tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) na aparatu UHPLC/MS/MS. Izvedemo ekstrakcijo na trdni fazi (angl. solid-phase extraction), s katero iz vzorcev odstranimo potencialne interferenčne komponente ter koncentriramo ciljne analite. Ekstrakte analiziramo z metodo LC-MS/MS.

3.7 Poročanje rezultatov laboratorijskih preiskav Nacionalnemu inštitutu za javno zdravje

NLZOH rezultate laboratorijskih preiskav po zaključenih analizah poroča v Aplikacijo za prijavo laboratorijskih rezultatov testiranja vzorcev odpadne vode.

4. Upravljanje in analiza podatkov

4.1 Zbiranje in upravljanje podatkov

Rezultate laboratorijskih preiskav proti karbapenemom odpornih bakterij v vzorcih odpadne vode NLZOH poroča v navedeno aplikacijo (poglavje 3.6), od koder jih NIJZ zbira v namenski zbirki podatkov, ki je namenjena spremljanju povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadni vodi.

Zbirka podatkov omogoča učinkovito združevanje in organizacijo vseh rezultatov za določene povzročitelje nalezljivih bolezni pridobljenih iz posameznega vzorca odpadne vode skupaj s podatki o lastnostih vzorca (temperatura, pretok,…).

4.2 Preverjanje kakovosti podatkov

NIJZ preverja in potrjuje prejete podatke rezultatov laboratorijskih preiskav z namenom zagotavljanja njihove celovitosti. Najprej se oceni popolnost podatkov ter preveri, ali so vsi zahtevani rezultati poročani v celoti in v ustreznem formatu. Sledi validacija časovnih okvirjev poročanja, kjer se preverja, ali so rezultati sporočeni znotraj predvidenega roka. Takšna sistematična kontrola zagotavlja natančne in pravočasne podatke, kar je ključnega pomena za pravočasno in učinkovito epidemiološko ukrepanje.

4.3 Analiza podatkov

NIJZ izvaja analize prejetih podatkov, ki so nato na voljo različnim strokovnim deležnikom za podporo pri odločanju in načrtovanju javnozdravstvenih ukrepov. Ti rezultati so osnova za pripravo ocen tveganja, s katerimi se podrobno preučijo morebitne grožnje za javno zdravje, povezane s trendi pojavljanja proti karbapenemom odpornih bakterij. V sodelovanju s strokovnjaki NLZOH in IMI se pripravljajo redna epidemiološka poročila, ki omogočajo povezovanje podatkov iz odpadne vode s podatki spremljanja, pri čemer podatki iz odpadne vode delujejo kot dopolnilo primarnemu sistemu spremljanja odpornosti bakterij iz kliničnih in nadzornih kužnin v humani mediciniin njihove geografske porazdelitve. Pridobljeni podatki omogočajo hitro prepoznavanje območij z večjim tveganjem, izdajanje izrednih obvestil ter prilagajanje strategij testiranja na lokalni ravni. Na podlagi teh ugotovitev se pripravljajo strokovna priporočila za usmerjanje javnozdravstvenih intervencij, ki vključujejo krepitev pripravljenosti zdravstvenega sistema, ozaveščanje skupnosti, izvajanje ciljnih preventivnih kampanj ter razvoj dolgoročnih strategij nadzora.

4.4 Interpretacija rezultatov spremljanja

Spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi predstavlja dopolnilni pristop k obstoječim sistemom spremljanja mikrobne odpornosti v humani medicini, saj omogoča spremljanje pojavljanja bakterij, odpornih proti antibiotikom in genetskih determinant odpornosti na ravni populacije. Z dolgoročnim sistematičnim spremljanjem bo mogoče prepoznavati geografske in časovne trende mikrobne odpornosti ter morebitne spremembe v pojavljanju odpornih bakterij in genetskih determinant odpornosti. Tako pridobljeni podatki predstavljajo strokovno podlago za nadaljnji razvoj epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi.

