

REZULTATI PILOTNEGA 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

Rezultati pilotnega epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji

Avtorji (po abecednem vrstnem redu)

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano

dr. Maja Bolješić, univ. dipl. biol.
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.
Jošt Prevc, mag. 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, dr. med., spec. klinične mikrobiologije

Nacionalni inštitut za javno zdravje

Eva Drobnič, mag. san. inž.
doc. dr. An Galičič, mag. san. inž.
Uroš Glavan, 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

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. Materiali in metode ... 2

2.1 Vzorčenje in transport vzorcev ... 2

2.2 Kultivacija, izolacija, izbor in kvantifikacija bakterij ... 2

2.3 Osamitev in identifikacija ... 3

2.4 Določanje občutljivosti za antibiotike in kriteriji za opredelitev odpornosti proti karbapenemom ... 3

2.5 PCR v realnem času na izolatih ... 3

2.6 Neposredno molekularno spremljanje genov mikrobne odpornosti v odpadni vodi ... 3

2.7 Določanje antibiotikov v odpadni vodi ... 4

2.8 Sekvenciranje celotnih genomov in bioinformatska analiza ... 4

3. Rezultati ... 5

3.1 Vzorčenje in število bakterij ... 5

3.2 Taksonomska struktura bakterij v analiziranih vzorcih ... 5

3.3 Odpornost proti karbapenemom ... 6

3.4 Dokazovanje genov za karbapenemaze (*bla*IMP, *bla*KPC, *bla*VIM, blaOXA-48-like in *bla*NDM) pri bakterijskih izolatih ... 7

3.5 Sekvenciranje celotnih genomov in primerjava rezultatov PCR–WGS ... 8

3.6 Prisotnost genov za karbapenemaze neposredno v vzorcih odpadne vode ... 8

3.7 Koncentracije izbranih antibiotikov v odpadni vodi ... 11

4. Razprava ... 12

5. Zaključek ... 15

6. Reference ... 16

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Kriteriji za opredelitev proti karbapenemom odpornih bakterij in značilnosti (kratic) izolatov, povzeto po SKOUPZ. 3
Preglednica 2: Rezultati vzorčenja, okoljskih parametrov in koncentracija obarvanih kolonijskih enot iz vzorcev odpadne vode odvzeti mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 5
Preglednica 3: Število in vrsta izolatov izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzeti mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 6
Preglednica 4: Delež proti karbapenemom odpornih izolatov izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 7
Preglednica 5: Geni za karbapenemaze pri izolatih bakterij odpornih proti karbapenemom, izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 7
Preglednica 6: Primerjava rezultatov PCR-WGS po posameznih skupinah genov pri izolatih bakterij odpornih proti karbapenemom izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 8
Preglednica 7: Koncentracije antibiotikov v vzorcih odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 11

KAZALO SLIK

Slika 1: Taksonomska struktura bakterijskih izolatov izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralne čistilne naprave Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 6
Slika 2: Geni za karbapenemaze pri izolatih bakterij odpornih proti karbapenemom izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 7
Slika 3: Koncentracije genov za karbapenemaze neposredno v vzorcih odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026... 9
Slika 4: Ločen prikaz koncentracij posameznih genov za mikrobno odpornost neposredno v vzorcih odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026. 10

Uporabljene kratice

CČN	centralna čistilna naprava
CFU	kolonijske enote (angl. Colony-Forming Units)
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
CRPs	proti karbapenemom in drugim betalaktamskim antibiotikom odporen *Pseudomonas aeruginosa*
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ECDC	Evropski center za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control)
dPCR	digitalna verižna reakcija s polimerazo (angl. digital Polymerase Chain Reaction)
EARS-Net	Mednarodna mreža nacionalnih sistemov spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom v Evropi (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network)
EUCAST	Evropska komisija za testiranje občutljivosti za protimikrobna zdravila (angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
IMI	Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani
LOD	meja zaznavnosti (angl. Limit of Detection)
NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje
NLZOH	Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
PNEC	predvidena koncentracija brez učinka (angl. Predicted No-Effect Concentration)
RNA	ribonukleinska kislina (angl. Ribonucleic Acid)
rRNA	ribosomska ribonukleinska kislina (angl. Ribosomal Ribonucleic Acid)
SKUOPZ	Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila
WGS	sekvenciranje celotnega genoma (angl. Whole Genome Sequencing)

Povzetek

V 12 zaporednih vzorcih odpadne vode, odvzetih enkrat mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo (CČN) Ljubljana, smo z uporabo dveh karbapenem-selektivnih kromogenih gojišč spremljali rast kolonij bakterij, identificirali izbrane kolonije z metodo masne spektrometrije MALDI-TOF MS (angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight), določili občutljivost izolatov za antibioke s fenotipsko metodo disk difuzije, pri izolatih in neposredno v odpadni vodi dokazovali pet skupin genovza karbapenemaze, pri izbranih izolatih izvedli sekvenciranje celotnih genomov (angl.: Whole Genome Sequencing, WGS) ter določali koncentracije izbranih antibiotikov v odvzetih vzorcih odpadne vode.

Rezultati, predstavljeni v tem poročilu, ne predstavljajo skupne koncentracije vseh bakterij, odpornih proti karbapenemom, ki so porasle na gojiščih, ker nepigmentirane oziroma mlečne kolonije niso bile vključene v nadaljnje analize. Med raziskavo smo do vrste identificirali 866 od 904 primarno izbranih kolonij.

Med 292 izolati bakterij reda Enterobacterales jih je bilo 112 (38,4 %) odpornih proti imipenemu in/ali meropenemu, s čimer so izpolnjevali fenotipski kriterij za enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom (CRE) po merilih Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ). Izolatov *Pseudomonas aeruginosa* nismo identificirali. Med 221 drugimi vrstami iz rodu *Pseudomonas* jih je bilo po merilih Evropske komisije za testiranje občutljivosti za protimikrobna zdravila (angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) 35 (15,8 %) odpornih proti imipenemu in/ali meropenemu. Pri izolatih *Aeromonas* spp. smo določili premere inhibicijskih con za imipenem in meropenem, vendar zaradi odsotnosti ustreznih kliničnih mejnih vrednosti po merilih EUCAST rezultatov nismo mogli razvrstiti v kategorije občutljivosti (S, I ali R) in posledično določiti deleža proti karbapenemom odpornih izolatov.

Pri 287 izolatih smo s verižno reakcijo s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction, PCR) dokazali gene za karbapenemaze iz skupin *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*NDM in/ali *bla*VIM. Pri 52 od 287 izolatov smo hkrati določili več genov za karbapenemaze.

Sekvenciranih je bilo 54 izolatov. Rezultati, pridobljeni s PCR in WGS, so se ujemali pri 94,0 % izolatov. Od 59 PCR-pozitivnih tarč jih je bilo z WGS potrjenih 55 (93,2 %); vseh 189 PCR-negativnih tarč je bilo negativnih tudi v sestavljenih genomih. Pri dveh izolatih je bil z WGS dodatno zaznan gen za karbapenemazo *bla*GES-14, pri enem izolatu pa gen za karbapenemazo *cphA-7*.

Antibiotika cefepim in ceftriakson smo v zaznavnih koncentracijah določili v petih vzorcih odpadne vode, odvzetih od decembra 2025 do aprila 2026, medtem ko so bile koncentracije ertapenema, imipenema in meropenema v celotnem obdobju spremljanja pod mejo detekcije.

Kljub metodološkim razlikam med epidemiološkim spremljanjem odpornosti v odpadni vodi in humani medicini rezultati kažejo posamezne vzporednice, zlasti pogosto prisotnost karbapenemaz skupine OXA-48.

Summary

In 12 consecutive wastewater samples collected monthly at the influent of the Ljubljana Central Wastewater Treatment Plant, we monitored bacterial colony growth using two carbapenem-selective chromogenic media, identified selected colonies using MALDI-TOF MS mass spectrometry, determined the phenotypic susceptibility of selected colonies using the disk diffusion method, investigated five groups of carbapenemase-encoding genes in bacterial isolates and directly in wastewater, performed whole-genome sequencing of selected isolates, and measured concentrations of selected antibiotics in the collected wastewater samples.

The results presented in this report do not represent the total concentration of all carbapenem-resistant bacteria that grew on the selective media, as non-pigmented or milky colonies were excluded from further analyses and colony colour is not species-specific. During the study, 866 of 904 initially selected colonies were successfully identified.

Among 292 bacterial isolates belonging to the order Enterobacterales, 112 (38.4%) were resistant to imipenem and/or meropenem, thereby meeting the phenotypic criteria for Carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) according to the Slovenian Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (SKUOPZ). No Pseudomonas aeruginosa isolates were identified. Among 221 other isolates of the genus Pseudomonas, 35 (15.8%) were resistant to imipenem and/or meropenem according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria; these isolates are not classified as Carbapenem- and other beta-lactam-resistant Pseudomonas aeruginosa. For Aeromonas spp., inhibition zone diameters were measured for imipenem and meropenem. However, due to the absence of appropriate EUCAST clinical breakpoints, the results could not be classified into susceptibility categories (S, I or R), and consequently, the proportion of carbapenem-resistant isolates could not be determined.

