

STROKOVNE PODLAGE ZA VZPOSTAVITEV EPIDEMIOLOŠKEGA SPREMLJANJA PROTI KARBAPENEMOM ODPORNIH BAKTERIJ V ODPADNI VODI V SLOVENIJI

NIJZ Nacionalni inštitut za javno zdravje

NACIONALNI LABORATORIJ ZA ZDRAVJE, OKOLJE IN HRANO

Strokovne podlage za vzpostavitev epidemiološkega spremljanja proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi v Sloveniji

Avtorji

Nacionalni inštitut za javno zdravje

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

Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano

doc. dr. Andrej Steyer, univ. dipl. mikr.
Tom Koritnik, prof. biol.

Oblikovanje naslovnice | Tadeja Horvat

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

Kraj in leto izdaje | Ljubljana, 2025

Elektronska izdaja

Spletni naslov | www.nijz.si

Besedilo ni lektorirano.

Zaščita dokumenta | © 2025 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.

Povzetek

Odpornost mikrobov proti protimikrobnim zdravilom predstavlja eno največjih groženj javnemu zdravju. Spremljanje bakterij, odpornih proti antibiotikom, v odpadni vodi je pomembno orodje za ocenjevanje njihove prisotnosti in širjenja v populaciji. Odpadna voda omogoča vpogled v prisotnost odpornih bakterij in genov za odpornost proti antibiotikom ter lahko služi kot pomemben sistem zgodnjega opozarjanja pri spremljanju širjenja mikrobne odpornosti. V sistematični pregled literature smo vključili raziskave, ki so obravnavale bakterije, odporne proti karbapenemom, ter bakterije, ki proizvajajo karbapenemaze in so bile odvzete na vtoku v komunalno čistilno napravo (KČN). Iskanje literature smo izvedli v podatkovni bazi PubMed. Od skupno 1055 zadetkov je bilo v kvalitativno analizo vključenih 58 raziskav. Raziskave so se razlikovale glede na preučevane bakterijske vrste, fazo vzorca, metode vzorčenja in laboratorijske pristope. Najpogosteje so bile preučevane enterobakterije, sledili so *Acinetobacter* spp. in *Pseudomonas s*pp., pri čemer so raziskave najpogosteje uporabljale tekočo fazo vzorca ali kombinacijo tekoče in trdne faze. Laboratorijski pristopi so večinoma temeljili na kultivaciji bakterij, pogosto dopolnjeni z molekularnimi metodami, kot so PCR, sekvenciranje celotnega genoma (WGS) in MALDI-TOF masna spektrometrija. Ugotovitve poudarjajo pomen spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom v odpadni vodi v okviru pristopa »Eno zdravje« ter potrebo po vzpostavitvi rednega sistema spremljanja in izboljšanju postopkov čiščenja odpadne vode. Namen dokumenta je pripraviti strokovne podlage za vzpostavitev epidemiološkega spremljanja bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi v Sloveniji ter prispevati k razvoju metodološko usklajenega pristopa spremljanja tega področja.

Abstract

Antimicrobial resistance represents one of the greatest threats to public health. Monitoring antibiotic-resistant bacteria in wastewater is an important tool for assessing their presence and spread within the population. Wastewater provides insight into the occurrence of resistant bacteria and antimicrobial resistance genes and may serve as an important early warning system for monitoring the spread of antimicrobial resistance. The systematic literature review included studies investigating carbapenem-resistant bacteria and carbapenemase-producing bacteria in wastewater samples collected from the influent of municipal wastewater treatment plants (WWTPs). The literature search was conducted in the PubMed database. Of the total 1,055 records identified, 58 studies were included in the qualitative analysis. The studies varied in terms of investigated bacterial species, sample phase, sampling methods, and laboratory approaches. Enterobacterales were the most frequently investigated group, followed by *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp., while liquid sample phase or a combination of liquid and solid phases were most commonly used. Laboratory approaches were predominantly based on bacterial cultivation and were frequently complemented by molecular methods such as PCR, whole genome sequencing (WGS), and MALDI-TOF mass spectrometry. The findings highlight the importance of monitoring antibiotic-resistant bacteria in wastewater within the »One Health« framework and emphasize the need for establishing regular surveillance systems and improving wastewater treatment processes. The purpose of this document is to provide professional groundwork for establishing epidemiological surveillance of carbapenem-resistant bacteria in wastewater in Slovenia and to contribute to the development of a methodologically harmonized monitoring approach in this field.

KAZALO

1. Uvod ... 1

2. Epidemiološko spremljanje različnih parametrov v odpadni vodi ... 2

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

4. Mikrobna odpornost in bakterije, odporne proti karbapenemom v Sloveniji ... 6

5. Spremljanje odpornosti bakterij na antibiotike v odpadni vodi ... 7

5.1 Povzročitelji in odpornost proti karbapenemom ... 7

5.2 Količina zbranega vzorca za analizo ... 8

5.3 Države ... 9

5.4 Obdobje spremljanja ... 9

5.5 Lokacija vzorčenja ... 11

5.6 Število vzorčnih mest ... 11

5.7 Pogostost vzorčenja ... 12

5.8 Faza vzorca in metode vzorčenja ... 13

5.9 Izsledki raziskav in predlagani javnozdravstevni ukrepi ... 15

5.10 Izvedba kultivacije in metoda detekcije bakterij ... 16

5.11 Metoda koncentriranja ... 18

5.12 Meja zaznavnosti (LOD) ... 19

6. Zaključek ... 20

7. Reference ... 21

8. Priloge ... 27

8.1 Metode dela ... 27

8.2 Analiza podatkov ... 29

Uporabljene kratice

16S sequencing	določanje nukleotidnega zaporedja gena za 16S ribosomsko RNA, ki se uporablja za identifikacijo bakterij
Amicon 100Kda	ultrafiltracijski centrifugalni filter
CRE	enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom (angl. Carbapenem-resistant Enterobacterales)
CRG	geni za odpornost proti karbapenemom (angl. Carbapenem Resistance Genes)
CRP	ciljani raziskovalni projekt
EARS-Net	Mednarodna mreža nacionalnih sistemov spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom v Evropi (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network)
ESKAPE	bakterije iz skupine: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in vrste iz rodu *Enterobacter*
KČN	komunalna čistilna naprava
LOD	meja zaznavnosti (angl. Limit of Detection)
MALDI – TOF	masna spektrometrija (angl. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight)
MGE	mobilni genetski elementi (angl. Mobile Genetic Elements)
MRSA	na meticilin odporen *Staphylococcus aureus* (angl. Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus)
NIJZ	Nacionalni inštitut za javno zdravje
NLZOH	Nacionalni laboratorij za zdravje, okolje in hrano
One Health	Eno zdravje
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo (angl. Quantitative Polymerase Chain Reaction)
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
WGS	sekvenciranje celotnega genoma (angl. Whole Genome Sequencing)

1. Uvod

Odpornost mikrobov proti protimikrobnim zdravilom predstavlja eno največjih groženj javnemu zdravju, Svetovna zdravstvena organizacija (SZO) jo uvršča med deset največjih groženj globalnemu zdravju (*SZO, 2019*), saj lahko povzroči, da se okužbe, ki jih povzročajo odporni mikrobi, ne odzovejo na zdravljenje. Odpadna voda se je izkazala kot pomemben vir za spremljanje odpornosti mikrobov, saj vsebuje širok spekter mikroorganizmov iz človeške populacije in omogoča vpogled v prevalenco odpornosti mikrobov v splošni populaciji ter omogoči zgodnje prepoznavanje novih sevov odpornih mikrobov, ki se lahko širijo med ljudmi (Chau et al., 2022).

SZO in Priporočilo sveta o krepitvi ukrepov Evropske Unije v boju proti odpornosti mikrobov proti protimikrobnim zdravilom v okviru pristopa »Eno zdravje« (One Health) (2023/C 220/01) poudarjata, da je potrebna obravnava tega področja z interdisciplinarnim pristopom, hkrati pa naj bi bilo njegovo obvladovanje med prvimi prioritetami vsake države članice (Gholipour et al., 2024).

Karbapenemi so ena izmed najpomembnejših skupin antibiotikov, ki se uporabljajo za zdravljenje hudih in vztrajnih okužb, povzročenih z večkratno odpornimi bakterijami. Pojav odpornosti proti tem antibiotikom ima zelo resne posledice za javno zdravje. Pri klinično pomembnih Gram-negativnih bakterijah je odpornost proti karbapenemom predvsem posledica proizvodnje encimov, imenovanih karbapenemaze, ki razgrajujejo te antibiotike in jih inaktivirajo ali hidrolizirajo (Oliveira et al., 2020). Med ključne dejavnike, ki vplivajo na razvoj bakterij, odpornih proti antibiotikom sodi njihova pretirana oziroma nepravilna uporaba, pomanjkljiv razvoj novih antibiotikov, uporaba antibiotikov v veterini in kmetijstvu ter pomanjkanje učinkovitih nacionalnih politik in sistemov spremljanja, ki nudijo poglobljeno osnovo za informirano ukrepanje (Salam et al., 2023).

Pilotno epidemiološko spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi v Sloveniji je ciljani raziskovalni projekt (CRP), katerega cilj je razviti in preizkusiti pristop za spremljanje odpornosti bakterij v vzorcih iz okolja – odpadni vodi. Projekt temelji na vse bolj prepoznani potrebi po uvedbi celostnega pristopa »Eno zdravje« pri obvladovanju širjenja mikrobne odpornosti, ki vključuje tako klinične kot okoljske vire (NIJZ, 2024).

V nadaljevanju tega dokumenta sledijo strokovna izhodišča in analiza sistematičnega pregleda literature, ki omogoča vpogled v obstoječe metodološke pristope spremljanja bakterij, odpornih proti karbapenemom v odpadni vodi.

2. Epidemiološko spremljanje različnih parametrov v odpadni vodi

Epidemiološko spremljanje različnih parametrov v odpadni vodi je relativno nov, a učinkovit pristop k epidemiološkemu spremljanju povzročiteljev nalezljivih bolezni. V odpadni vodi lahko spremljamo številne združbe mikroorganizmov in parazitov (Galičič et al., 2023). Predstavlja orodje, ki se uporablja za pridobivanje informacij o zdravstvenem stanju populacije na podlagi izločkov te populacije v odpadni vodi (O'Keeffe, 2021). Namen vzpostavitve epidemiološkega spremljanja povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadni vodi v Sloveniji je razvoj epidemiološko in javnozdravsteno utemeljenega komplementarnega sistema spremljanja, ki bo omogočal rutinsko spremljanje relevantnih povzročiteljev nalezljivih bolezni in zagotavljal informacije za učinkovito odzivanje ob tveganjih širjenja teh povzročiteljev (Galičič et al., 2023).

Epidemiološko spremljanje določenega biološkega ali kemičnega parametra v odpadni vodi ocenjuje prisotnost oziroma količino tega parametra v vzorcu odpadne vode, odvzetega iz kanalizacijskega omrežja ali komunalne čistilne naprave (KČN), z namenom pridobitve informacij o različnih vidikih javnega zdravja populacije. Epidemiološko spremljanje povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadni vodi, lahko predstavlja prednost pri spremljanju razširjenosti le- teh v določeni populaciji, posebej pri povzročiteljih, ki povzročajo velik delež asimptomatskih okužb ali kadar je testiranje okuženih in zbolelih v populaciji omejeno. Testiranje vzorcev odpadne vode je prav tako manj invazivno in zagotavlja anonimnost, kot testiranje okuženih ali zbolelih posameznikov. To lahko odpravi nekatere ovire pri pridobivanju natančnih podatkov, zaradi strahu pred stigmatizacijo, na katere naletimo pri običajnih raziskavah (O'Keeffe, 2021). Sistem premljanja za javno zdravje pomembnih parametrov v odpadni vodi prinaša številne prednosti v primerjavi s testiranjem posameznikov, med katerimi so najbolj opazne: 1) nizki stroški testiranja na prebivalca vključenega v sistem spremljanja, 2) široka prostorska pokritost sistema, 3) minimalne zahteve glede diagnostične opreme in 4) možnost zgodnjega odkrivanja nevarnosti še pred pojavom bolezni. Ob tem je pomembno opozoriti na potencial spremljanja mikrobov v odpadni vodi kot sistema zgodnjega opozarjanja in orodja za podporo odločanju pri obvladovanju mikrobne odpornosti (Gholipour et al., 2023).