Pri primerjavi rezultatov spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi s podatki spremljanja v humani medicini, predvsem podatki mreže EARS-Net in analizo trendov VOB po metodologiji SKUOPZ ter Slovenskega anonimnega CPE sledilnika, je potrebno upoštevati razlike v metodologiji, namenu spremljanja in naboru bakterij, ki jih posamezna sistema spremljanja vključujeta. Kljub temu je mogoče

prepoznati posamezne vzporednice, kar so pokazali tudi rezultati našega pilotnega spremljanja. V analiziranih bakterijskih izolatih enterobakterij iz odpadne vode je bil namreč najpogosteje zaznan gen *bla*$_{OXA-48}$, karbapenemaze skupine OXA-48 pa so pomembno zastopane tudi med CPE v kliničnih in nadzornih kužninah bolnikov v Sloveniji [9,24]. Takšne ugotovitve nakazujejo uporabnost spremljanja odpadne vode za pridobivanje dodatnih informacij o pojavljanju in širjenju mikrobne odpornosti v naši populaciji.

Pomemben vidik predstavlja tudi spremljanje koncentracij genovza karbapenemaze, neposredno v odpadni vodi. Pri tem se poleg absolutnih koncentracij upoštevajo koncentracije, normalizirane glede na gen za bakterijsko 16S rRNK, ki predstavlja približek skupne bakterijske obremenitve odpadne vode. Rezultati pilotnega spremljanja so pokazali, da so lahko spremembe normaliziranih koncentracij deloma povezane s spremembami skupne bakterijske obremenitve, zato je pri njihovem vrednotenju pomembno upoštevati oba kazalnika. Pri vrednotenju časovnih trendov koncentracij genov za mikrobno odpornost v odpadni vodi je treba upoštevati tudi vpliv okoljskih dejavnikov, predvsem padavin in pretoka odpadne vode, ki lahko vplivajo na razredčenje vzorcev in zaznane koncentracije genov za mikrobno odpornost. Dodatno je smiselno preučevati povezave med porabo antibiotikov, njihovimi ostanki v odpadni vodi in pojavljanjem genov za mikrobno odpornost v odpadni vodi. Na podlagi razpoložljivih podatkov iz našega pilotnega spremljanja ni mogoče dokazati neposredne vzročne povezave med porabo antibiotikov in pojavljanjem genetskih determinant odpornosti v odpadni vodi.

Na mednarodnem in strokovnem področju metode ter protokoli za spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi še niso popolnoma standardizirani, so pa trenutno v fazi intenzivnega poenotenja in prehajanja v zakonske okvire. Ker je področje okoljskega monitoringa odpadne vode razmeroma novo, se je do sedaj razvijalo predvsem na podlagi posameznih znanstveno-raziskovalnih projektov. Zaradi te izrazite metodološke heterogenosti obstoječih raziskav je primerjava rezultatov spremljanja odpornosti mikroorganizmov proti antibiotikom v odpadni vodi med različnimi območji in sistemi spremljanja mogoča le ob dosledni uporabi standardiziranih postopkov vzorčenja, kultivacije in laboratorijskih analiz.

4.5 Javno objavljanje rezultatov

Rezultati rednega spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi bodo javno dostopni na spletni strani NIJZ.

5. Omejitve

Pri interpretaciji rezultatov spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi je treba upoštevati več omejitev. Spremljanje temelji na vzorčenju odpadne vode, ki naravno združuje izločke velikega števila ljudi v skupnosti (populacijski nivo). Posledično rezultatov ni mogoče neposredno povezati z individualnimi kliničnimi primeri [21].

Upoštevati je treba tudi, da je spremljanje omejeno izključno na populacijo na prispevnem območju, ki je priključena na javno kanalizacijsko omrežje s KČN, na kateri poteka vzorčenje odpadne vode. Rezultati ne zajemajo prebivalcev na območjih z individualnimi sistemi odvajanja odpadne vode (npr. nepretočne greznice, male čistilne naprave), kar je pomemben dejavnik pri interpretaciji epidemiološke slike na ravni celotne regije.

Na rezultate spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi lahko pomembno vplivajo tudi okoljski dejavniki. Padavine, taljenje snega, temperatura odpadne vode in prisotnost industrijskih kemikalij lahko vplivajo na sestavo oziroma razredčenje vzorca ter posledično na zaznavanje in količinsko opredelitev spremljanih mikroorganizmov in genov odpornosti [21].