Using PCR, we detected the presence of carbapenemase-encoding genes belonging to the *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*NDM and/or *bla*VIM groups in 287 bacterial isolates. In 52 of these 287 isolates, more than one of the investigated carbapenemase-encoding genes was detected.

A total of 54 bacterial isolates underwent whole-genome sequencing. PCR and WGS results were concordant for 94.0% of the isolates. Of 59 PCR-positive targets, 55 (93.2%) were confirmed by WGS; all 189 PCR-negative targets were also negative in the assembled genomes. In addition, the *bla*GES-14 gene was detected by WGS in two isolates and cphA-7 in one isolate.

Cefepime and ceftriaxone were detected at measurable concentrations in five wastewater samples collected between December 2025 and April 2026, whereas concentrations of ertapenem, imipenem and meropenem remained below the limit of detection throughout the monitoring period.

Despite methodological differences between wastewater surveillance and surveillance in human healthcare settiWGS, the results indicate certain similarities, particularly the frequent detection of OXA-48-type carbapenemases.

1. Uvod

Dokument je nastal v okviru ciljnega raziskovalnega projekta (CRP) Pilotno epidemiološko spremljanje na karbapeneme odpornih bakterij v odpadni vodi (V3-24040), v okviru delovnega paketa 4. Projekt obravnava področje mikrobne odpornosti, ki predstavlja pomemben izziv za sodobno medicino in javno zdravje [1]. Bakterije, ki izločajo karbapenemaze, zlasti *Klebsiella pneumoniae*, sodijo med pomembne javnozdravstvene izzive, saj so nekateri izolati teh bakterij odporni proti vsem trenutno razpoložljivim antibiotikom [2]. 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 [3].

Cilj pilotne raziskave v okviru CRP je bil razviti laboratorijske metode in jih uporabiti za pilotno enoletno sistematično spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, genov za glavne karbapenemaze ter izbranih antibiotikov v vzorcih komunalne odpadne vode, odvzetih enkrat mesečno na vtoku v Centralne čistilne naprave (CČN) Ljubljana.

Pričujoči dokument predstavlja metodologijo in rezultate pilotnega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi. Dokument je nastal na podlagi predhodno pripravljenih strokovnih podlag [4] in že obstoječih praks spremljanja povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadni vodi v Sloveniji [5–7]. Pripravljen je bil 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. Materiali in metode

Spremljanje proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi je potekalo v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026 na vtoku v CČN Ljubljana. Odpadna voda se v CČN Ljubljana steka z območja, ki zajema 11 % slovenskega prebivalstva, vključno z odpadno vodo iz terciarne bolnišnice in ostalih zdravstvenih zavodov na tem območju. Odvzem vzorcev odpadne vode na vtoku v CČN in njihova analiza se je izvajala enkrat na mesec.

Odvzem vzorcev in laboratorijske preiskave odpadne vode je v celoti izvedel NLZOH.

2.1 Vzorčenje in transport vzorcev

Vzorci odpadne vode so bili odvzeti z avtomatskim vzorčevalnikom, ki je v enakih časovnih intervalih odvzemal enake volumne podvzorcev, tako smo pridobili 24-urni časovno sorazmerni sestavljeni vzorec neobdelane odpadne vode na vtoku CČN Ljubljana. Skupno je bilo v sterilno embalažo odvzetih 12 vzorcev odpadne vode po 1 L. Vzorci so bili transportirani v laboratorij in hranjeni ob zagotavljanju hladne verige, pri temperaturi 5±3 °C. Za vsak vzorec je bil zabeležen skupni pretok odpadne vode na CČN v času vzorčenja, padavine v 24-urnem obdobju vzorčenja in kumulativne padavine v istem obdobju ter v 48 urah pred začetkom vzorčenja (skupaj 72 ur).

2.2 Kultivacija, izolacija, izbor in kvantifikacija bakterij

Iz vsakega vzorca smo pripravili dve serijski redčini 10^{-1} in 10^{-2} v fiziološki raztopini. Na kromogena gojišča (CHROMagar™, mSuperCARBA™ ter chromID® CARBA SMART Agar (CARBA/OXA) smo nacepili po 100 µL nerazredčenega in obeh redčin vzorcev. Po prekonočni inkubaciji smo prešteli jasno razločljive obarvane (modre in rožnato-vijolične) kolonije. Neobarvane oziroma mlečne kolonije smo beležili opisno, vendar jih zaradi pogoste neštevne rasti nismo vključili v preiskavo.

Na kromogenih gojiščih smo kolonije razlikovali po barvi in morfologiji skladno z navodili proizvajalca preliminarno opredelili kot: i) rožnate do bordo obarvane kolonije - *Escherichia coli*, ii) modre, modrozelene oziroma vijoličaste kolonije - predstavniki skupine KESC (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia* in *Citrobacter*), iii) rjavo obarvane kolonije - predstavniki skupine Proteeae (*Proteus*, *Providencia* in *Morganella*). Dokončno identifikacijo do vrste smo izvedli z MALDI-TOF MS (točka 2.3).

Neobarvanih, prosojnih, kremnih oziroma mlečnih kolonij nismo izolirali v čisti kulturi oziroma identificirali do vrste; med njimi so bili pričakovani tudi predstavniki rodov *Aeromonas*, *Pseudomonas* in *Acinetobacter* ter druge po Gramu negativne bakterije.

Za končno analizo iz nacepljenih serijskih redčin izbrali kromogeno gojišče z največjim številom posamičnih obarvanih kolonij v območju 5–130 kolonijskih enot (angl. Colony-Forming Units, CFU). Kromogena gojišča, na katerih je poraslo 30–130 CFU smo označili kot števna, gojišča s 5–29 CFU pa smo ocenili kot rezultat z večjo števno negotovostjo. Gojišča na katerih je poraslo 1–4 CFU, ali s konfluentno rastjo oziroma nejasno ločljivimi kolonijami, nismo vključili v nadaljne analize. Za kvantifikacijo smo uporabili enačbo:

$$\text{CFU/mL} = \text{število obarvanih kolonij} / (\text{nacepljeni volumen (mL)} \times \text{faktor redčitve})$$

2.3 Osamitev in identifikacija

Z vsakega gojišča (oziroma polovice v primeru chromID® CARBA SMART) smo do 30 obarvanih kolonij izolirali v čisti kulturi in jih identificirali z MALDI-TOF MS do vrste.

2.4 Določanje občutljivosti za antibiotike in kriteriji za opredelitev odpornosti proti karbapenemom

Fenotipsko občutljivost smo določili v skladu priporočili Evropske komisije za testiranje občutljivosti na protimikrobna zdravila (angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) [8] in smernicami Slovenske komisije za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila (SKUOPZ) [9]. Testirali smo občutljivost za ceftazidim, cefepim, imipenem, meropenem ter piperacilin/tazobaktam z metodo disk difuzije.

V analizo smo vključili skupno 790 izolatov. Kriteriji za opredelitev proti karbapenemom odpornih bakterij in značilnosti (kratic) izolatov so prikazani v Preglednici 1.

Preglednica 1: Kriteriji za opredelitev proti karbapenemom odpornih bakterij in značilnosti (kratic) izolatov, povzeto po SKOUPZ.

Bakterijski rod ali vrsta	Mikrobiološki kriterij (EUCAST)	Kratica (vir)
Enterobacterales	R za IPM in/ali MEM.	CRE (SKUOPZ)
Pseudomonas aeruginosa	R za TZP, R za CAZ in/ali FEP ter R za IPM in/ali MEM.	CRPs (SKUOPZ)
Kompleks *Acinetobacter baumannii*	R za IPM in/ali MEM.	CRAb (SKUOPZ)
Pseudomonas spp., razen ***P. aeruginosa***	IPM in/ali MEM klinične razmejitvene vrednosti za *Pseudomonas* spp.	opisno: odporen proti IPM in/ali MEM; ne CRPs
Aeromonas spp.	EUCAST kriteriji za CAZ in FEP; za IPM, MEM in TZP ni EUCAST kliničnih razmejitvenih vrednosti	R za CAZ/FEP; karbapenemske cone opisno
Acinetobacter spp., razen kompleksa ***A. baumannii***	IPM, MEM klinične razmejitvene vrednosti za *Acinetobacter* spp.	opisno: odporen proti IPM in/ali MEM; ne CRAb
Drugi redki taksoni	ni EUCAST kliničnih razmejitvenih vrednosti	samo premeri con

Legenda: IPM – imipenem; MEM – meropenem; TZP - piperacilin/tazobaktam; CAZ – ceftazidim; FEP – cefepim; CRPs - proti karbapenemom in drugim betalaktamskim antibiotikom odporen *Pseudomonas aeruginosa;* CRAb - proti karbapenemom odporen *Acinetobacter baumannii;* CRE - enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom (angl. Carbapenem-Resistant Enterobacterales); EUCAST - Evropska komisija za testiranje občutljivosti za protimikrobna zdravila; SKUOPZ - Slovenska komisija za ugotavljanje občutljivosti za protimikrobna zdravila.

2.5 PCR v realnem času na izolatih

Prisotnost tarč *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*NDM in *bla*VIM smo določali s PCR v realnem času.