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 zunaj kliničnega okolja, zlasti spremljanje komunalne odpadne vode. Le- ta vsebuje izločke in odpadne produkte, ki izvirajo iz celotne populacije določenega območja (Teban-Man et al., 2022).

Širjenje mikrobne odpornosti predstavlja veliko grožnjo svetovnemu zdravju, saj omejuje možnost zdravljenja okužb. Odpadna voda je ena od glavnih virov, po kateri protimikrobna sredstva in odporni mikroorganizmi pridejo v okolje. Testiranje odpadne vode na prisotnost in raznolikost genov za odpornost na različna zdravila tako lahko poda podatke, o tem kje in v kolikšni meri se ti mikrobi sproščajo v okolje. Višje ravni odpornosti preučevanih mikrobov so bile ugotovljene v odpadni vodi, kjer so zaznali tudi višje koncentracije protimikrobnih zdravil (npr. bolnišnične odpadne vode v primerjavi s komunalnimi). Z nadaljnjim preučevanjem in s tem boljšim razumevanjem teh povezav lahko pridobimo informacije o tem, kam učinkoviteje usmeriti javnozdravstvene ukrepe (O'Keeffe, 2021).

3. Mikrobna odpornost in bakterije, odporne proti karbapenemom

Mikrobna odpornost predstavlja eno največjih groženj javnemu zdravju, saj lahko povzroči, da se okužbe, ki jih povzročajo mikroorganizmi (bakterije, virusi in glive), ne odzovejo na običajna protimikrobna zdravila, kar oteži zdravljenje. Odpadna voda se izkaže kot pomemben vir za spremljanje mikrobne odpornosti, saj lahko vključuje širok spekter mikroorganizmov iz človeške populacije, vključno s tistimi pridobljenimi iz bolnišnic. S spremljanjem mikrobne odpornosti v odpadni vodi lahko pridobimo vpogled v prevalenco odpornosti mikrobov v splošni populaciji in omogočimo zgodnje prepoznavanje pojavov novih odpornih sevov mikrobov, ki se lahko širijo med ljudmi. Pogosto so rezultati spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi skladni z rezultati, pridobljenimi iz človeških vzorcev, kar podpira uporabo tega pristopa.

Tehnologije, kot je metagenomika (digitalni PCR, kvantitativni PCR), omogočajo identifikacijo genov bakterij za odpornost na antibiotike v odpadni vodi, kar presega omejitve, ki jih imajo tradicionalne laboratorijske metode, osredotočene predvsem na fenotipske teste odpornosti. Tako se lahko hkrati spremlja odpornost številnih bakterijskih vrst, vključno z organizmi, ki običajno niso vključeni v klinične preiskave.

Kljub številnim prednostim spremljanja mikrobne odpornosti v odpadni vodi pa se pojavljajo tudi nekateri izzivi. Med največjimi so pomanjkanje enotnih protokolov za vzorčenje in analizo ter negotovost glede uporabnosti teh podatkov v kliničnih razmerah. Različni pristopi vzorčenja, kot so odvzem vzorcev v različnih časovnih intervalih ali na različnih lokacijah, pa tudi različne metode zaznavanja odpornosti, lahko vplivajo na interpretacijo rezultatov. Da bi izboljšali natančnost in zanesljivost teh informacij, so potrebne nadaljnje raziskave, ki bodo pripomogle k standardizaciji metodologij in omogočile bolj dosledno spremljanje mikrobne odpornosti v odpadni vodi (Chau et al., 2022).

Številne študije so že raziskovale prisotnost odpornih bakterij in genov za odpornost proti antibiotikom v različnih vodnih okoljih, kot so reke, kanalizacijski sistemi, KČN ter odpadni mulj in blato (Blaak et al., 2021; Hendriksen et al., 2019; Karkman et al., 2020; Lee et al., 2020; Prieto Riquelme et al., 2022; Reinthaler et al., 2013; Zarfel et al., 2013). V globalni raziskavi, ki je spremljala prisotnost in pogostost genov bakterij za odpornost proti antibiotikom v odpadni vodi iz več kot 60 držav, so ugotovili sistematične razlike med celinami – regije z nižjimi prihodki (Afrika, Azija, Južna Amerika) so bolj pogosto zaznale prisotnost odpornih bakterij proti antibiotikom, kot regije z višjimi prihodki (Oceanija, Severna Amerika, Evropa) (Hendriksen et al., 2019). Kljub tem ugotovitvam pa obstaja le malo raziskav, ki bi primerjale pogostost odpornih bakterij v odpadni vodi, s pogostostjo odpornih bakterij neposredno v populaciji iz prispevnega območja za odpadno vodo (Gholipour et al., 2023). Uporaba »One Health« pristopa lahko prispeva k zmanjšanju pojava in širjenja odpornih bakterij, omeji s tem povezane ekonomske posledice ter usmerja programe za odgovorno rabo antibiotikov.

Enterobakterije so velika skupina bakterij, ki jih lahko pogosto najdemo v iztrebkih in tvorijo normalno človeško črevesno floro, v nekaterih primerih pa lahko te bakterije povzročijo bolezen. V to skupino spadajo bakterije *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Salmonella, Escherichia, Shigella, Yersinia, Proteus, Serratia*. Enterobakterije, ki so odporne proti karbapenemom, označujemo s kratico CRE (angl. Carbapenem-resistant Enterobacterales).

Bakterije, ki so odporne proti karbapenemom, se s človeka na človeka najpogosteje prenašajo v zdravstvenih ustanovah, bolnišnicah in socialno - varstvenih zavodih: preko onesnaženih rok, površin, zdravstvenih pripomočkov (najpogosteje intravenskih in urinskih katetrov) ali ob stiku z odprto rano. Nenamerno jih na bolnike, ki jih neguje, lahko prenese tudi zdravstveno osebje. V zdravstvu zato izvajajo ukrepe v skladu s priporočili za preprečevanje širjenja CRE v zdravstvenih ustanovah. V zadnjih

letih je opaziti porast pojavljanja CRE v številnih državah po svetu, tudi v Sloveniji. Za okužbo s CRE so najbolj dovzetne osebe, ki imajo pridružene kronične bolezni in osebe, ki potrebujejo zdravljenje v bolnišnici (NIJZ, 2023).

Karbapenemi so trenutno ena izmed najpomembnejših skupin antibiotikov, ki se uporabljajo za zdravljenje hudih in vztrajnih, večkratno odpornih okužb, ki jih povzročajo Gram-negativne bakterije (Oliveira et al., 2020). Pojav rezistence proti tem antibiotikom ima zelo resne posledice za javno zdravje. Pri klinično pomembnih Gram-negativnih bakterijah, kot so *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter cloacae*, je odpornost proti karbapenemom predvsem posledica proizvodnje encimov, imenovanih karbapenemaze, ki razgrajujejo te antibiotike in jih inaktivirajo ali hidrolizirajo (Oliveira et al., 2020)

Karbapenemaze so β-laktamaze z vsestransko hidrolitsko zmogljivostjo. Lahko hidrolizirajo peniciline, cefalosporine, monobaktame in karbapeneme. Karbapenemaze spadajo v molekularni razred A, B in D β-laktamaz. Encimi razredov A in D imajo hidrolizni mehanizem na osnovi serina, encimi razreda B pa so metalo-β-laktamaze, ki na aktivnem mestu vsebujejo cink. Skupina karbapenemaz razreda A vključuje člane družin SME, IMI, NMC, GES in KPC (SME – *Serratia marcescens* enzyme*,* IMI – *imipenem-hidrolizirajoča β-laktamaza,* NMC – *ne-metalo karbapenemaza,* GES – *Guiana extended-spectrum β-laktamaza,* KPC – *Klebsiella pneumoniae karbapenemaza).* Med njimi so najbolj razširjene karbapenemaze KPC, ki jih najdemo predvsem na plazmidih pri bakteriji *Klebsiella pneumoniae*. Karbapenemaza razreda D je sestavljena iz β-laktamaz tipa OXA, ki jih pogosto odkrijejo pri *Acinetobacter baumannii*. Metalo-β-laktamaze spadajo v družine IMP, VIM, SPM, GIM in SIM (IMP – *active on imipenem*, VIM – *Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*, SPM – *São Paulo metallo-β-lactamase*, GIM – *German imipenemase*, SIM – *Seoul imipenemase*) in so bile odkrite predvsem pri *Pseudomonas aeruginosa*, vendar je po vsem svetu vse več poročil o tej skupini β-laktamaz pri *Enterobacteriaceae* (Queenan & Bush, 2007).

Odpornost proti karbapenemom se lahko vzpostavi preko različnih mehanizmov, med katerimi so najpomembnejši: proizvodnja karbapenemaz, zmanjšana prepustnost celične stene, prekomerna ekspresija iztočnih črpalk ter spremembe v penicilin-vezujočih beljakovinah. Najbolj zaskrbljujoč mehanizem predstavlja proizvodnja karbapenemaz, saj so geni, ki kodirajo te encime (CRG), pogosto locirani na mobilnih genetskih elementih (MGE), kar omogoča njihovo enostavno horizontalno prenosljivost med bakterijami. Ti geni so pogosto povezani tudi z odpornostjo na druge antibiotike, kar vodi v pojav večkratne odpornosti (Teban-Man et al., 2022). Pogostost pojavljanja teh encimov se povečuje, kar močno omejuje možnosti zdravljenja. Trenutno ni novih antibiotikov, ki bi bili učinkoviti proti odpornim sevom, kar pomeni, da širjenje teh sevov predstavlja veliko grožnjo za javno zdravje (Rodríguez et al., 2020).

Kot pri drugih β-laktamazah, je večina genov, ki kodira karbapenemaze, locirana na konjugativnih plazmidih, kar omogoča njihovo enostavno prenašanje med bakterijami in spodbuja hitro širjenje (Oliveira et al., 2020). Sprva so bile bakterije s to odpornostjo večinoma omejene na bolnišnično okolje, vendar so številne raziskave pokazale, da so proti karbapenemom odporne bakterije prisotne tudi v okolju in skupnosti, kar kaže na širjenje teh mehanizmov odpornosti izven zdravstvenih ustanov.

Med geni, ki kodirajo karbapenemaze so klinično posebej problematične skupine KPC, VIM, IMP, NDM in OXA-48, saj so pogosto povezane z gram negativnimi bakterijami iz skupine ESKAPE (kratica ESKAPE zajema bakterije: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in vrste iz rodu *Enterobacter*). Te bakterije veljajo za glavne povzročitelje bolnišničnih okužb in so značilne po visoki stopnji večkratne odpornosti. Njihova prisotnost v odpadni vodi predstavlja veliko okoljsko in javnozdravstveno tveganje, saj se geni za odpornost sproščajo iz iztokov KČN neposredno v okolje. Raziskave so pokazale, da se bakterije, ki

proizvajajo karbapenemaze, lahko širijo iz tekočih vodnih ekosistemov v človeško populacijo, kar ima potencialne posledice za javno zdravje.

Kljub tem izzivom trenutno še ne obstajajo celovite študije, ki bi v celoti izkoristile potencial komunalne odpadne vode za spremljanje odpornosti bakterij na antibiotike in primerjavo tako pridobljenih podatkov s kliničnimi podatki o odpornosti bakterij (Teban-Man et al., 2022).

4. 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 nadzornih vzorcev. Kolonizacija in/ali okužba s takšnimi sevi je bila najpogosteje povezana s predhodno hospitalizacijo v tujini, zlasti v Srbiji. V obdobju 2014-2017 je bilo skupaj opredeljenih 91 bolnikov s CP-*Klebsiella pneumoniae*, od tega jih je bila skoraj polovica del prvega slovenskega bolnišničnega izbruha ki se je začel leta 2014 in je trajal do februarja 2016. Pri večini bolnikov so izolirali *Klebsiello pneumoniae*, ki proizvaja OXA-48 in/ali NDM, pri ostalih pa so bili hkrati prisotni CP-*Klebsiella pneumoniae* in CP-*E. Coli*, ki proizvajata OXA-48 in/ali NDM-1, pri dveh pa so odkrili samo *E. coli*, ki proizvaja OXA48 (Benulič et al., 2020).