Dodatno omejitev predstavlja kompleksnost laboratorijskih analiz vzorcev odpadne vode. Odpadna voda vsebuje številne inhibitorje in druge snovi, ki lahko vplivajo na ekstrakcijo in molekularno analizo. Izvajanje laboratorijskih preiskav vzorcev odpadne vode zato zahteva posebej prilagojene metode, laboratorijsko infrastrukturo in strokovno usposobljeno osebje [22].

6. Reference

[1] World Health Organization. Ten threats to global health in 2019. 2026. Dostopno na: https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019 (31. 08. 2026).

[2] Chau, K.K.; Barker, L.; Budgell, E.P.; Vihta, K.D.; Sims, N.; Kasprzyk-Hordern, B.; Harriss, E.; Crook, D.W.; Read, D.S.; Walker, A.S.; et al. Systematic review of wastewater surveillance of antimicrobial resistance in human populations. *Environ Int* **2022**, *162*, 107171, doi: 10.1016/j.envint.2022.107171.

[3] World Health Organization. *Wastewater and environmental surveillance: summary for antimicrobial resistance*. World Health Organization, 2025. Dostopno na: https://www.who.int/publications/m/item/wastewater-and-environmental-surveillance--summary-for-antimicrobial-resistance (31. 08. 2026).

[4] Hock, L.; Luiken, R.; Valério, E.; Vargha, M.; Vierheilig, J.; Börjesson, S.; Pitkänen, T.; Schmitt, H. Integrating AMR surveillance into wastewater monitoring systems in 2025: a position on the implementation of Article 17 of the Urban Wastewater Treatment Directive (UWWTD). *Euro Surveill* **2026**, *31* (3), 2500289, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2026.31.3.2500289.

[5] Salam, M.A.; Al-Amin, M.Y.; Salam, M.T.; Pawar, J.S.; Akhter, N.; Rabaan, A.A.; Alqumber, M.A.A. Antimicrobial resistance: a growing serious threat for global public health. *Healthcare* **2023**, *11* (13), 1946, doi: 10.3390/healthcare11131946.

[6] Papp-Wallace, K.M.; Endimiani, A.; Taracila, M.A.; Bonomo, R.A. Carbapenems: past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55* (11), 4943-4960, doi: 10.1128/aac.00296-11.

[7] Nacionalni inštitut za javno zdravje. Pilotno epidemiološko spremljanje na karbapeneme odpornih bakterij v odpadnih vodah v Sloveniji (V3-24040). 2026. Dostopno na: https://nijz.si/projekti/pilotno-epidemiolosko-spremljanje-na-karbapeneme-odpornih-bakterij-v-odpadnih-vodah-v-sloveniji-v3-24040/ (28. 05. 2026).

[8] Drobnič, E.; Galičič, A.; Kranjec, N.; Mikuž, A.; Mozetič, M.; Rožanec, J.; Simonović, Z.; Trop Skaza, A.; Učakar, V.; Steyer, A.; et al. S*trokovne podlage za vzpostavitev epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji*. 2025.

[9] Bolješić, M.; Cerar Kišek, T.; Fras, D.; Janko, T.; Koritnik, T.; Križanec, B.; Kuzma, A.; Mioč, V.; Prevc, J.; Ribič, H.; et al. *Rezultati pilotnega epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji*. Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2026.

[10] European Centre for Disease Prevention and Control. *ECDC framework to guide the integration of wastewater-based surveillance into infectious disease surveillance at the EU/EEA level*. European Centre for Disease Prevention and Control, 2025. Dostopno na: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/ecdc-framework-guide-integration-wastewater-based-surveillance-infectious-disease (15. 10. 2026).

[11] Direktiva (EU) 2024/3019 Evropskega parlamenta in Sveta z dne 27. novembra 2024 o čiščenju komunalne odpadne vode (prenovitev). Uradni list Evropske unije, 12. 12. 2024.

[12] World Health Organization. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. World Health Organization, 2024. Dostopno na: https://www.who.int/publications/i/item/9789240093461 (11. 09. 2026).

[13] Nordmann, P.; Dortet, L.; Poirel, L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends Mol Med* **2012**, *18* (5), 263-272, doi: 10.1016/j.molmed.2012.03.003.