2.6 Neposredno molekularno spremljanje genov mikrobne odpornosti v odpadni vodi

Po sprejemu v laboratorij smo vzorce homogenizirali in vsak vzorec razdelili na štiri alikvote po 35 mL. Koncentriranje smo tako izvedli v štirih vzporednih ponovitvah za vsak vzorec.

Vzorce smo koncentrirali z metodo Ceres Nanotrap® z uporabo reagentov Microbiome A in Microbiome B. Posamezni 35-mL alikvot smo skoncentrirali na končni volumen 400 µL. Iz koncentriranih vzorcev smo nato ekstrahirali nukleinske kisline z avtomatiziranim sistemom KingFisher™ Flex in kompletom reagentov MagMAX™ Wastewater Ultra Nucleic Acid Isolation Kit. Kot procesno kontrolo za spremljanje učinkovitosti koncentriranja, ekstrakcije nukleinskih kislin in morebitne prisotnosti inhibitorjev smo uporabili fokji herpesvirus (angl. Phocine Herpesvirus, PhHV).

Prisotnost in koncentracijo genov za karbapenemaze smo določali z digitalnim PCR (dPCR) na sistemu QIAcuity. Analizirali smo pet tarč, povezanih z odpornostjo proti karbapenemom: *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*NDM in *bla*VIM. Tarče genov za protimikrobno odpornosti smo določili z multipleksnih reakcijah PCR. Določali smo tudi koncentracijo gena za bakterijsko 16S rRNA, ki predstavlja približek skupne bakterijske obremenitve in smo jo uporabili za namen normalizacije koncentracij, ter gena *intI1*, ki kodira integrazo integronov razreda 1 in se uporablja kot kazalnik antropogenega onesnaženja ter potenciala za horizontalni prenos genov odpornosti. Tarči 16S rRNA in *intI1* smo analizirali ločeno v enojnih reakcijah.

2.7 Določanje antibiotikov v odpadni vodi

Analize vzorcev odpadne vode so bile izvedene z uporabo tekočinske kromatografije, sklopljene s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) na aparatu UHPLC/MS/MS (Sciex Triple Quad 6500, sklopljen z Agilent UHPLC). Zaradi kompleksne sestave matriksa odpadne vode je bila pred instrumentalno analizo izvedena ekstrakcija na trdni fazi (angl. solid-phase extraction), s katero smo iz vzorcev odstranili potencialne interferenčne komponente ter koncentrirali ciljne analite. Po ekstrakciji so bili pridobljeni ekstrakti analizirani z metodo LC-MS/MS. Identifikacija analitov je temeljila na njihovem retenzijskem času in značilnih masno-spektrometričnih prehodih, medtem ko je bila kvantifikacija izvedena na podlagi kalibracijskih krivulj, pripravljenih iz ustreznih standardnih raztopin. Takšen pristop omogoča občutljivo in selektivno določanje nizkih koncentracij ciljnih spojin v kompleksnem matriksu odpadne vode.

2.8 Sekvenciranje celotnih genomov in bioinformatska analiza

Za sekvenciranje celotnih genomov je bilo izbranih 54 izolatov. Celokupno nukleinsko kislino smo osamili z avtomatsko ekstrakcijo na aparaturi QIAcube Connect (Qiagen) s kitom QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen). Koncentracija ekstrahirane DNA je bila določena fluorometrično z aparatom Qubit Flex in kompletom Qubit dsDNA HS Assay Kit. Knjižnice so bile pripravljene s kompletom Nextera DNA Flex Library Prep Kit in indeksi Illumina DNA/RNA UD Indexes Sets na pipetirnem robotu Hamilton NGS Star ter sekvencirane na aparatu NextSeq 2000 z reagenti NextSeq 1000/2000 P1; načrtovana tarčna pokritost je bila 90-kratna.

Za analizo sekvenčnih podatkov smo vzpostavili cevovod (angl. pipeline) (okolje Linux), ki zajema analizo kvalitete surovih odčitkov s programom FastQC, odstranjevanje odčitkov slabše kvalitete ter adapterjev s programom Trimmomatic, sestavljanje kratkih odčitkov v soseske s programom SPAdes, analizo parametrov in kvalitete sestavljenih sosesk s programom QUAST in določanje pokritosti genoma z Minimap2/Samtools. Za identifikacijo bakterij ter preverjanje morebitne kontaminacije surovih odčitkov smo uporabili KmerFinder. Za določanje in identifikacijo mehanizmov odpornosti smo uporabili referenčne podatkovne baze in orodje CARD-RGI.

Skladnost PCR–WGS je bila vrednotena na ravni petih družin tarč. Zadetki *bla*IMP-10, *bla*KPC-3, *bla*NDM-5, *bla*OXA-48 in *bla*VIM-1 so bili preslikani na ustrezne družine PCR. Dodatna gena *bla*GES-14 in *cphA-7* sta bila ovrednotena ločeno.

3. Rezultati

3.1 Vzorčenje in število bakterij

Rezultati kvantifikacije 36 vzorcev (12 vzorčenj): 21 vzorcev z 30–130 CFU, 15 vzorcev z 5–29 CFU. Mediane vrednosti koncentracije so znašale 2.650 CFU/mL na gojišču mSuperCARBA, na gojišču chromID® CARBA SMART Agar (CARB/OXA) smo ocenili posebej za polovično gojišče CARB - 2.800 CFU/mL in za polovično gojišče OXA - 4.450 CFU/mL.

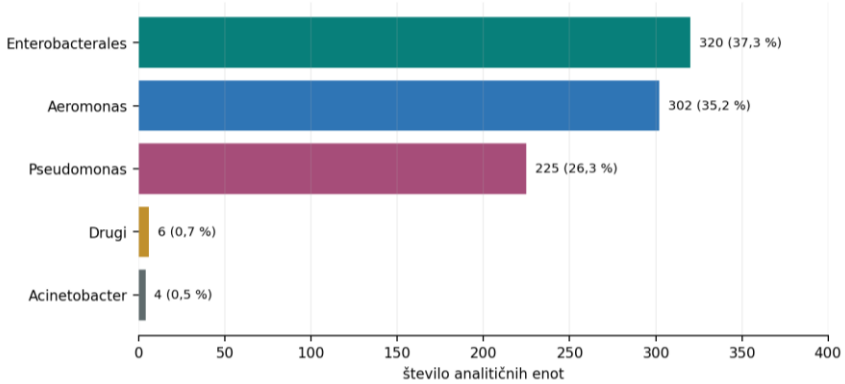
Najvišja koncentracija je bila 78.000 CFU/mL pri vzorcu V12 na gojišču mSuperCARBA, najnižja pa 130 CFU/mL pri vzorcu V6 na enakem gojišču. Vzorec V6 je sovpadal z največjim dotokom odpadne vode in največ padavinami v času odvzema, vendar 12 časovnih točk ne omogoča vzročnega sklepanja. Podatki o posameznih vzorčenjih, vključno s pretokom odpadne vode, količino padavin in koncentracijami obarvanih bakterij na posameznih selektivnih gojiščih, so prikazani v Preglednici 2.

Preglednica 2: Rezultati vzorčenja, okoljskih parametrov in koncentracija obarvanih kolonijskih enot iz vzorcev odpadne vode odvzeti mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

Vzorec	Datum	Pretok (m^3/24 h)	Padavine 24 h (mm)	Padavine 72 h (mm)	mSuperCARBA (CFU/mL)	chromID® CARBA SMART – CARBA (CFU/mL)	chromID® CARBA SMART – OXA (CFU/mL)
V1	05. 05. 2025	69.264	4,7	4,7	2.700	4.700	3.200
V2	02. 06. 2025	67.164	0,0	0,0	3.500	3.500	4.500
V3	07. 07. 2025	76.066	19,0	19,4	5.000	8.300	4.600
V4	12. 08. 2025	42.984	0,0	0,0	4.100	2.800	5.900
V5	08. 09. 2025	52.430	0,0	1,1	1.060	5.800	1.500
V6	06. 10. 2025	107.786	25,3	60,3	130	900	540
V7	10. 11. 2025	55.010	0,0	0,0	3.000	900	6.300
V8	08. 12. 2025	68.540	0,0	7,9	2.600	700	8.000
V9	12. 01. 2026	56.072	0,3	7,0	2.100	2.800	8.000
V10	09. 02. 2026	86.386	4,3	15,4	1.000	940	1.100
V11	16. 03. 2026	53.840	1,1	4,4	2.000	3.700	4.400
V12	07. 04. 2026	42.852	0,0	0,0	78.000	2.400	2.500

3.2 Taksonomska struktura bakterij v analiziranih vzorcih

Med 904 primarno izbranimi kolonijami smo 866 identificirali do vrste. Največ izolatov je pripadalo redu Enterobacterales, sledila sta rodova *Aeromonas* in *Pseudomonas* (Slika 1, Preglednica 3).