V raziskavi tega bolnišničnega izbruha so analizirali različne klonske skupine *Klebsiella pneumoniae* z odpornostjo proti karbapenemom v Sloveniji. Vsebovale so skoraj identičen plazmid, kar kaže na prenos gena blaOXA-48 preko plazmidov in poudarja pomen celotnega sekvenciranja genoma pri odkrivanju in obvladovanju izbruhov v bolnišnicah ter nakazuje potrebo po boljšem spremljanju klonov bakterij z zdravilno odpornostjo (Benulič et al., 2020).

Nacionalni inštitut za javno zdravje (NIJZ) v okviru mreže EARS-Net (angl. European Antimicrobial Resistance Surveillance Network) v sodelovanju z mikrobiološkimi laboratoriji zbira podatke o povzročiteljih invazivnih bakterijskih okužb pri bolnikih v slovenskih bolnišnicah in njihovi odpornosti proti antibiotikom (ECDC, 2024).

Analiza podatkov o teh okužbah v Sloveniji v obdobju 2019–2023 razkriva pomembne trende v rasti incidenc okužb z bakterijami, odpornih proti antibiotikom. Povečanje incidenc posameznih vrst bakterij, kot *so Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae in Acinetobacter baumannii*, nakazuje naraščajočo odpornost teh patogenov proti širokemu spektru antibiotikov, kar lahko pomeni nove izzive v kliničnem zdravljenju, zlasti pri bolnikih z oslabljenim imunskim sistemom (ECDC, 2024).

Na podlagi analiziranih podatkov za obdobje 2019–2023 so bile v Sloveniji zabeležene pomembne spremembe v incidenci okužb krvi z bakterijami, odpornih proti ključnim skupinam antibiotikov. Pri *Escherichia coli* se je skupna pojavnost okužb z odpornostjo na cefalosporine tretje generacije, fluorokinolone in aminoglikozide zmanjšala, kar kaže na stabilizacijo odpornosti, medtem ko se je pri *Klebsiella pneumoniae* pojavil izrazit porast v pogostosti okužb s to bakterijo s kombinirano odpornostjo. Po večletnem obdobju, ko je bil delež okužb pod 1 %, je po letu 2021 začel naraščati in leta 2023 dosegel 3,8 %. Tudi pri bakteriji *Acinetobacter baumannii*, znani po odpornosti proti karbapenemom, se je pogostost okužb s kombinirano odpornostjo povečala, kar potrjuje pomembnost te bakterije kot visoko odporne povzročiteljice bolnišničnih okužb. Pri *Pseudomonas aeruginosa* je sicer prišlo do znižanja pogostosti okužb s to bakterijo s kombinirano odpornostjo, a delež okužb s *Pseudomonas aeruginosa* z odpornostjo proti posameznim skupinam antibiotikov ostaja visok. Pogostost okužb z na meticilin odpornim *Staphylococcus aureus* (angl. methicillin-resistant Staphylococcus aureus – MRSA) se je v preučevanem obdobju rahlo znižala, kar lahko kaže na učinkovitost ukrepov preprečevanja širjenja bolnišničnih okužb. Skupno gledano podatki za Slovenijo opozarjajo na nujnost okrepljenega nadzora nad širjenjem bakterij z večkratno odpornostjo, hkrati pa tudi izvajanje ukrepov za zmanjševanje širjenja odpornih bakterij (ECDC, 2024).

Ti podatki zagotavljajo ključno osnovo za spremljanje dinamike odpornosti bakterij na antibiotike v Sloveniji in omogočajo prepoznavanje prednostnih področij za ukrepanje, tako na ravni nacionalnega javnega zdravja kot v okviru evropskih prizadevanj za omejevanje širjenja odpornosti (ECDC, 2024).

5. Spremljanje odpornosti bakterij na antibiotike v odpadni vodi

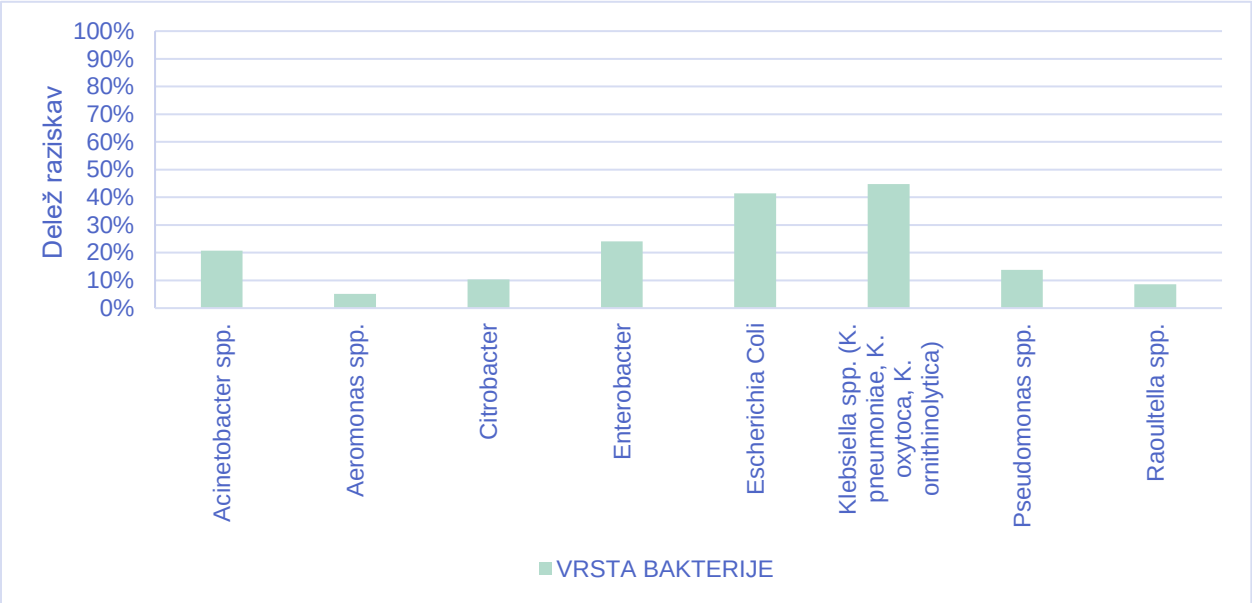
V zadnjih desetletjih se je uporaba protimikrobnih zdravil, predvsem antibiotikov, močno povečala. Postali so vse bolj prisotni tako v medicini kot tudi na drugih področjih, kot so kmetijstvo in živinoreja. Velik del antibiotikov se izloča v odpadne vode, bodisi v svoji izvorni obliki ali pa kot aktivni oziroma neaktivni presnovki. Posledično so bakterije v čistilnih napravah stalno izpostavljene nizkim koncentracijam antibiotikov. To omogoča, da se razvija odpornost, saj preostale bakterije postanejo odporne na te snovi. Ker konvencionalni postopki čiščenja odpadne vode niso zasnovani za odstranjevanje bakterij, odpornih na antibiotike, so čistilne naprave postale pomemben rezervoar za bakterije in nadaljnje tudi vir njihovega širjenja v okolje (Teban-Man et al., 2022).

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 na antibiotike v odpadni vodi v različnih državah. V sistematični pregled literature smo vključili raziskave, ki so obravnavale tako bakterije, odporne proti karbapenemom, kot tudi bakterije, ki proizvajajo karbapenemaze v odpadni vodi. Ker prisotnost karbapenemaz ne pomeni nujno tudi izražene fenotipske odpornosti proti karbapenemom, je izraz »bakterije, odporne proti karbapenemom« v nadaljevanju, kjer je to ustrezno, uporabljen v širšem pomenu, ki vključuje tudi bakterije, ki proizvajajo karbapenemaze. Metoda dela priprave sistematičnega pregleda literature je predstavljena v Prilogi 1.

5.1 Povzročitelji in odpornost proti karbapenemom

V raziskavah, ki smo jih vključili v sistematičen pregled (n = 58), so v odpadni vodi preučevali različne bakterije, odporne proti karbapenemom. Raziskave so se med seboj razlikovale tako po vrstah kot številu preučevanih bakterij – nekatere so analizirale zgolj eno vrsto, druge pa več. V dveh raziskavah preučevanih bakterij niso natančno opredelili. V večini raziskav so se osredotočili na enterobakterije, pri čemer so najpogosteje preučevali *Klebsiella spp.* (n = 26) in *Escherichia coli* (n = 24). Med drugimi vrstami bakterij so pogosto preučevali še *Acinetobacter spp*. (n = 12) in *Pseudomonas spp*. (n = 8) (Graf 1).

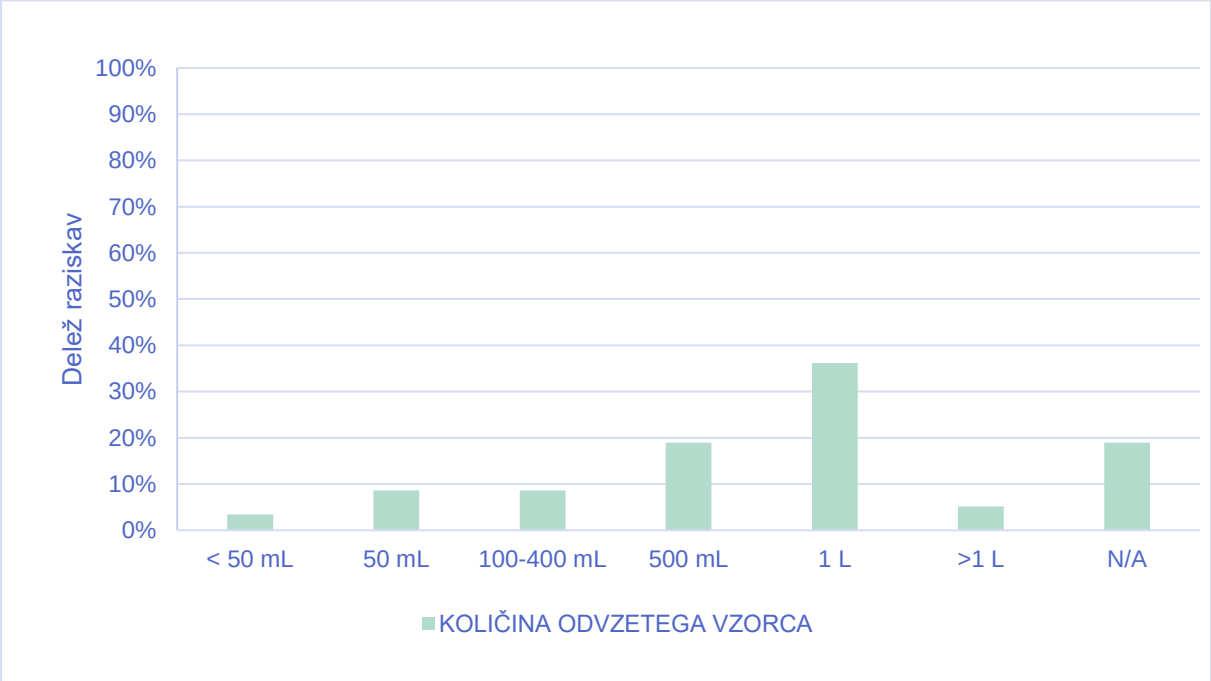
V raziskavah, ki so preučevale odpornost bakterij proti karbapenemom v odpadni vodi, so najpogosteje določali prisotnost genov, povezanih s karbapenemazami, med katerimi so prevladovali blaKPC (vključno z blaKPC-2 in blaKPC-3; n = 30), blaNDM (z različicami blaNDM-1, blaNDM-4, blaNDM-5, blaNDM-6 in blaNDM-9; n = 27), ter različni geni iz družine blaOXA (kot so blaOXA-23, blaOXA-48, blaOXA-244, blaOXA-72, blaOXA-51 in blaOXA-58; n = 27). Pogosto so bili prisotni tudi geni blaVIM (n = 16) in blaIMP (n = 16), v nekaterih primerih pa tudi blaGES, blaSPM, blaIMI, blaGIM, blaBKC in blaKHM. Vključene raziskave so odpornost proti karbapenemom opredeljevale bodisi fenotipsko, z določanjem občutljivosti na antibiotike, bodisi genotipsko, z dokazovanjem genov za karbapenemaze. Raziskave so poleg molekularnega testiranja za določanje prisotnosti genov za odpornost proti karbapenemom, vključevale tudi testiranje občutljivosti bakterij na nekatere karbapenemske antibiotike, predvsem imipenem in meropenem (disk difuzija, mikrodilucija).