[14] Štrumbelj, I.; Pirš, M. *Smernice za mikrobiologe - ugotavljanje odpornosti proti karbapenemom in ugotavljanje karbapenemaz - enterobakterije, Acinetobacter baumannii in Pseudomonas aeruginosa - 3. izdaja, april 2022*. Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, 2022. Dostopno na: https://imi.si/wp-content/uploads/2022/04/Smernice-za-karbapenemaze-in-CR-za-mikrobiologe-3.-izdaja-april-2022.pdf (21. 09. 2026).

[15] Pirš, M.; Cerar Kišek, T.; Križan Hergouth, V.; Seme, K.; Mueller Premru, M.; Jeverica, S.; Logar, M.; Mrvič, T.; Žnidaršič, B.; Jordan Markočič, O. Successful control of the first OXA-48 and/or NDM carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in Slovenia 2014–2016. J Hosp Infect 2019, 101 (2), 142-149. doi: 10.1016/j.jhin.2018.10.022.

[16] Benulič, K.; Pirš, M.; Couto, N.; Chlebowicz, M.; Rossen, J.W.A.; Zorec, T.M.; Seme, K.; Poljak, M.; Lejko Zupanc, T.; Ružić-Sabljić, E.; et al. Whole genome sequencing characterization of Slovenian carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, including OXA-48 and NDM-1 producing outbreak isolates. *PloS One* **2020**, *15* (4), e0231503, doi: 10.1371/journal.pone.0231503.

[17] Pirs, M.; Kramar, U.; Triglav, T.; Strašek Smrdel, K.; Celar Šturm, A.; Bezjak, L.; Janezic, S. National genomic surveillance of carbapenemase-producing *Escherichia coli* isolates in Slovenia, January 1st–December 31st 2023. *Front Public Health* **2026**, *14*, 1924446, doi: 10.3389/fpubh.2026.1924446.

[18] European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net): annual epidemiological report for 2024*. European Centre for Disease Prevention and Control, 2025. Dostopno na: https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-eueea-ears-net-annual-epidemiological-report-2024 (21. 09. 2026).

[19] Teban-Man, A.; Szekeres, E.; Fang, P.; Klümper, U.; Hegedus, A.; Baricz, A.; Berendonk, T.U.; Pârvu, M.; Coman, C. Municipal wastewaters carry important carbapenemase genes independent of hospital input and can mirror clinical resistance patterns. *Microbiol Spectr* **2022**, *10* (2), e0271121, doi: 10.1128/spectrum.02711-21.

[20] O'Keeffe, J. Wastewater-based epidemiology: current uses and future opportunities as a public health surveillance tool. *Environ Health Rev* **2021**, *64* (3), 44-52, doi: 10.5864/d2021-015.

[21] Tiwari, A.; Kurittu, P.; Al-Mustapha, A.I.; Heljanko, V.; Johansson, V.; Thakali, O.; Mishra, S.K.; Lehto, K.M.; Lipponen, A.; Oikarinen, S.; et al. Wastewater surveillance of antibiotic-resistant bacterial pathogens: a systematic review. *Front Microbiol* **2022**, *13*, 977106, doi: 10.3389/fmicb.2022.977106.

[22] Parkins, M.D.; Lee, B.E.; Acosta, N.; Bautista, M.; Hubert, C.R.J.; Hrudey, S.E.; Frankowski, K.; Pang, X.L. Wastewater-based surveillance as a tool for public health action: SARS-CoV-2 and beyond. *Clin Microbiol Rev* **2024**, *37* (1), e0010322, doi: 10.1128/cmr.00103-22.

[23] Ministrstvo za okolje in prostor. Register okoljevarstvenih dovoljenj za komunalne čistilne naprave. Portal GOV.SI, 2026. Dostopno na: https://www.gov.si/podrocja/okolje-in-prostor/okolje/vode/register-okoljevarstvenih-dovoljenj-za-komunalne-cistilne-naprave/ (02. 11. 2026).

[24] Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo. CPE sledilnik. 2026. Dostopno na: https://imi.si/cpe-sledilnik/ (21. 09. 2026).