Slika 1: Taksonomska struktura bakterijskih izolatov izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralne čistilne naprave Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

Preglednica 3: Število in vrsta izolatov izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzeti mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

Takson	n
Enterobacter cloacae kompleks	110
Aeromonas caviae	103
Aeromonas hydrophila	86
Pseudomonas monteilii	75
Enterobacter bugandensis	74
Aeromonas veronii	68
Pseudomonas putida	53
Klebsiella oxytoca	45
Enterobacter asburiae	36
Escherichia coli	35
Citrobacter freundii	30
Pseudomonas spp.	28
Pseudomonas alcaligenes	24

3.3 Odpornost proti karbapenemom

Med enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom (angl. Carbapenem-Resistant Enterobacterales, CRE) so bili najpogostejši *Enterobacter cloacae* kompleks (45), *Citrobacter freundii* (20), *Escherichia coli* (9), *Klebsiella oxytoca* (8) in *K. pneumoniae* (7).

Pri *Aeromonas* spp. so bili premeri con za imipenem mediana (razpon) 22 (6–41) mm, za meropenem 22 (6–41) mm in za piperacilin/tazobaktam 15 (6–33) mm. Iz podatkov iz literature je razvidno, da je pri rodu *Aeromonas* fenotip, ki kaže na odpornost proti karbapenemom, lahko povezan s kromosomsko zapisano metalo-β-laktamazo CphA in da običajno testiranje tega mehanizma ne zazna vedno zanesljivo. Tarča *cphA* ne spada med epidemiološko pomembne karbapenemaze in ni bila vključena v uporabljeni PCR-panel [10,11]. V Preglednici 4 so prikazani deleži proti karbapenemom odpornih izolatov.

Preglednica 4: Delež proti karbapenemom odpornih izolatov izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

Skupina / rezultat	n/N	Delež
Enterobacterales: IPM R	109/292	37,3 %
Enterobacterales: MEM R	59/292	20,2 %
Enterobacterales: CRE	112/292	38,4 %
Pseudomonas spp.: IPM in/ali MEM R	35/221	15,8 %
Kompleks *A. baumannii*: CRAb	0/1	0,0 %
Acinetobacter spp.: IPM in/ali MEM R	1/2	50,0 %
Aeromonas spp.: CAZ R	160/261	61,3 %
Aeromonas spp.: FEP R	129/269	48,0 %

Legenda: IPM – imipenem; MEM – meropenem; CRE - enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom; CRAb - proti karbapenemom odporen *Acinetobacter baumannii;* CAZ – ceftazidim; FEP – cefepim.

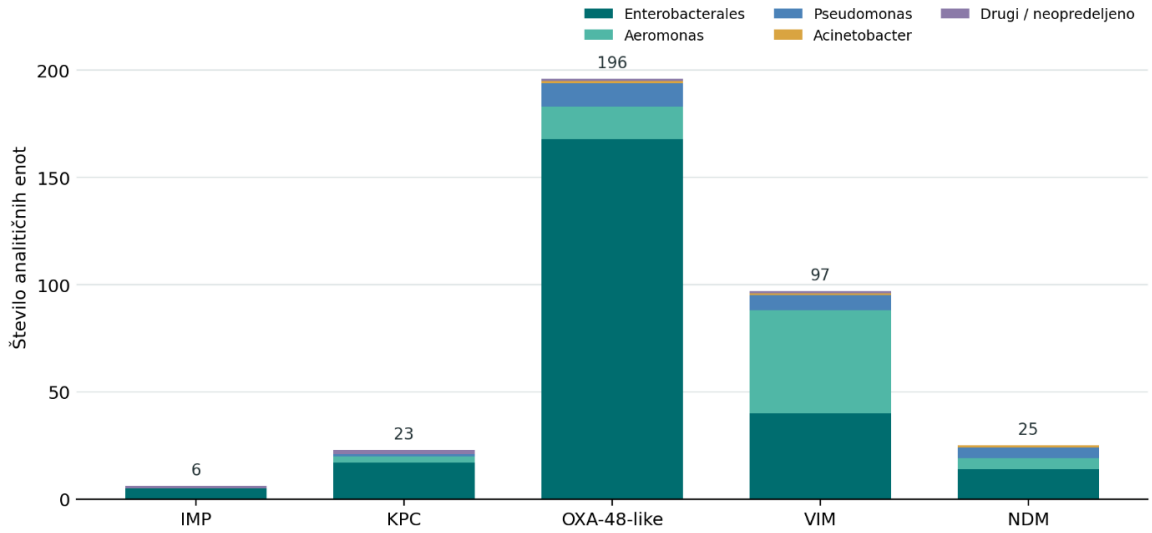
3.4 Dokazovanje genov za karbapenemaze (*bla*IMP, *bla*KPC, *bla*VIM, blaOXA-48-like in *bla*NDM) pri bakterijskih izolatih

Prisotnost genov za karbapenemaze skupin *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*NDM in *bla*VIM, smo določali s PCR v realnem času. Pogostost zaznave posameznih tarč v analiziranih izolatih je prikazana v Preglednici 5.

Preglednica 5: Geni za karbapenemaze pri izolatih bakterij odpornih proti karbapenemom, izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

Tarča	PCR
bla*IMP*	6/779
bla*KPC*	23/779
bla*OXA-48-like*	196/779
bla*VIM*	97/778
bla*NDM*	25/779

Pri 52 od 287 PCR-pozitivnih izolatov je bilo hkrati prisotnih več genov za karbapenemaze. Porazdelitev genov in njihovih kombinacij je prikazana na Sliki 2. Najpogostejša kombinacija je bila *bla*OXA-48-like in *bla*VIM (32 izolatov), sledila je kombinacija *bla*OXA-48-like in *bla*NDM (10 izolatov).



Slika 2: Geni za karbapenemaze pri izolatih bakterij odpornih proti karbapenemom izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

3.5 Sekvenciranje celotnih genomov in primerjava rezultatov PCR–WGS

Sekvenciranih je bilo 54 izolatov. Povprečna pokritost sestavljenih genomov je bila 41 do 107-kratna in je pri vseh izolatih presegla uporabljeni prag 30-kratne pokritosti. Rezultati, pridobljeni s PCR in WGS, so se ujemali pri 94,0 % izolatov. Od 59 upoštevanih PCR-pozitivnih tarč jih je bilo z WGS potrjenih 55 (93,2 %); vseh 189 PCR-negativnih tarč je bilo negativnih tudi v sestavljenih genomih. Primerjava rezultatov PCR in WGS po posameznih skupinah genov, ki kodirajo karbapenemaze, je prikazana v Preglednici 6.

Preglednica 6: Primerjava rezultatov PCR-WGS po posameznih skupinah genov pri izolatih bakterij odpornih proti karbapenemom izoliranih iz vzorcev odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

Tarča	PCR	WGS potrjeno	PCR+/WGS–
***bla*IMP**	1	1	0
***bla*KPC**	2	1	1
***bla*OXA-48-like**	45	43	2
***bla*VIM**	9	8	1
***bla*NDM**	2	2	0
Skupaj	59	55	4

Pri dveh izolatih (*Citrobacter* sp. in *Klebsiella michiganensis*) je bil z WGS dodatno zaznan *bla*GES-14, pri enem izolatu (*Aeromonas hydrophila)* pa *cphA-7*; *bla*GES-14 kodira karbapenemazo iz družine GES [12]. Pri izolatu V4/M22 (*Citrobacter* sp.) je bil sočasno z *bla*GES-14 zaznan *bla*IMP-10, fenotip pa je bil izrazito odporen.

Med pogostimi geni za druge β-laktamaze so bili geni za betalaktamaze razširjenega spektra (angl. Extended-Spectrum Beta-Lactamases) - *bla*CTX-M-15 (35 izolatov) in geni za plazmidno zapisane encime AmpC - *bla*ACT-57 (28 izolatov), *bla*FOX-4 (27 izolatov) in *bla*DHA-1 (6 izolatov). Ti geni ne kodirajo betalakatamaz, ki razgrajujejo karbapeneme, temveč razgrajujejo cefalosporine, kljub temu pa ob hkratni izgubi porinov ali prisotnosti črpalk lahko prispevajo k zmanjšani občutljivosti za karbapeneme pri bakterijskem izolatu [13].