Graf 1: Delež raziskav odpadne vode glede na vrsto bakterije pri katerih so preučavali prisotnost karbapenemaz oziroma odpornost proti karbapenemom (n = 58).

5.2 Količina zbranega vzorca za analizo

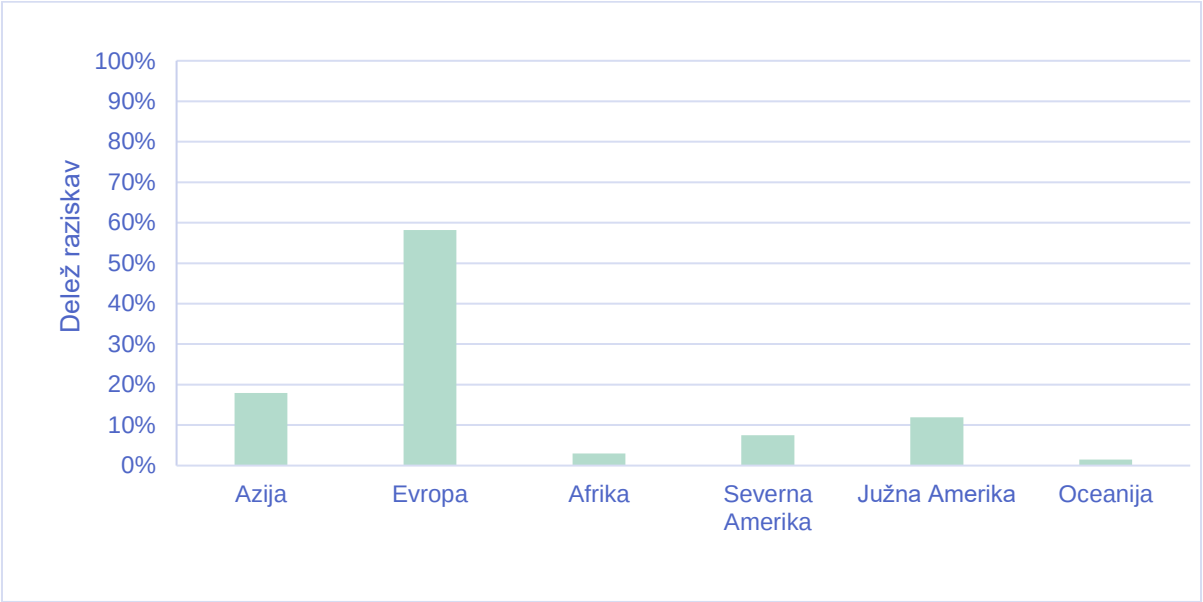
V raziskavah so za preučevanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi na vtoku v KČN najpogosteje vzorčili 1 liter odpadne vode (Graf 2) (n = 21). V manj kot 20 % raziskav so vzorčili 500 mililitrov odpadne vode, v posameznih raziskavah pa so vzorčili tudi 50 mililitrov, 100–400 mililitrov ter manj kot 50 mililitrov odpadne vode. V treh raziskavah pa so za preučevanje bakterij odpornih proti karbapenemom vzorčili več kot 1 liter odpadne vode. Rezultati kažejo na razmeroma enotno uporabo 1-litrske količine odpadne vode za vzorčenje, ki se pogosto uporablja za spremljanje bakterij odpornih na antibiotike.



Graf 2: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na količino odvzetega vzorca odpadne vode (n = 58).

5.3 Države

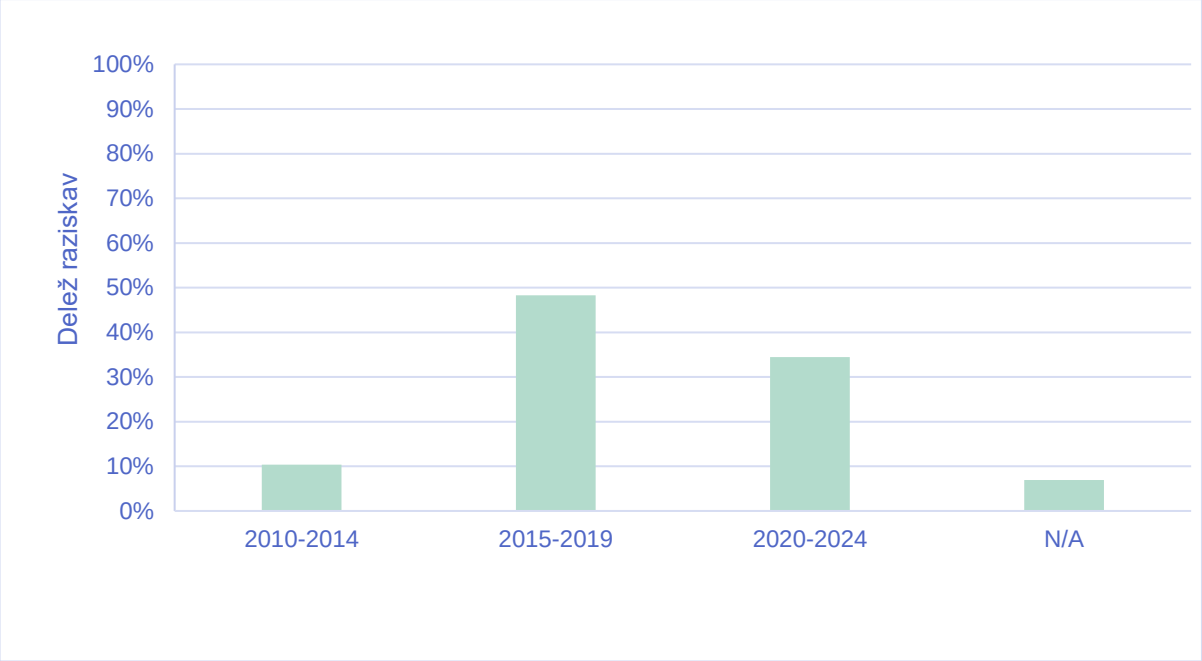
Največ raziskav kjer so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi je bilo izvedenih v Evropi (20 držav; n = 39). Sledijo Azija (6 držav; n = 12) in Južna Amerika (2 državi; n = 8), nato Severna Amerika (5 držav; n = 5), Afrika (1 država; n = 2) in Oceanija (1 država; n = 1) (Graf 3). Raziskave, izvedene v Evropi, so zajemale naslednje države: Anglija (n = 2), Avstrija (n = 1), Belgija (n = 2), Češka (n = 2), Danska (n = 1), Finska (n = 3), Francija (n = 1), Grčija (n = 1), Hrvaška (n = 4), Italija (n = 2), Madžarska (n = 1), Nemčija (n = 3), Norveška (n = 3), Poljska (n = 3), Portugalska (n = 3), Romunija (n = 1), Slovaška (n = 1), Španija (n = 2), Švedska (n = 2) in Švica (n = 1).



Graf 3: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi, glede na državo izvedbe raziskave po kontinentih (n = 58).

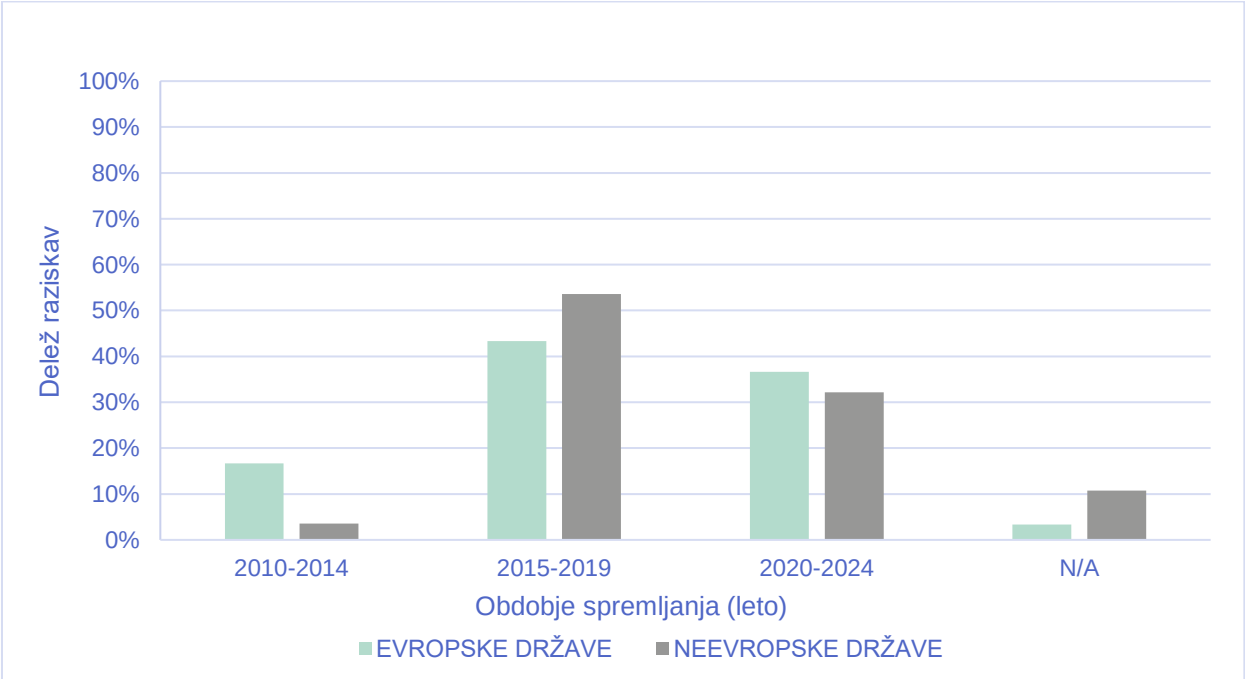
5.4 Obdobje spremljanja

Pri raziskavah, kjer je vzorčenje odpadne vode potekalo več let, je bilo za razvrstitev po obdobjih upoštevano leto zaključka vzorčenja (Graf 4). Največji delež raziskav, v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi je bil izveden v obdobju 2015 – 2019, kar kaže na povečano raziskovalno dejavnost tega področja v navedenem časovnem obdobju. Sledi obdobje 2020 – 2024, kar nakazuje nadaljevanje interesa raziskovalcev za to področje, hkrati pa obstaja možnost, da rezultati vseh raziskav, ki zajemajo to obdobje še niso bili objavljeni. Manjši delež raziskav izvedenih v obdobju 2010 – 2014, nakazuje, da je sistematično spremljanje bakterij odpornih proti karbapenemom v odpadni vodi postalo bolj aktualno šele v zadnjem desetletju. Med do zdaj največje izvedene projekte na področju spremljanja odpornosti bakterij v odpadni vodi, se uvršča Global Sewage Surveillance Project, katerega namen je bil preučiti možnost uporabe odpadne vode za kontinuirano spremljanje tega področja. Omenjen projekt je bil izveden med leti 2016 in 2019, v njem pa je sodelovalo 102 držav, med njimi tudi države članice Evropske unije, vključno s Slovenijo (Munk et al., 2022). V obdobju z večjo intenzivnostjo raziskav sta potekala še projekt REPARES (2019–2022), izveden v 20 državah (Pokorná, 2023), in HORIZON 2020 projekt ANSWER (2015–2019), ki je potekal v 9 državah (AGES, n.d.) v katerih so prav tako preučevali odpornost bakterij na antibiotike v odpadni vodi.



Graf 4: Delež raziskav, v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom glede na obdobje vzorčenja (n = 58).