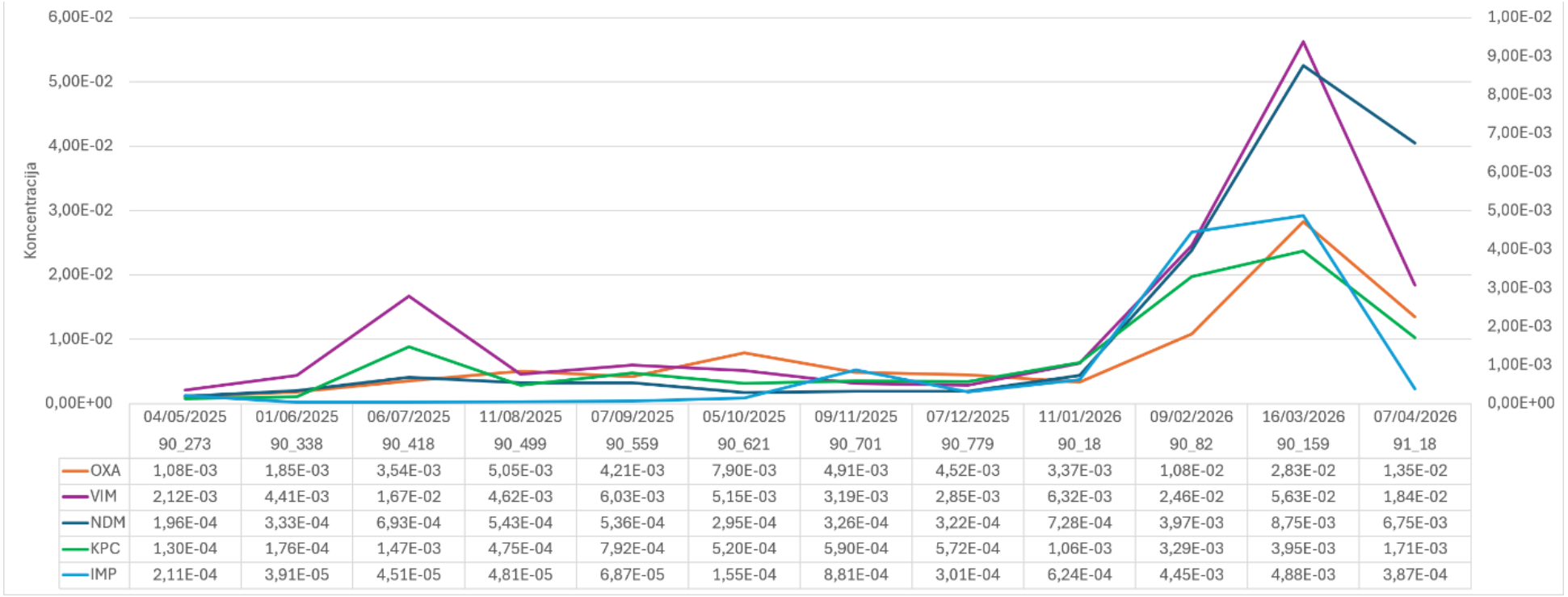
Končna identifikacija z MALDI-TOF MS in identifikacija z orodjem KmerFinder sta se na ravni vrste ujemali pri 27/54 izolatih, pri 26/54 je šlo za isti rod in drugo vrsto. MALDI-TOF MS ne loči zanesljivo med vrstami, ki sestavljajo *Enterobacter cloacae* kompleks (pr. *E. buganensis* in *E. asburiae*), zanesljivo jih lahko opredelimo z WGS.

3.6 Prisotnost genov za karbapenemaze neposredno v vzorcih odpadne vode

V vseh 12 analiziranih vzorcih vhodne odpadne vode na vtoku v CČN so bile zaznane koncentracije vseh petih preučevanih genov za karbapenemaze. Med normaliziranimi koncentracijami sta prevladovali tarči *bla*OXA-48-like in *bla*VIM, katerih mediani sta znašali 6,36 oziroma 5,40 kopije na 10^6kopij gena 16S rRNA. Mediane tarč *bla*KPC, *bla*NDM in *bla*IMP so znašale 0,74, 0,55 oziroma 0,26 kopije na 10^6kopij 16S. Najvišje normalizirane koncentracije *bla*KPC, *bla*NDM, *bla*OXA-48-like, *bla*IMP in *bla*VIM so bile izmerjene marca 2026.

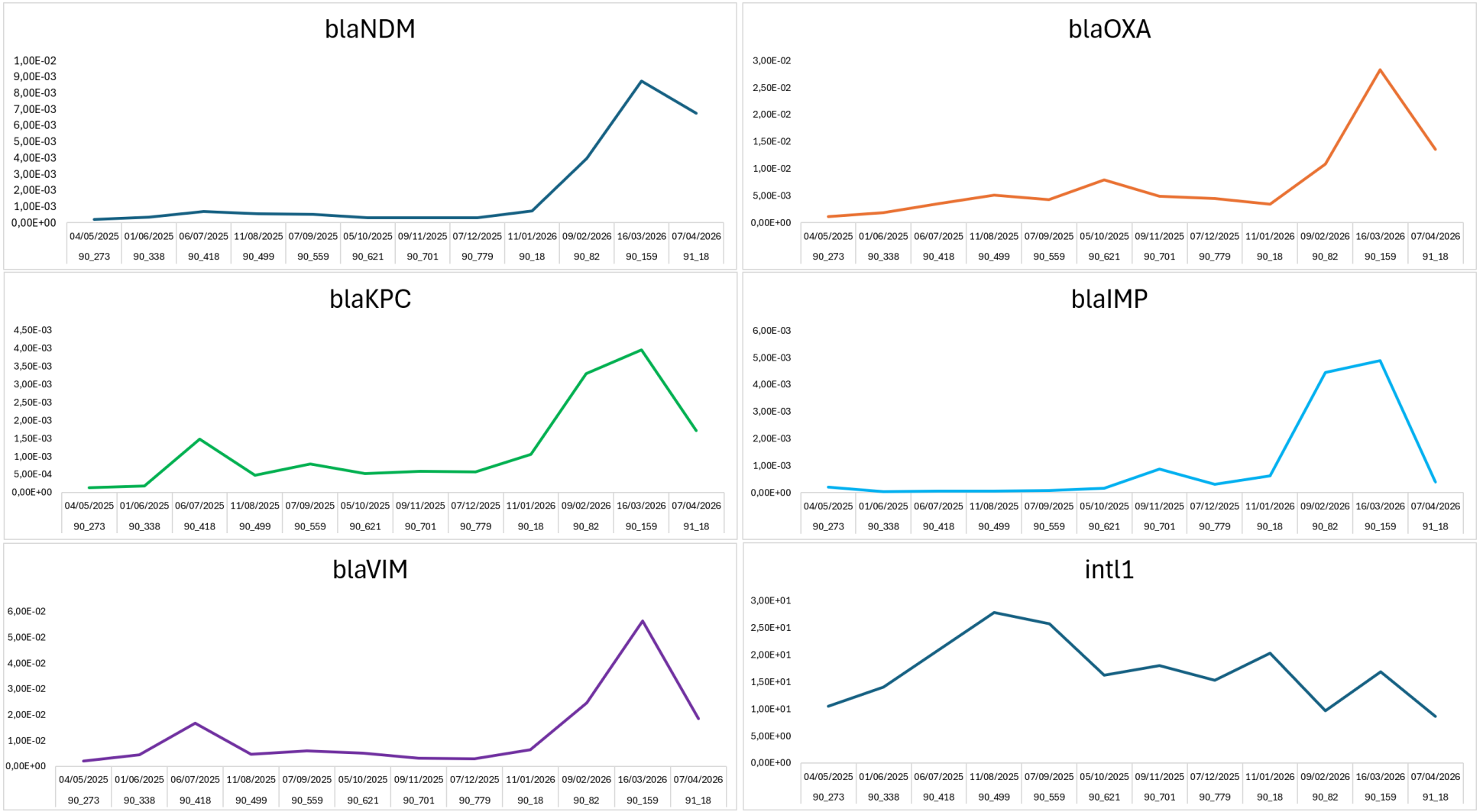
Koncentracija gena 16S rRNA je med vzorci variirala za približno 5,4-krat, pri čemer je bila najnižja vrednost izmerjena marca 2026. Ker je ta vzorec hkrati vseboval najvišje normalizirane koncentracije večine genov odpornosti, je povečanje razmerij deloma povezano z zmanjšanjem skupne bakterijske obremenitve.

Koncentracije preučevanih genov za karbapenemaze neposredno v odpadni vodi po mesecih so prikazane na Sliki 3, koncentracije posameznih genov pa so ločeno prikazane na Sliki 4.



	04/05/2025	01/06/2025	06/07/2025	11/08/2025	07/09/2025	05/10/2025	09/11/2025	07/12/2025	11/01/2026	09/02/2026	16/03/2026	07/04/2026
	90_273	90_338	90_418	90_499	90_559	90_621	90_701	90_779	90_18	90_82	90_159	91_18
OXA	1,08E-03	1,85E-03	3,54E-03	5,05E-03	4,21E-03	7,90E-03	4,91E-03	4,52E-03	3,37E-03	1,08E-02	2,83E-02	1,35E-02
VIM	2,12E-03	4,41E-03	1,67E-02	4,62E-03	6,03E-03	5,15E-03	3,19E-03	2,85E-03	6,32E-03	2,46E-02	5,63E-02	1,84E-02
NDM	1,96E-04	3,33E-04	6,93E-04	5,43E-04	5,36E-04	2,95E-04	3,26E-04	3,22E-04	7,28E-04	3,97E-03	8,75E-03	6,75E-03
KPC	1,30E-04	1,76E-04	1,47E-03	4,75E-04	7,92E-04	5,20E-04	5,90E-04	5,72E-04	1,06E-03	3,29E-03	3,95E-03	1,71E-03
IMP	2,11E-04	3,91E-05	4,51E-05	4,81E-05	6,87E-05	1,55E-04	8,81E-04	3,01E-04	6,24E-04	4,45E-03	4,88E-03	3,87E-04

Slika 3: Koncentracije genov za karbapenemaze neposredno v vzorcih odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.