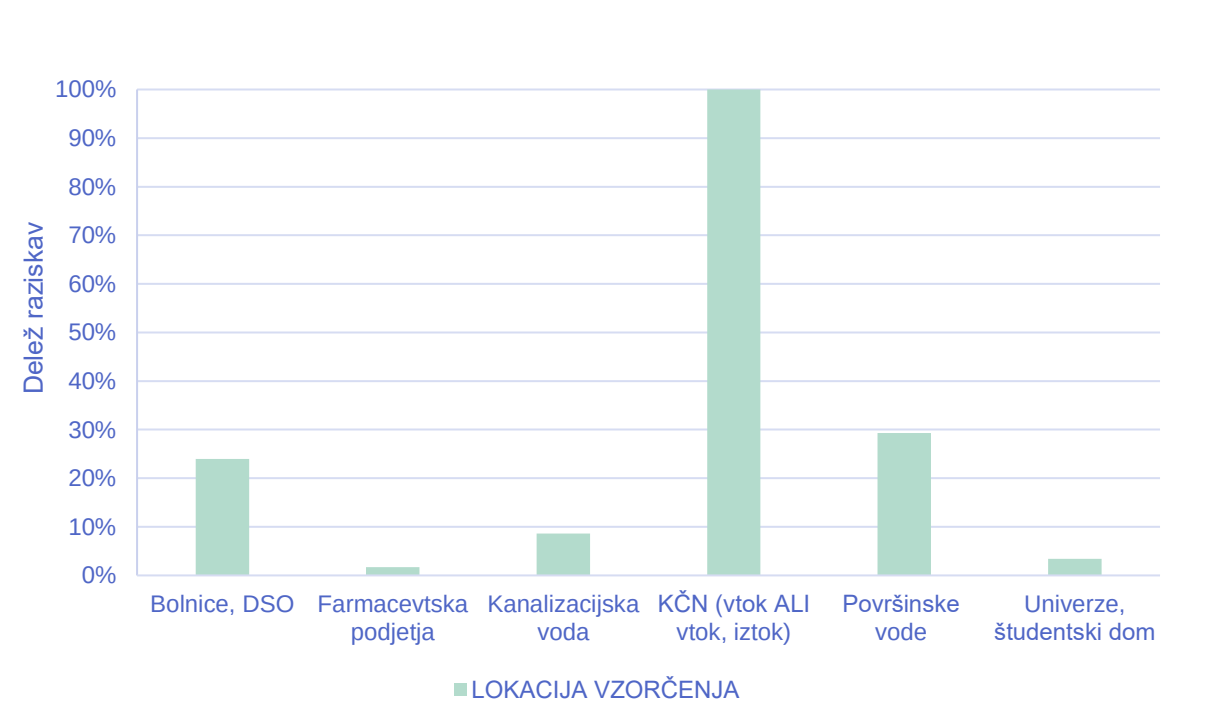
Izvedena je bila tudi analiza porazdelitve raziskav glede na obdobje izvedbe vzorčenja in geografsko razdelitev vključenih držav (Graf 5). Evropske države so bile pred letom 2015 intenzivneje vključene v raziskave spremljanja bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi kot neevropske države. To kaže na zgodnejše prepoznavanje pomena proučevanja in spremljanja odpornosti bakterij v odpadni vodi. Po letu 2015 je zaznati izrazito povečanje raziskovalne dejavnosti v neevropskih državah, kar verjetno odraža globalno rast zavedanja o spremljanju odpornosti bakterij v okolju. V obdobju 2020–2024 se zazna rahel upad deleža raziskav v obeh regijah, pri čemer evropske države še vedno ohranjajo nekoliko večjo zastopanost. Obstaja možnost, da rezultati vseh raziskav, ki zajemajo to obdobje spremljanja še niso bili objavljeni.



Graf 5: Delež raziskav, v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom glede na obdobje spremljanja v evropskih (n = 30) in neevropskih državah (n = 28).

5.5 Lokacija vzorčenja

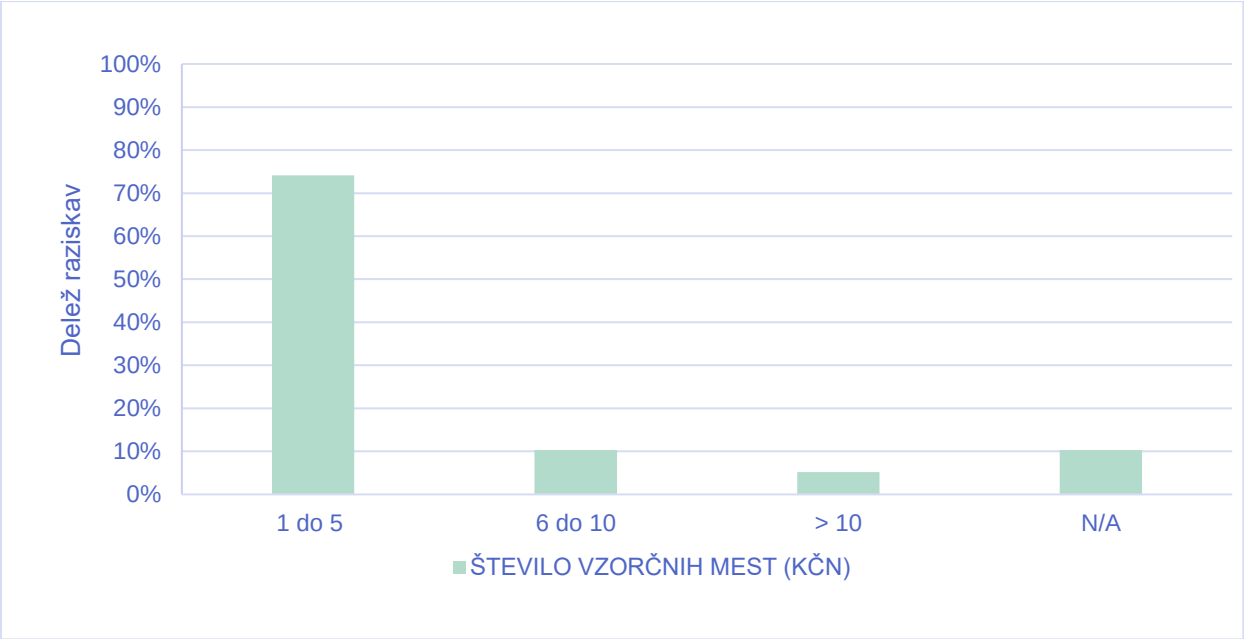
Vključitveni kriterij za našo analizo sistematičnega pregleda literature, kjer so preučevali odpornost bakterij proti karbapenemom v odpadni vodi je zajemal raziskave, ki poročajo o podatkih iz lokacije vzorčenja na vtoku v KČN (Graf 6). Lokacija vzorčenja na vtoku v KČN omogoča zajem reprezentativnih vzorcev in je zato ključna za spremljanje širjenja odpornosti bakterij v populaciji. V posameznih raziskavah so, poleg vtoka v KČN uporabili več različnih mest vzorčenja. V nekaterih raziskavah so vzorčili površinske vode (npr. reke, jezera, potoki, morje), z namenom da bi preučili širjenje bakterij, odpornih proti karbapenemom, iz odpadne vode v naravne vodne ekosisteme kot posledica nezadostne učinkovitost čiščenja komunalne odpadne vode. V nekaterih raziskavah so preučevali prisotnost proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi iz bolnišnic in domov za starejše občane, saj gre za okolja kjer se pogosto uporabljajo antibiotiki in posledično z večjim tveganjem za pojav rezistentnih sevov bakterij. Preučevanje proti karbapenemom odpornih bakterij v kanalizacijskih vodah ter spremljanje proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadnih vodah iz farmacevtskih podjetij ter univerz oziroma študentskih domov se v raziskavah pojavlja manj pogosto, kar odraža bolj specifično ali ciljno usmerjeno raziskovalno zanimanje. Raziskave poudarjajo pomen KČN kot ključnih mest za odstranjevanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, hkrati pa so najpomembnejše mesto za spremljanje odpornosti bakterij v odpadni vodi.



Graf 6: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na lokacijo vzorčenja odpadne vode (n = 58).

5.6 Število vzorčnih mest

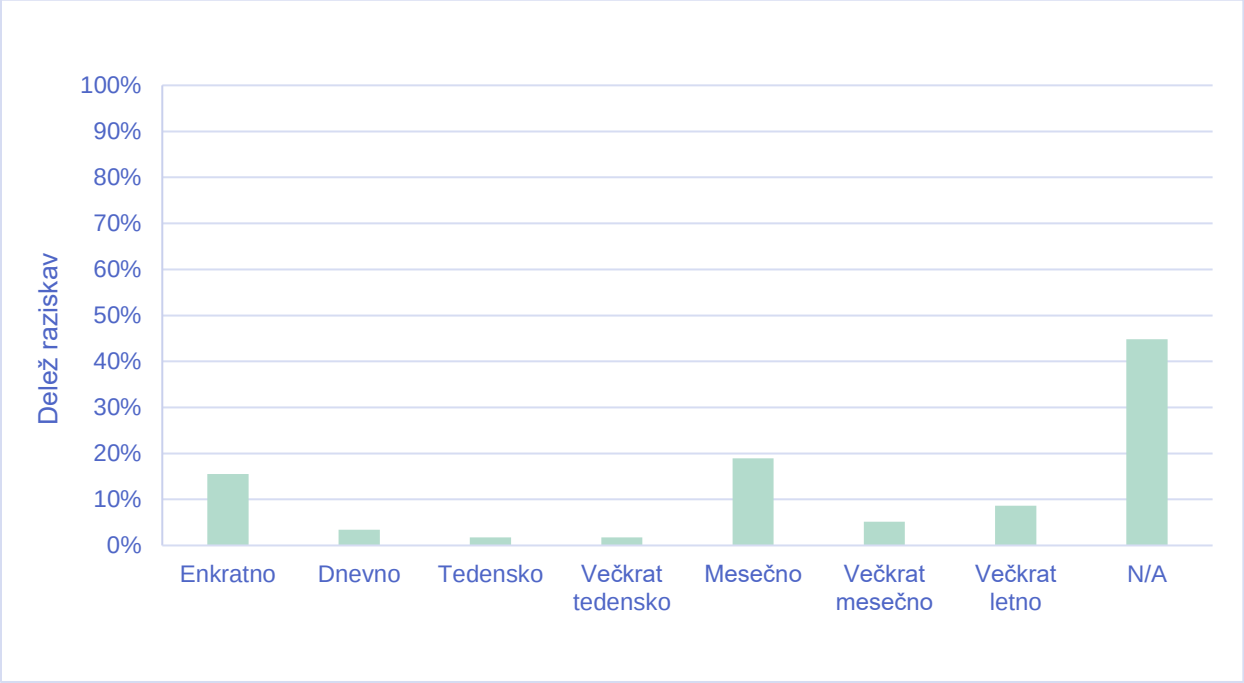
Največ raziskav, v katerih so preučevali bakterije, odporne proti karbapenemom v odpadni vodi, je bilo izvedenih na »1 do 5« vzorčnih mestih na KČN, sledijo raziskave z »6 do 10« vzorčnimi mesti (Graf 7). Pri manjšem deležu raziskav, se je vzorčilo na »več kot 10« vzorčnih mestih. Število vzorčnih mest je bilo povezano z raziskovalnim obsegom in cilji študije.



Graf 7: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na število vzorčnih mest na KČN (n = 58).

5.7 Pogostost vzorčenja

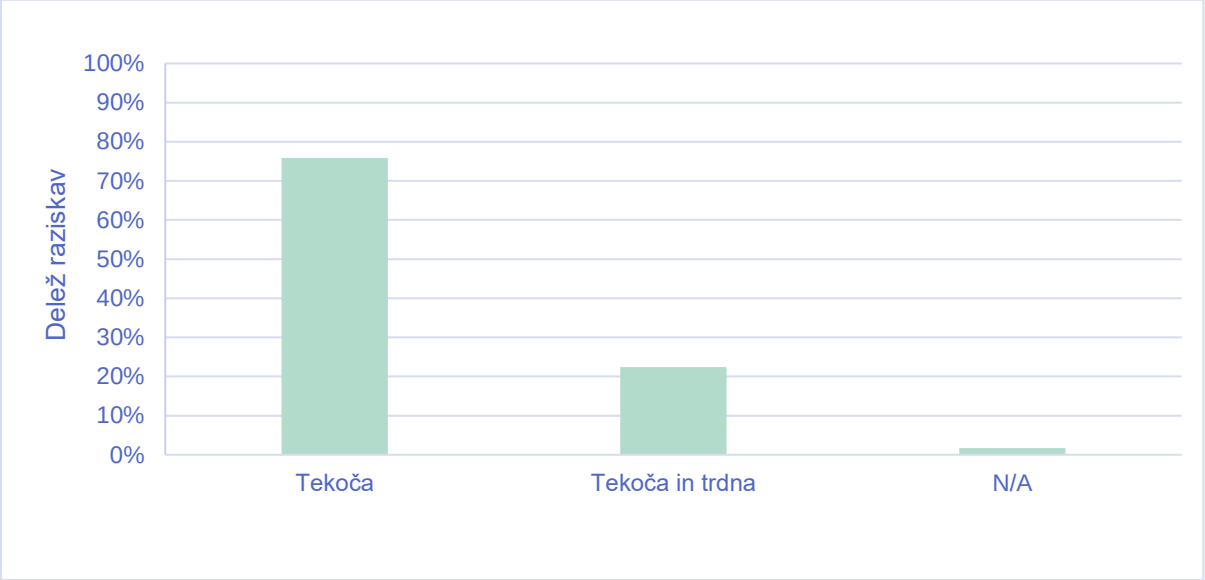
Za preučevanje bakterij, odpornih proti karbapenemom v odpadni vodi je bila najpogosteje uporabljena mesečna frekvenca vzorčenja (n = 12) (Graf 8). Pogosto je bilo tudi enkratno vzorčenje, kar lahko nakazuje na izvajanje pilotnih ali preliminarnih raziskav. V nekaterih raziskavah se je vzorčenje izvajalo večkrat letno, oziroma v različnih letnih časih, medtem ko se je dnevno, tedensko ali večkrat tedensko vzorčenje izvajalo pri manjšem deležu raziskav. Pri velikem deležu raziskav (n = 26), niso poročali podatka o pogostosti vzorčenja (na grafu označeno kot N/A).



Graf 8: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na pogostost vzorčenja odpadne vode (n = 58).

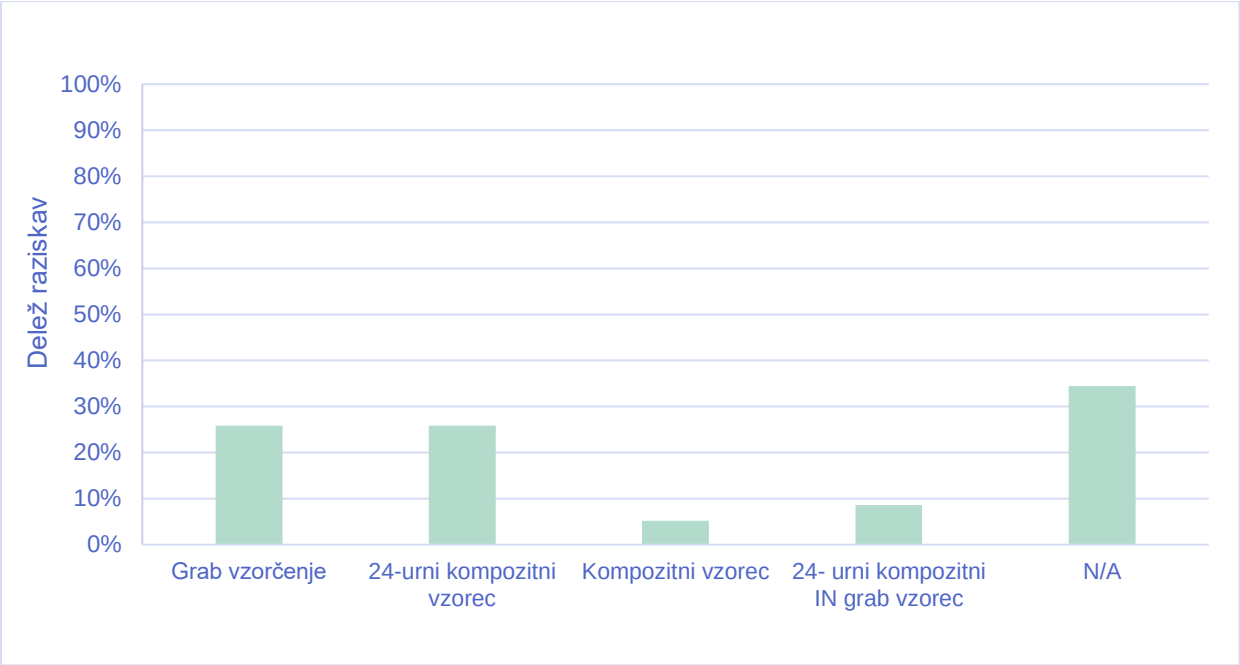
5.8 Faza vzorca in metode vzorčenja

Prikazana je razporeditev raziskav po deležih (Graf 9) glede na fazo vzorca odpadne vode, pri čemer se faza nanaša na fizično stanje vzorca odpadne vode ob odvzemu. V večini raziskav (n = 45) so odvzemali vzorce odpadne vode v tekoči fazi, kar pomeni, da je bila odvzeta surova odpadna voda na vtoku ali prečiščena odpadna voda na iztoku iz KČN. V ostalih raziskavah pa so jemali vzorce v tekoči in trdni fazi, pri čemer se trdna faza nanaša na različne vrste blata, kot so primarni mulj, aktivno blato ali dehidrirano blato, ki nastajajo znotraj procesa čiščenja odpadne vode na KČN. Večji delež raziskav je bil usmerjen v odvzemanje vzorcev v tekoči fazi, vendar pa vključevanje vzorcev v trdni fazi prinaša dodatno vrednost, saj omogoča razumevanje porazdelitve odpornih bakterij znotraj celotnega procesa čiščenja odpadne vode na KČN.



Graf 9: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na fazo vzorca ob odvzemu (n = 58).

Graf prikazuje delež raziskav glede na uporabljeno metodo vzorčenja (Graf 10). Lahko ugotovimo, da sta metodi grab vzorčenja in 24-urnega kompozitnega vzorčenja v raziskavah zastopani v približno enakem deležu. Grab vzorčenje, ki omogoča zajem vzorca v določenem trenutku, je pogosto uporabljeno zaradi enostavne izvedbe, medtem ko 24-urno kompozitno vzorčenje, izvedeno s pomočjo avtomatskih vzorčevalnikov, zagotavlja bolj reprezentativen vzorec. Kljub temu pa oblikovanje zanesljivih zaključkov o razširjenosti posameznih metod vzorčenja ostaja omejeno, saj v kar 34 % raziskav niso poročali podatka o uporabljeni metodi vzorčenja (na grafu označeno kot N/A). Manjši delež predstavljajo raziskave, ki so uporabile zgolj metodo kompozitnega vzorca brez časovne opredelitve ali kombinacijo 24-urnega kompozitnega vzorca in grab vzorca.



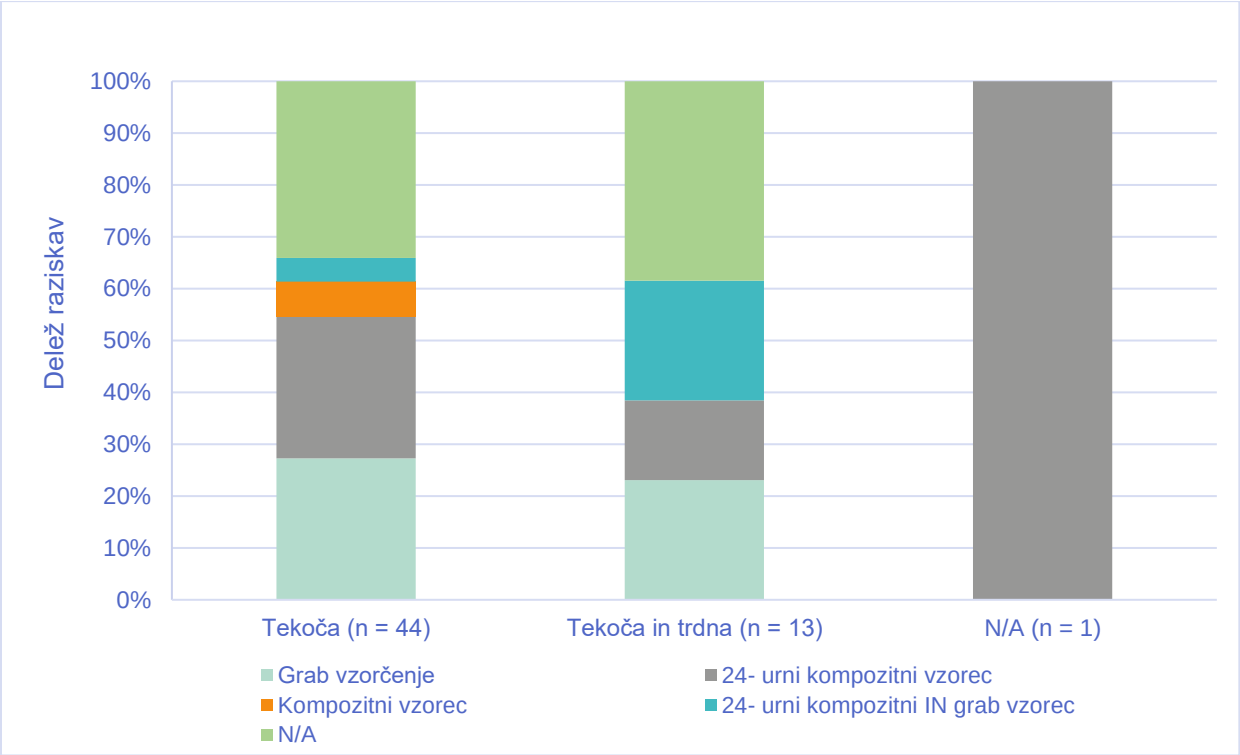
Graf 10: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na metode vzorčenja odpadne vode (n = 58).

Graf (Graf 11) prikazuje delež raziskav v katerih so preučevali prisotnost bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi glede na fazo vzorca (tekoča, kombinacija tekoče in trdne, N/A) in metodo vzorčenja. Med raziskavami, kjer so vzorčili tekočo fazo vzorca (n = 44), prevladuje uporaba grab vzorčenja in 24-urnega kompozitnega vzorčenja, ki sta bila uporabljena v največjem deležu raziskav.

Pri raziskavah, ki so vzorčile tekočo in trdno fazo vzorca (n = 13) so pogosteje uporabili kombinacijo 24-urnega kompozitnega vzorca in grab vzorca. Uporabljeni pa sta bili tudi posamezno, kot metoda grab vzorčenja in 24- urnega kompozitnega vzorčenja.

Stolpec N/A, predstavlja raziskave, kjer faza vzorca, ni bila opredeljena, podani pa so bili podatki o uporabljeni metodi vzorčenja (n = 1). V tem primeru so za metodo vzorčenja uporabili 24-urni kompozitni vzorec.

Navedeno kaže na potrebo po standardizaciji metod vzorčenja za spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi in boljše poročanje informacij v raziskavah, kot sta faza analiziranega vzorca in metoda vzorčenja.



Graf 11: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na fazo vzorca in metodo vzorčenja odpadne vode (n = 58).

5.9 Izsledki raziskav in predlagani javnozdravstevni ukrepi

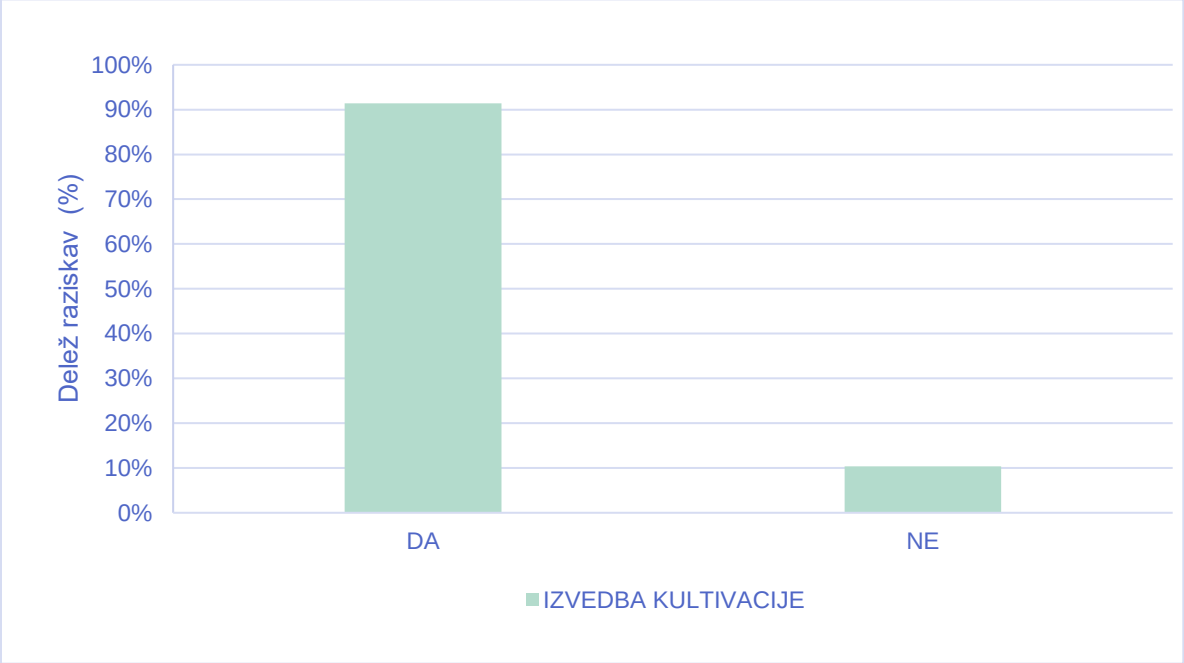
Namen in cilji raziskav, vključenih v pregled literature so bili zelo raznoliki, zato se med seboj razlikujejo tudi priporočila in predlagani ukrepi, ki izhajajo iz ugotovitev raziskav. V raziskavah so najpogosteje poudarjali potrebo po uvedbi rednega spremljanja in nadzora nad razširjenostjo odpornosti bakterij proti karbapenemom v odpadni vodi (n = 8) ter potrebo po razvoju bolj učinkovitih metod čiščenja odpadne vode (n = 9), saj komunalne čistilne naprave pogosto niso zadostno učinkovite pri odstranjevanju bakterij, odpornih proti karbapenemom (n = 10).