Slika 4: Ločen prikaz koncentracij posameznih genov za mikrobno odpornost neposredno v vzorcih odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

3.7 Koncentracije izbranih antibiotikov v odpadni vodi

Koncentracije ertapenema, imipenema in meropenema v odpadni vodi so bile v celotnem obdobju pilotnega spremljanja pod mejo detekcije. Cefepim in ceftriakson pa smo v zaznavnih koncentracijah določili v vzorcih, odvzetih v obdobju od decembra 2025 do aprila 2026. Koncentracije cefepima in ceftriaksona so bile v območju <0,1 do 0,6 µg/L, rezultati posameznih vzorčenj so prikazani v Preglednici 7.

Preglednica 7: Koncentracije antibiotikov v vzorcih odpadne vode odvzetih mesečno na vtoku v Centralno čistilno napravo Ljubljana v obdobju od 01. 05. 2025 do 30. 04. 2026.

Vzorčenje številka	Datum vzorčenja	Protokolna številka	Cefepim (µg/L)	Ceftriakson (µg/L)	Ertapenem (µg/L)	Imipenem (µg/L)	Meropenem (µg/L)
1	04. 05. 2025	90_273	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
2	01. 06. 2025	90_338	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
3	06. 07. 2025	90_418	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
4	11. 08. 2025	90_499	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
5	07. 09. 2025	90_559	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
6	05. 10. 2025	90_621	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
7	09. 11. 2025	90_701	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1
8	07. 12. 2025	90_765	0,14	0,6	<0,1	<0,1	<0,1
9	11. 01. 2026	90_18	0,39	0,48	<0,1	<0,1	<0,1
10	09. 02. 2026	90_82	0,11	0,20	<0,1	<0,1	<0,1
11	16. 03. 2026	90_159	<0,1	0,38	<0,1	<0,1	<0,1
12	06. 04. 2026	90_206	<0,1	0,34	<0,1	<0,1	<0,1

Glede na določene vrednosti predvidene koncentracije brez učinka (angl. Predicted No-Effect Concentration, PNEC) za cefepim in ceftriakson, ugotavljamo, da za cefepim določene koncentracije (0,11–0,39 µg/L oziroma <0,1 µg/L; PNEC 0,50 µg/L) PNEC ni bil presežen v nobenem vzorcu. Za ceftriakson (PNEC 0,03 µg/L) smo v petih zaporednih vzorcih od decembra 2025 do aprila 2026 ugotovili kar 6,25–18,75-kratno vrednost PNEC. Slednje predstavlja potencialni selekcijski pritisk na mikrobno združbo, ocenjen na podlagi pristopa PNEC glede na selekcijo protimikrobne odpornosti (angl. Predicted No-Effect Concentration for Antimicrobial Resistance).

4. Razprava

Spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi se vse bolj uveljavlja kot dopolnilni pristop za spremljanje odpornosti bakterij proti antibiotikom in prisotnosti genov za mikrobno odpornost v populaciji [14]. Cilj pilotne raziskave v okviru CRP je bil razviti laboratorijske metode in jih uporabiti za pilotno enoletno sistematično spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, genov za karbapenemaze ter izbranih antibiotikov v vzorcih komunalne odpadne vode, odvzetih enkrat mesečno na vtoku v CČN Ljubljana. Z izvedbo pilotnega spremljanja smo tako opredelili metodološki pristop, laboratorijske metode ter pridobili dragocene izkušnje, pomembne za uvedbo rednega spremljanja mikrobne odpornosti proti karbapenemom v odpadni vodi v Sloveniji. 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 (prenovitev) [15], ki državam članicam od leta 2030 dalje nalaga obvezno spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi večjih aglomeracij. Pridobljeno znanje bi lahko služilo kot pomembna strokovna podlaga za prenos te evropske zakonodaje v nacionalni okvir. Rezultati te pilotne raziskave bi v prihodnje lahko predstavljali dopolnilo podatkom iz Evropskega centra za preprečevanje in obvladovanje bolezni (angl. European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) sistema EARS-Net (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network), v katerem Slovenija aktivno sodeluje in ki ostaja naš primarni ter osrednji in najpomembnejši sistem za spremljanje mikrobne odpornosti v državi [16].

V času pilotne raziskave je bilo odvzetih 12 zaporednih mesečnih vzorcev odpadne vode na vtoku v CČN Ljubljana. Pri analizah vzorcev smo uporabili metodo izolacije bakterij in določanje občutljivosti za antibiotike ter molekularne in genomske pristope. Do vrste smo identificirali 866 od 904 izbranih kolonij. Delež CRE je bil 38,4 % (112/292), med 221 izolati rodu *Pseudomonas* pa jih je bilo 35 (15,8 %) odpornih proti imipenemu in/ali meropenemu. Pri 287 izolatih smo s PCR dokazali gene, ki kodirajo karbapenemaze skupin *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*NDM in/ali *bla*VIM, pri 52 izolatih pa je bilo hkrati prisotnih več preučevanih genov. Sekvenciranih je bilo 54 izolatov, pri čemer so se rezultati PCR in WGS ujemali pri 94,0 % izolatov; z WGS sta bila dodatno zaznana tudi gena, ki kodirata karbapenemazi *bla*GES-14 in *cphA-7.* Hkrati smo v vseh odvzetih vzorcih preučevali tudi prisotnost izbranih antibiotikov: cefepima, ceftriaksona, ertapenema, imipenema in meropenema.

Neposredna primerjava oziroma interpretacija rezultatov spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi z rezultati spremljanja v humani medicini je omejena zaradi razlik v metodologiji, namenu spremljanja in naboru bakterij, ki jih posamezna sistema spremljanja vključujeta oziroma zaznavata. Kljub temu je mogoče v rezultatih iz obeh sistemov spremljanja prepoznati posamezne vzporednice. Po podatkih mreže EARS-Net (podatki o invazivnih izolatih) in Slovenskega anonimnega CPE sledilnika v Sloveniji (podatki o kliničnih in nadzornih izolatih enterobakterij, ki izločajo karbapenemaze (angl. Carbapenemase-Producing Enterobacterales, CPE) / enterobakterij, ki so odporne proti karbapenemom in izločajo karbapenemaze (angl. Carbapenem-Resistant Enterobacterales that Produce Carbapenemases, CRE-CPE) med CPE / CRE-CPE prevladujejo karbapenemaze iz skupine OXA-48 ter kombinacija karbapenemaz OXA-48 in NDM [16,17]. Podobnost z rezultati humanega spremljanja smo zaznali predvsem pri karbapenemazah skupine OXA-48. Pri bakterijskih izolatih iz odpadne vode je bil med preučevanimi geni za karbapenemaze, najpogosteje zaznan gen *bla*OXA-48-like, neposredno v vzorcih odpadne vode pa je bila tarča *bla*OXA-48-like med tarčami z najvišjimi normaliziranimi koncentracijami. To bi lahko nakazovalo na posamezne vzporednice med trendi v humani medicini ter širšim genskim bremenom v okolju. Pri posameznih bakterijskih izolatih iz odpadne vode smo zaznali tudi sočasno prisotnost več genov za karbapenemaze, najpogosteje kombinacijo *bla*OXA-48-like in *bla*VIM ter kombinacijo *bla*OXA-48-like in *bla*NDM. Tudi v humani medicini je bila opisana sočasna prisotnost več karbapenemaz pri posameznih izolatih, med drugim kombinacije OXA-48 in NDM tako pri invazivnih izolatih *K. pneumoniae* kot tudi nasploh med kliničnimi

in nadzornimi izolati, kjer je po podatkih Slovenskega anonimnega CPE sledilnika takšnih preko 40 % izolatov *K. pneumoniae* [16–18].

V Sloveniji sicer delež CPE / CRE-CPE v kliničnih kužninah narašča, pri *E. coli* CPE / CRE-CPE ostaja nizek, delež *K. pneumoniae* CPE / CRE-CPE pa je že dosegel 2,7 %; posebej zaskrbljujoč pa je večji rezervoar koloniziranih pacientov, saj CPE / CRE-CPE pri več kot 60 % pacientov najdemo samo v nadzornih kužninah. Breme pacientov z okužbo ali kolonizacijo z *E. coli* CPE / CRE-CPE se bistveno povečuje in je poraslo od 0,5/100.000 prebivalcev v 2017 na 10,7/100.000 prebivalcev v 2025. Pri *E. coli* CPE / CRE-CPE so v letu 2025 prevladovale karbapenemaze iz družine OXA-48 (74,2 %), delež izolatov z metalokarbapenemazami je znašal 25,8 %. Breme pacientov z okužbo ali kolonizacijo s *K. pneumoniae* CPE / CRE-CPE se še bolj povečuje in je poraslo od 0,8/100.000 prebivalcev v 2017 na 22,5/100.000 prebivalcev v 2025. Pri *K. pneumoniae* CPE / CRE-CPE so v letu 2025 prevladovale metalokarbapenemaze samostojno ali v kombinaciji (60,9 %), delež izolatov s serinskimi karbapenemazami je znašal 38,9 % [19].

Pri primerjavi rezultatov spremljanja izbranih antibiotikov v odpadni vodi, ki smo ga izvedli v sklopu naše pilotne raziskave, z rezultati iz sistema rutinskega spremljanja porabe antibiotikov v Sloveniji je treba upoštevati, da se časovno obdobje pilotnega spremljanja in obdobje zadnjega dostopnega poročila o porabi protimikrobnih zdravil [20] ne ujemata v celoti. Koncentracije spremljanih karbapenemov ertapenema, imipenema in meropenema so bile v odpadni vodi v celotnem obdobju spremljanja pod mejo detekcije, medtem ko sta bila cefalosporina cefepim in ceftriakson v zaznavnih koncentracijah prisotna od decembra 2025 do aprila 2026. V naši pilotni raziskavi smo najvišje normalizirane koncentracije preučevanih genovza karbapenemaze, zaznali marca 2026. Obdobje od januarja do marca sovpada z delom leta, za katerega je značilna povečana poraba antibiotikov zaradi sezonskega širjenja povzročiteljev respiratornih okužb [21]. V raziskavi [22], ki je temeljila na podatkih NIJZ o porabi zdravil, izdanih na recept v Sloveniji, so bili podobni sezonski trendi ugotovljeni pri predpisovanju protimikrobnih zdravil na recept, posebej pri betalaktamskih antibiotikih skupine J01C. Povečana poraba antibiotikov v tem obdobju je lahko deloma povezana tudi z neustreznim predpisovanjem [21–24]. Čeprav na podlagi razpoložljivih podatkov neposredne vzročne povezave med povečano porabo antibiotikov in višjimi koncentracijami genovza karbapenemaze, v odpadni vodi ni mogoče dokazati, to podpira potrebo po nadaljnjem preučevanju povezav med porabo antibiotikov, njihovimi ostanki v odpadni vodi in pojavljanjem genov za odpornost.

Metode za spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi so v razvoju in trenutno še ni strokovno dogovorjenega in mednarodno sprejetega standarda [25]. Zato je pri interpretaciji in primerjavi rezultatov iz različnih sistemov spremljanja in raziskav proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi pomembno upoštevati predvsem raziskave, v katerih so bili uporabljeni enaki oziroma čim bolj primerljivi postopki vzorčenja, kultivacije in laboratorijske analize. Chau in sod. [3] so v sistematičnem pregledu raziskav spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi ugotovili precejšnjo heterogenost uporabljenih metodoloških pristopov in nedosledno poročanje ključnih značilnosti raziskav ter poudarili potrebo po nadaljnjih raziskavah in jasnem ter doslednem poročanju metod. Z namenom pilotnega spremljanja mikrobne odpornosti proti karbapenemom v odpadni vodi smo v naši pilotni raziskavi uporabili dve različni kromogeni gojišči, ter izbrane bakterijske kolonije identificirali z metodo MALDI-TOF MS ter jim določili občutljivost za antibiotike z metodo disk difuzije. Pri izbranih izolatih smo izvedli tudi sekvenciranje celotnih genomov ter rezultate primerjali z rezultati PCR za določanje genovza karbapenemaze, in sicer *bla*IMP, *bla*KPC, *bla*OXA-48-like, *bla*NDM in *bla*VIM. Neposredno v vzorcih odpadne vode smo prisotnost navedenih genov določali z dPCR. Poleg genov za mikrobno odpornost smo z dPCR določali tudi koncentracijo gena za bakterijsko 16S rRNA kot približek skupne bakterijske obremenitve ter gena *intI1*, ki se uporablja kot kazalnik antropogenega onesnaženja in potenciala za horizontalni prenos genov mikrobne odpornosti.

Med izolati so prevladovale bakterije iz reda Enterobacterales, sledila sta rodova *Aeromonas* in *Pseudomonas*. Drugi rodovi bakterij so bili zastopani le v manjšem deležu (manj kot 1 %). Podobno so v portugalski raziskavi [26] pri analizi proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi pogosto zaznali predstavnike rodov *Pseudomonas* in *Aeromonas*. Raziskava je pokazala tudi, da je pri bakterijah, ki so primarno prisotne v okolju, odpornost lahko posledica njihovih naravnih mehanizmov odpornosti in ne nujno pridobljenih genov odpornosti.

V naši pilotni raziskavi smo med geni, ki kodirajo karbapenemaze, v odpadni vodi najpogosteje zaznali *bla*OXA-48-like in *bla*VIM. Podobne raziskave so bile izvedene tudi v nekaterih drugih evropskih državah. V španski raziskavi [27] so gene, ki kodirajo karbapenemaze, dokazali pri 252 od 265 analiziranih izolatov iz odpadne vode, pri čemer je bil najpogosteje zaznan *bla*KPC (165/265; 62,3 %), medtem ko je bil *bla*OXA-48 zaznan pri 14/265 (5,6 %) izolatih. V finski raziskavi [28] so pri izolatih *E. coli* in *K. pneumoniae* iz neobdelane komunalne odpadne vode prevladovale karbapenemaze družine KPC, zaznali pa so tudi NDM-5, OXA-48 in OXA-181. Takšne ugotovitve podpirajo uporabnost odpadne vode za spremljanje pojavljanja teh bakterij na ravni populacije. V avstrijski raziskavi [29] so pri proti karbapenemom odpornih enterobakterijah iz odpadne vode dokazali KPC-2 oziroma OXA-48. V švicarski raziskavi [30] so med 49 enterobakterijami iz odpadne vode, ki so proizvajale karbapenemaze, prevladovali izolati z OXA-48, medtem ko so bili izolati z NDM in VIM zaznani sporadično. V isti raziskavi so ugotovili tudi večjo pojavnost enterobakterij, ki proizvajajo karbapenemazev primeru dotoka bolnišnične odpadne vode v kanalizacijski sistem. Rezultati navedenih raziskav odpadne vode v Španiji, na Finskem, v Avstriji in Švici kažejo, da se spekter zaznanih karbapenemaz med geografskimi območji razlikuje. Karbapenemaze tipa KPC so globalno razširjene in sodijo med najpogostejše prenosljive karbapenemaze pri bakterijah reda Enterobacterales [31]. Podatki iz vira [31] se nanašajo predvsem na epidemiologijo karbapenemaz pri kliničnih izolatih in ne specifično na izolate iz odpadne vode. Kljub temu je več raziskav poročalo o večji prevalenci genov *bla*OXA, predvsem med kliničnimi izolati [32–34].

Rezultati naše pilotne raziskave kažejo, da so bile najvišje normalizirane koncentracije tarč *bla*KPC, *bla*NDM, *bla*OXA-48-like, *bla*IMP in *bla*VIM izmerjene v vzorcu, odvzetem marca 2026. Ker je bila v istem vzorcu izmerjena tudi najnižja koncentracija gena 16S rRNA, je bilo povečanje normaliziranih vrednosti deloma povezano z nižjo skupno bakterijsko obremenitvijo. Neposredna primerjava koncentracij z rezultati navedenih raziskav ni mogoča, saj v njih niso uporabljali primerljivega neposrednega kvantitativnega določanja genov v odpadni vodi.

5. Zaključek

V okviru pilotnega epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi smo izvedli 12 zaporednih mesečnih vzorčenj na vtoku CČN Ljubljana. Razvili in preizkusili smo nove metodološke pristope, vzpostavili temelje za redno epidemiološko spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi ter pridobili izkušnje, pomembne za nadaljnji razvoj in raziskovanje tega področja.

Z rezultati naše raziskave smo potrdili prisotnost proti karbapenemom odpornih bakterij in genov za karbapenemaze v odpadni vodi v Osrednjeslovenskiregiji, pri čemer sta med preučevanimi tarčami prevladovala *bla*OXA-48-like in *bla*VIM. Vrednost PNEC za ceftriakson je bila presežena v petih zaporednih vzorcih, kar kaže na potencialni selekcijski pritisk na mikrobno združbo v odpadni vodi. Pilotna raziskava tako predstavlja tudi osnovo za nadaljnjo standardizacijo in razvoj analitičnih metod na področju spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi.

6. Reference

[1] World Health Organization. *Global action plan on antimicrobial resistance*. World Health Organization, 2015. Dostopno na: https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763 (12. 10. 2026).

[2] 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).

[3] 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.

[4] 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.

[5] Galičič, A.; Rožanec, J.; Kranjec, N.; Šubelj, V.; Steyer, A.; Cerar Kišek, T.; Koritnik, T.; Jurša, T. *Načrt epidemiološkega spremljanja poliovirusov v odpadni vodi v Sloveniji*. Nacionalni inštitu za javno zdravje, 2025. Dostopno na: https://nijz.si/nalezljive-bolezni/epidemiolosko-spremljanje-poliovirusov-odpadne-vode/ (29. 05. 2026).

[6] Galičič, A.; Kranjec, N.; Steyer, A.; Cerar Kišek, T.; Koritnik, T.; Janko, T.; Vedlin, V. *Načrt epidemiološkega spremljanja SARS-CoV-2 v odpadnih vodah v Sloveniji*. Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2023. Dostopno na: https://nijz.si/wp-content/uploads/2024/01/Nacrt-spremljanja-SARS-CoV-2-v-odpadnih-vodah_izdaja-1_splet.pdf (12. 10. 2026).