V več raziskavah so poudarili pomen spremljanja odpornosti bakterij proti antibiotikom v odpadni vodi za razumevanje odpornosti bakterij proti antibiotikom v populaciji (n = 6) ter za izboljšanje nadzora nad uporabo antibiotikov (n = 7). To je pomembno tudi zato, ker lahko izpust odpornih bakterij v komunalne sisteme spodbuja prenos genov za odpornost proti antibiotikom med bakterijami, s čimer se problematika odpornosti še poglablja (n = 5), hkrati pa predstavlja vir širjenja bakterij, odpornih proti antibiotikom (n = 4).

Med predlaganimi javnozdravstvenimi ukrepi so v raziskavah izpostavili tudi pomen ozaveščanja javnosti o problematiki odpornosti bakterij proti antibiotikom v odpadni vodi (n = 3), razvoj in uvedbo natančnejših ter učinkovitejših metod za identifikacijo in kvantifikacijo bakterij, odpornih na antibiotike (n = 3), ter izboljšanje učinkovitosti čiščenja odpadne vode (n = 3).

5.10 Izvedba kultivacije in metoda detekcije bakterij

Večina raziskav (n = 50) je poleg molekularnih metod izvedla tudi kultivacijo bakterij (Graf 12), kar poudarja ključno vlogo te metode pri preučevanju odpornih sevov, zlasti tistih, ki proizvajajo karbapenemaze. Kultivacija omogoča osamitev posameznih sevov, ki jim je mogoče določiti fenotipski profil in jih uporabiti v nadaljnjih genetskih ter genomsko usmerjenih analizah. Takšen pristop omogoča povezovanje fenotipskih in genotipskih značilnosti odpornih bakterij, kar je bistveno za razumevanje mehanizmov odpornosti in njihove epidemiološke razširjenosti v okolju.



Graf 12: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na izvedbo kultivacije bakterij (n = 58).

V raziskavah, v katerih so preučevali bakterije, odporne proti karbapenemom, so uporabljali različne metode za določanje bakterijskih vrst in genov odpornosti (Graf 13).



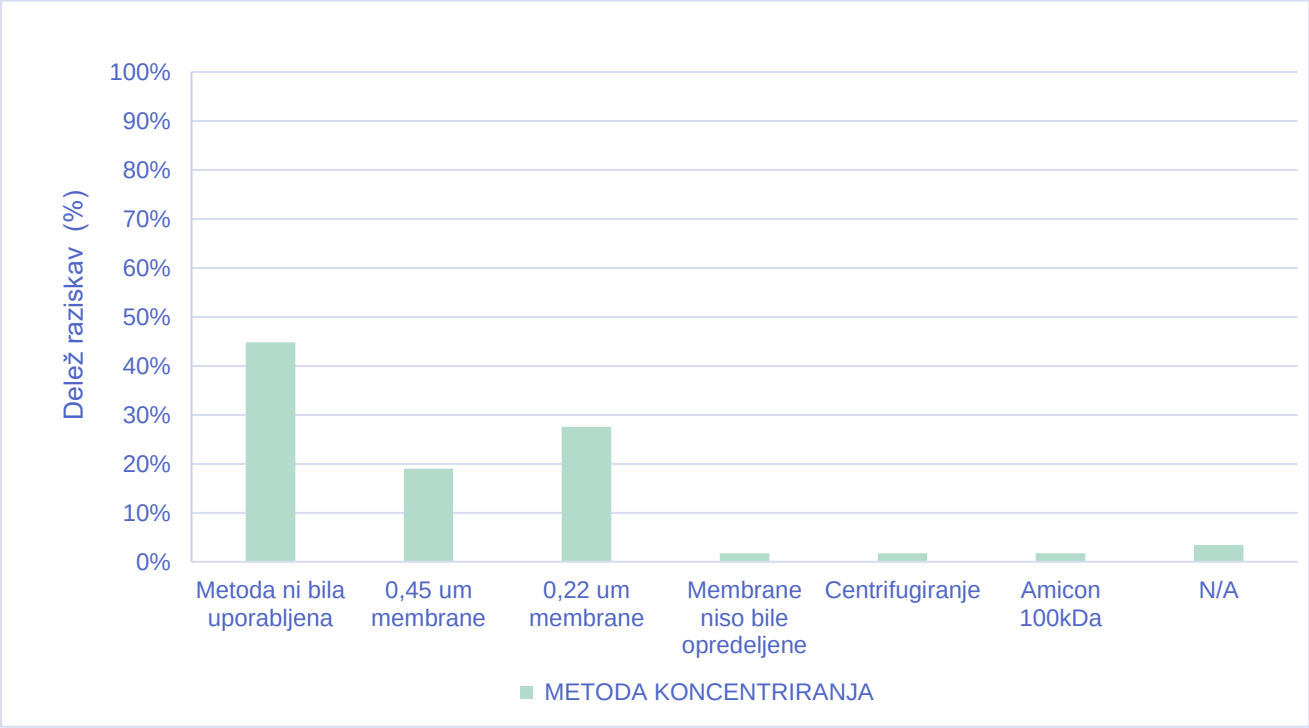
Graf 13: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na metodo detekcije (n = 58).

Za določanje vrst bakterij odpornih proti karbapenemom se najpogosteje uporabljajo molekularne metode, med katerimi prevladuje PCR (n = 45), ki omogoča hitro in občutljivo zaznavanje genov odpornosti. Sledi sekvenciranje celotnega genoma (WGS) (n = 36), ki omogoča celovito analizo genetskih značilnosti sevov, vključno z identifikacijo genov odpornosti, virulenčnih dejavnikov in mobilnih genetskih elementov. MALDI-TOF masna spektrometrija (n = 32) se uporablja za hitro identifikacijo bakterij na osnovi njihovih proteinskih profilov. Kvantitativni PCR (qPCR) in 16S rRNA sekvenciranje se uporabljata bistveno redkeje; prva omogoča kvantifikacijo specifičnih genov odpornosti, medtem ko druga razkriva taksonomsko sestavo mikrobnih skupnosti.

Pomembno je poudariti, da nekatere od teh metod, kot sta MALDI-TOF in WGS, zahtevajo predhodno osamitev bakterijskih sevov, saj temeljijo na analizi posameznih bakterijskih kultur, medtem ko je PCR, zlasti qPCR in 16S rRNA sekvenciranje, mogoče izvesti tudi neposredno iz vzorcev odpadne vode, brez potrebe po kultivaciji. Ta razlika pomembno vpliva na vrsto pridobljenih podatkov – metode, ki temeljijo na osamljenih sevih, omogočajo poglobljeno fenotipsko in genotipsko karakterizacijo, medtem ko neposredne molekularne metode zagotavljajo širši vpogled v prisotnost in raznolikost genov odpornosti v okolju.

5.11 Metoda koncentriranja

Prikazan je delež raziskav glede na uporabljeno metodo koncentriranja vzorca odpadne vode pri preučevanju proti karbapenemom odpornih bakterij v odpadni vodi (Graf 14).

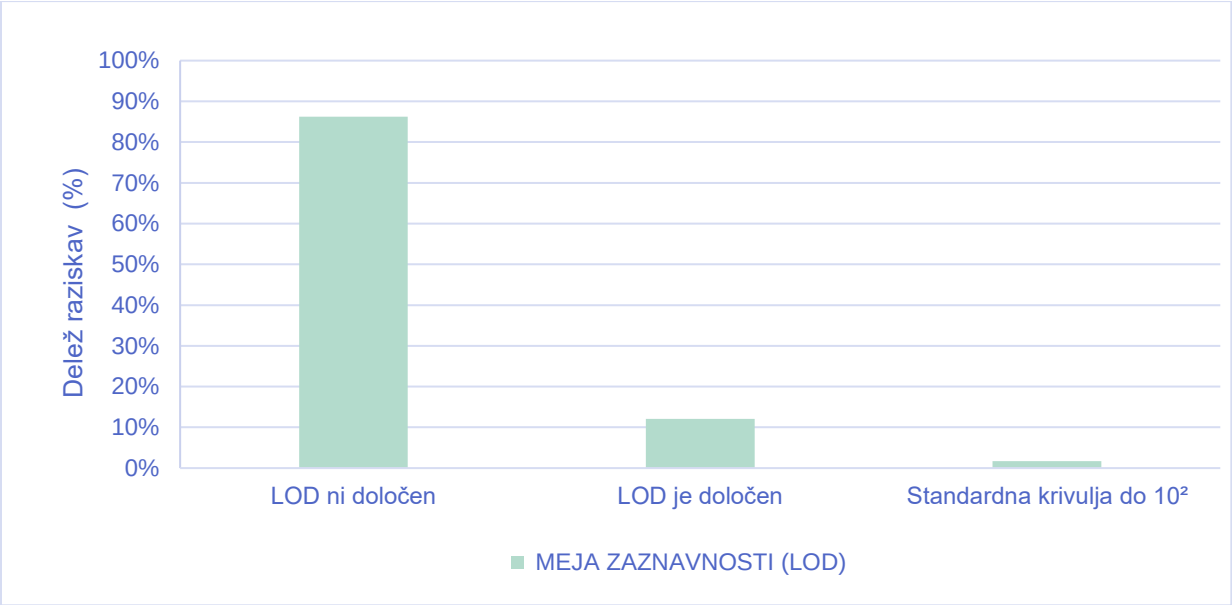


Graf 14: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na metodo koncentriranja (n = 58).

Najpogosteje metoda koncentriranja ni bila uporabljena (n = 26). Uporaba filtracijskih membran z velikostjo por 0,22 µm in 0,45 µm je bila pogosta. Redkejša uporaba ultrafiltracije (Amicon 100 kDa) (n = 1) in centrifugiranja (n = 1), nakazujeta na omejeno uporabo bolj občutljivih koncentracijskih metod, predvsem pa so membranske filtracije enostavnejše za uporabo in z njimi dosežemo ustrezen učinek koncentriranja. Pri filtraciji na membranah pogosto tudi ni potrebna posebna laboratorijska oprema, kot so specializirane visoko zmogljive centrifuge (npr. za ultra-centrifugiranje), kar pomeni da je takšna metodologija cenejša. Pomembno je poudariti tudi da za kultivacijo bakterij iz vtočne odpadne vode mnogokrat ni potrebno koncentriranje, saj je v takšnih vzorcih koncentracija bakterij zadostna da omogoča uspešno kultivacijo.

5.12 Meja zaznavnosti (LOD)

V večini analiziranih raziskav meja zaznavnosti (LOD; limit of detection) ni bila določena (n = 50), kar predstavlja pomembno metodološko pomanjkljivost pri zagotavljanju kakovosti in primerljivosti rezultatov (Graf 15).



Graf 15: Delež raziskav v katerih so preučevali bakterije odporne proti karbapenemom v odpadni vodi glede na mejo zaznavnosti (LOD) (n = 58).