[7] Rožanec, J.; Kranjec, N.; Obid, I.; Steyer, A.; Cerar Kišek, T.; Koritnik, T.; Fafangel, M.; Galičič, A. Wastewater surveillance of mpox during the summer season of 2023 in Slovenia. *Infect Dis Rep* **2024**, *16* (5), 836-845, doi: 10.3390/idr16050065.

[8] 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).

[9] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Publication of updated clinical breakpoint tables, version 16.1. Dostopno na: https://www.eucast.org/news-detail/publication-of-updated-clinical-breakpoint-tables-version-161/ (21. 09. 2026).

[10] Hilt, E.E.; Fitzwater, S.P.; Ward, K.; de St. Maurice, A.; Chandrasekaran, S.; Garner, O.B.; Yang, S. Carbapenem resistant *Aeromonas hydrophila* carrying *bla*cphA7 Isolated from two solid organ transplant patients. *Front Cell Infect Microbiol* **2020**, *10*, 563482, doi: 10.3389/fcimb.2020.563482.

[11] Drk, S.; Puljko, A.; Dželalija, M.; Udiković-Kolić, N. Characterization of third generation cephalosporin- and carbapenem-resistant *Aeromonas* isolates from municipal and hospital wastewater. *Antibiotics* **2023**, *12* (3), 513, doi: 10.3390/antibiotics12030513.

[12] Bonnin, R.A.; Nordmann, P.; Potron, A.; Lecuyer, H.; Zahar, J.R.; Poirel, L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **2011**, *55* (1), 349-354, doi: 10.1128/AAC.00773-10.

[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] 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).

[15] 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.

[16] Ribič, H.; Glavan, U.; Rojnik, A.; Juder Kogler, M.; Simonović, Z.; EARS-Net Slovenija. *Odpornost proti antibiotikom pri povzročiteljih invazivnih okužb v Sloveniji v letu 2024*. Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2026. Dostopno na: https://nijz.si/publikacije/odpornost-proti-antibiotikom-pri-povzrociteljih-invazivnih-okuzb-v-sloveniji-v-letu-2024/ (21. 09. 2026).

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

[18] Ribič, H.; Glavan, U.; Pirš, M.; Simonović, Z.; Golle, A.; Mozetič, M.; Klavs, I.; EARS-Net Slovenija*. Odpornost proti antibiotikom pri povzročiteljih invazivnih okužb v Sloveniji v letu 2023*. Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2025. Dostopno na: https://nijz.si/publikacije/odpornost-proti-antibiotikom-pri-povzrociteljih-invazivnih-okuzb-v-sloveniji-v-letu-2023/ (21. 09. 2026).

[19] Pirš, M.; Ribič, H.; Štrumbelj, I.; Zdolšek, B.; Kavka, D.; Juriševič Dodič, A.; Berce, A.; Bombek, I.; Golle, M.; Slobodnik Kavčič, A.; et al. Trendi antimikrobne občutljivosti v Sloveniji. In Infektološki simpozij 2026; Sodobna infektologija: protimikrobna odpornost, napredna diagnostika, porajajoči mikrobi in okužbe, povezane z zdravstvom; Sekcija za protimikrobno zdravljenje pri Slovenskem zdravniškem društvu: Ljubljana, Slovenija, 2025; pp 8-24.

[20] Kostnapfel, T.; Simonovič, Z.; Juder Kogler, M.; Vidovič, Š. *Poraba protimikrobnih zdravil v Sloveniji v letu 2024*. Nacionalni inštitut za javno zdravje, 2025. Dostopno na: https://nijz.si/publikacije/poraba-protimikrobnih-zdravil-v-sloveniji-v-letu-2024/ (21. 09. 2026).

[21] Drobnič, E.; Mozetič, M.; Rožanec, J.; Mikuž, A.; Kranjec, N.; Trop Skaza, A.; Učakar, V.; Galičič, A. Epidemiološko spremljanje na karbapeneme odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji: pregled literature. In *Zbornik recenziranih prispevkov in povzetkov: Javno zdravje – most do boljšega zdravja in odpornosti v skupnosti*; Nacionalni inštitut za javno zdravje: Ljubljana, Slovenija, 2025; pp 267.

[22] Juder Kogler, M.; Vidovič, Š.; Mozetič, M.; Glavan, U.; Korošec, A.; Kostnapfel, T.; Šubelj, M.; Simonović, Z. Trendi pojavljanja odpornosti mikrobov proti protimikrobnim zdravilom pri izolatih iz hemokultur in likvorjev v povezavi s porabo protimikrobnih zdravil v Sloveniji v obdobju od 2014 do 2023. In *Zbornik recenziranih prispevkov in povzetkov: Javno zdravje – most do boljšega zdravja in odpornosti v skupnosti*; Nacionalni inštitut za javno zdravje: Ljubljana, Slovenija, 2025; pp 162.

[23] Cheysson, F.; Brun-Buisson, C.; Opatowski, L.; Le Fouler, L.; Caserio-Schönemann, C.; Pontais, I.; Guillemot, D.; Watier, L. Outpatient antibiotic use attributable to viral acute lower respiratory tract infections during the cold season in France, 2010-2017. *Int J Antimicrob Agents* **2021**, *57* (6), 106339, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106339.

[24] Yaacoub, S.; Lanoy, E.; Hider-Mlynarz, K.; Saleh, N.; Maison, P. Trend of antibiotic consumption and its association with influenza-like illnesses in France between 2004 and 2018. *Eur J* Public *Health* **2021**, *31* (6), 1137-1143, doi: 10.1093/eurpub/ckab143.

[25] Milligan, E.G.; Calarco, J.; Davis, B.C.; Keenum, I.M.; Liguori, K.; Pruden, A.; Harwood, V.J. A systematic review of culture-based methods for monitoring antibiotic-resistant

Acinetobacter, *Aeromonas*, and *Pseudomonas* as environmentally relevant pathogens in wastewater and surface water. *Curr Environ Health Rep* **2023**, *10* (2), 154-171, doi: 10.1007/s40572-023-00393-9.

[26] Oliveira, M.; Leonardo, I.C.; Nunes, M.; Silva, A.F.; Barreto Crespo, M.T. Environmental and pathogenic carbapenem resistant bacteria isolated from a wastewater treatment plant harbour distinct antibiotic resistance mechanisms. *Antibiotics* **2021**, *10* (9), 1118, doi: 10.3390/antibiotics10091118.

[27] Nasser-Ali, M.; Aja-Macaya, P.; Conde-Pérez, K.; Trigo-Tasende, N.; Rumbo-Feal, S.; Fernández-González, A.; Bou, G.; Poza, M.; Vallejo, J.A. Emergence of carbapenemase genes in gram-negative bacteria isolated from the wastewater treatment plant in a Coruña, Spain. *Antibiot* **2024**, *13* (2), 194, doi: 10.3390/antibiotics13020194.

[28] Heljanko, V.; Tyni, O.; Johansson, V.; Virtanen, J.P.; Räisänen, K.; Lehto, K.M.; Lipponen, A.; Oikarinen, S.; Pitkänen, T.; WastPan study group; et al. Clinically relevant sequence types of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* detected in Finnish wastewater in 2021-2022. *Antimicrob Resist Infect Control* **2024**, *13* (1), 14, doi: 10.1186/s13756-024-01370-z.

[29] Galler, H.; Feierl, G.; Petternel, C.; Reinthaler, F.F.; Haas, D.; Grisold, A.J.; Luxner, J.; Zarfel, G. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harbouring *Enterobacteriaceae* detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect* **2014**, *20* (2), 132-134, doi: 10.1111/1469-0691.12336.

[30] Zurfluh, K.; Bagutti, C.; Brodmann, P.; Alt, M.; Schulze, J.; Fanning, S.; Stephan, R.; Nüesch-Inderbinen, M. Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing *Enterobacteriaceae*. *Int J Antimicrob Agents* **2017**, *50* (3), 436-440, doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.04.017.

[31] Logan, L.K.; Weinstein, R.A. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. *J Infect Dis* **2017**, *215* (Suppl 1), S28-S36, doi: 10.1093/infdis/jiw282.

[32] Cañada-García, J.E.; Moure, Z.; Sola-Campoy, P.J.; Delgado-Valverde, M.; Cano, M.E.; Gijón, D.; González, M.; Gracia-Ahufinger, I.; Larrosa, N.; Mulet, X.; et al. CARB-ES-19 multicenter study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from all Spanish provinces reveals interregional spread of high-risk clones such as ST307/OXA-48 and ST512/KPC-3. *Front Microbiol* **2022**, *13*, 918362, doi: 10.3389/fmicb.2022.918362.

[33] Oteo, J.; Ortega, A.; Bartolomé, R.; Bou, G.; Conejo, C.; Fernández-Martínez, M.; González-López, J.J.; Martínez-García, L.; Martínez-Martínez, L.; Merino, M.; et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* **2015**, *59* (6), 3406-3412, doi: 10.1128/AAC.00086-15.

[34] Grundmann, H.; Glasner, C.; Albiger, B.; Aanensen, D.M.; Tomlinson, C.T.; Andrasević, A.T.; Cantón, R.; Carmeli, Y.; Friedrich, A.W.; Giske, C.G.; et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* **2017**, *17* (2), 153-163, doi: 10.1016/S1473-3099(16)30257-2.