Meja zaznavnosti opredeljuje najnižjo koncentracijo tarčnega nukleotidnega zaporedja ali mikroorganizma, ki jo je mogoče zanesljivo zaznati s posamezno analitsko metodo. Določitev LOD je ključna za oceno občutljivosti metode, saj omogoča razumevanje, do katere mere lahko metoda zazna prisotnost bakterij ali genov odpornosti v kompleksnih vzorcih, kot je odpadna voda. Le manjše število raziskav (n = 7) je jasno opredelilo mejo zaznavnosti, medtem ko je v posameznih primerih uporabljena tudi standardna krivulja do koncentracij reda 10^2 kopij, kar omogoča kvantifikacijo tarčnih genov znotraj določenega območja natančnosti. Odsotnost podatkov o LOD omejuje možnost primerjave med študijami in zmanjšuje zanesljivost pri oceni prevalence nizko prisotnih odpornih bakterij ali genov.

Za vzpostavitev standardiziranega in primerljivega pristopa v prihodnjih raziskavah, zlasti v okviru mednarodnih programov spremljanja antimikrobne odpornosti v okolju, bo zato nujno vključiti določitev meje zaznavnosti za posamezne analitske postopke. To bi omogočilo boljšo oceno občutljivosti uporabljenih metod, večjo ponovljivost rezultatov in bolj zanesljivo interpretacijo trendov v pojavnosti genov odpornosti v odpadni vodi.

6. Zaključek

Spremljanje bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi predstavlja pomembno orodje za zgodnje odkrivanje širjenja te vrste mikrobne odpornosti v populaciji. Sistematični pregled literature je pokazal, da se preučevanje in spremljanje odpornih bakterij proti karbapenemom v odpadni vodi že izvaja v številnih državah, pri čemer ima Evropa vodilno vlogo. V večini raziskav so se osredotočili na enterobakterije, pri čemer so najpogosteje preučevali *Klebsiella spp.* in *Escherichia coli*, sledila sta jima *Acinetobacter spp.* in *Pseudomonas spp.* Identificirane so bile tudi različne skupine genov, povezanih s karbapenemazami – najpogosteje blaKPC, blaNDM in blaOXA. V nekatere raziskave so poleg molekularnega testiranja vključili tudi testiranje občutljivosti preučevanih bakterij na posamezne karbapenemske antibiotike. Vzorčenje odpadne vode za preučevanje bakterij odpornih proti karbapenemom se je najpogosteje izvajalo na vtoku v KČN, kar omogoča zajem reprezentativnega vzorca in boljše razumevanje dinamike širjenja odpornosti bakterij proti karbapenemom na ravni populacije. Analiza raziskav vključenih v naš sistematičen pregled literature, je pokazala različne pristope pri odvzemu vzorcev odpadne vode, od grab do 24-urnega kompozitnega vzorca, ob tem pa tudi vzorčenje različnih faz vzorca odpadne vode– tekoče in trdne. Ugotovljeno je, da kombinacija obeh faz ponuja celovitejši in boljši vpogled v celoten proces odstranjevanja bakterij, odpornih proti karbapenemom, v sistemih za čiščenje odpadne vode.

Raziskave vključene v sistematični pregled literature poudarjajo pomen rednega sistema spremljanja bakterij odpornih na antibiotike v odpadni vodi, izboljšanju učinkovitosti obstoječih postopkov čiščenja odpadne vode in dopolnjevanju okoljskih podatkov s podatki iz zdravstvenega sistema. Ključna je tudi krepitev ozaveščenosti o vlogi okolja pri širjenju odpornosti bakterij na antibiotike ter spodbujanje interdisciplinarnega sodelovanja v skladu s pristopom »Eno zdravje«.

7. Reference

1) A high prevalence of bla (OXA-48) in Klebsiella (Raoultella) ornithinolytica and related species in hospital wastewater in South West England","Gibbon MJ, Couto N, David S, Barden R, Standerwick R, Jagadeesan K, Birkwood H, Dulyayangkul P, Avison MB, Kannan A, Kibbey D, Craft T, Habib S, Thorpe HA, Corander J, Kasprzyk-Hordern B, Feil EJ.","Microb Genom. 2021 Mar
2) AGES. HORIZON 2020 Project “ANSWER” - Antibiotics and mobile antibiotic resistances in treated wastewater: risks and innovative solutions. https://www.ages.at/en/research/project-highlights/answer?sword_list%5B0%5D=wastewater&no_cache=1.
3) An Update on Wastewater Multi-Resistant Bacteria: Identification of Clinical Pathogens Such as Escherichia coli O25b:H4-B2-ST131-Producing CTX-M-15 ESBL and KPC-3 Carbapenemase-Producing Klebsiella oxytoca","Mesquita E, Ribeiro R, Silva CJC, Alves R, Baptista R, Condinho S, Rosa MJ, Perdigão J, Caneiras C, Duarte A.","Microorganisms. 2021 Mar 11
4) Analysis of Wastewater Reveals the Spread of Diverse Extended-Spectrum β-Lactamase-Producing E. coli Strains in uMgungundlovu District, South Africa","Gumede SN, Abia ALK, Amoako DG, Essack SY.","Antibiotics (Basel). 2021 Jul 15
5) Antibiogram and beta-lactamase genes among cefotaxime resistant E. coli from wastewater treatment plant","Adegoke AA, Madu CE, Aiyegoro OA, Stenström TA, Okoh AI.","Antimicrob Resist Infect Control. 2020 Mar 12
6) Antibiotic resistance determinants among carbapenemase producing bacteria isolated from wastewaters of Kathmandu, Nepal","C SK, Khanal S, Joshi TP, Khadka D, Tuladhar R, Joshi DR.","Environ Pollut. 2024 Feb 15
7) Antimicrobial resistance of Pseudomonas spp. isolated from wastewater and wastewater-impacted marine coastal zone","Luczkiewicz A, Kotlarska E, Artichowicz W, Tarasewicz K, Fudala-Ksiazek S.","Environ Sci Pollut Res Int. 2015 Dec
8) Antimicrobial-Resistant Escherichia coli from Environmental Waters in Northern Colorado","Haberecht HB, Nealon NJ, Gilliland JR, Holder AV, Runyan C, Oppel RC, Ibrahim HM, Mueller L, Schrupp F, Vilchez S, Antony L, Scaria J, Ryan EP.","J Environ Public Health. 2019 Feb 18
9) 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., & Cerar, T. (2020). Whole genome sequencing characterization of Slovenian carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae, including OXA-48 and NDM-1 producing outbreak isolates. PLoS ONE, 15(4), e0231503. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231503
10) Characterization of Acinetobacter baumannii from water and sludge line of secondary wastewater treatment plant","Higgins PG, Hrenovic J, Seifert H, Dekic S.","Water Res. 2018 Sep 1
11) Characterization of carbapenem resistance in environmental samples and Acinetobacter spp. isolates from wastewater and river water in Poland","Hubeny J, Korzeniewska E, Buta-Hubeny M, Zieliński W, Rolbiecki D, Harnisz M.","Sci Total Environ. 2022 May 20
12) Characterization of β-Lactamases and Multidrug Resistance Mechanisms in Enterobacterales from Hospital Effluents and Wastewater Treatment Plant","Mutuku C, Melegh S, Kovacs K, Urban P, Virág E, Heninger R, Herczeg R, Sonnevend Á, Gyenesei A, Fekete C, Gazdag Z.","Antibiotics (Basel). 2022 Jun 7
13) 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., & Stoesser, N. (2022). Systematic review of

wastewater surveillance of antimicrobial resistance in human populations. Environment International, 162, 107171. https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107171
14) Clinically relevant sequence types of carbapenemase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae detected in Finnish wastewater in 2021-2022","Heljanko V, Tyni O, Johansson V, Virtanen JP, Räisänen K, Lehto KM, Lipponen A, Oikarinen S, Pitkänen T
15) Clonal complexes of carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae recovered from community sewage","Oliveira PM, Faria-Junior C, Silva DM, Matos LF, Pereira AL.","J Water Health. 2023 Jan
16) Collignon P, Beggs JJ, Walsh TR, Gandra S, Laxminarayan R. Anthropological and socioeconomic factors contributing to global antimicrobial resistance: a univariate and multivariable analysis. Lancet Planet Health. 2018 Sep;2(9):e398-e405. doi: 10.1016/S2542-5196(18)30186-4. PMID: 30177008.
17) Detection of carbapenemase-producing, hypervirulent Klebsiella spp. in wastewater and their potential transmission to river water and WWTP employees,"Rolbiecki D, Harnisz M, Korzeniewska E, Buta M, Hubeny J, Zieliński W.","Int J Hyg Environ Health. 2021 Aug
18) Detection of metallo-beta-lactamase-producing genes bla(SPM) and bla(NDM) in Pseudomonas aeruginosa isolated from wastewater in Southern Brazil","Monteagudo de Barros V, da Rocha BS, Rhoden J, Stein JF, Picoli SU, Rigotto C.","J Water Health. 2024 Apr
19) Detection of multi-drug resistant Escherichia coli in the urban waterways of Milwaukee, WI","Kappell AD, DeNies MS, Ahuja NH, Ledeboer NA, Newton RJ, Hristova KR.","Front Microbiol. 2015 Apr 29
20) Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacterales through wastewater and gulls at a wastewater treatment plant in Sweden","Woksepp H, Karlsson K, Börjesson S, Karlsson Lindsjö O, Söderlund R, Bonnedahl J.","Sci Total Environ. 2023 Aug 15
21) Distribution and characteristics of carbapenem-resistant and extended-spectrum β-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli in hospital effluents, sewage treatment plants, and river water in an urban area of Japan","Azuma T, Uchiyama T, Zhang D, Usui M, Hayashi T.","Sci Total Environ. 2022 Sep 15
22) Emergence and dissemination of epidemic-causing OXA-244 carbapenemase-producing Escherichia coli ST38 through hospital sewage in Norway, 2020-2022","Grevskott DH, Radisic V, Salvà-Serra F, Moore ERB, Akervold KS, Victor MP, Marathe NP.","J Hosp Infect. 2024 Mar
23) Emergence of Carbapenemase Genes in Gram-Negative Bacteria Isolated from the Wastewater Treatment Plant in A Coruña, Spain","Nasser-Ali M, Aja-Macaya P, Conde-Pérez K, Trigo-Tasende N, Rumbo-Feal S, Fernández-González A, Bou G, Poza M, Vallejo JA.","Antibiotics (Basel). 2024 Feb 17
24) Emergence of Oxacillinases in Environmental Carbapenem-Resistant Acinetobacter baumannii Associated with Clinical Isolates","Goic-Barisic I, Hrenovic J, Kovacic A, Musić MŠ.","Microb Drug Resist. 2016 Oct
25) Environmental and Pathogenic Carbapenem Resistant Bacteria Isolated from a Wastewater Treatment Plant Harbour Distinct Antibiotic Resistance Mechanisms","Oliveira M, Leonardo IC, Nunes M, Silva AF, Barreto Crespo MT.","Antibiotics (Basel). 2021 Sep 16
26) Environmental spreading of clinically relevant carbapenem-resistant gram-negative bacilli: the occurrence of bla(KPC-or-NDM) strains relates to local hospital activities","Pereira AL, de Oliveira PM, Faria-Junior C, Alves EG, de Castro E Caldo Lima GR, da Costa Lamounier TA, Haddad R, de Araújo WN.","BMC Microbiol. 2022 Jan 4
27) European Centre for Disease Prevention and Control. (2024). Country profiles: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2023–2024. https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/Country_profiles_2023_2024_1.pdf

28) Extended spectrum beta-lactamases in Escherichia coli from municipal wastewater","Čornejová T, Venglovsky J, Gregova G, Kmetova M, Kmet V.","Ann Agric Environ Med. 2015
29) Frequency and diversity of carbapenemase-producing Enterobacterales recovered from untreated wastewater impacted by selective media containing cefotaxime and meropenem in Ohio, USA","Too RJ, Gitao GC, Bebora LC, Mollenkopf DF, Kariuki SM, Wittum TE.","PLoS One. 2023 Feb 22
30) Galičič A, Kranjec N, Fafangel M. Epidemiološko spremljanje povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadnih vodah v Sloveniji v letu 2022. Epidemiološko spremljanje povzročiteljev nalezljivih bolezni v odpadnih vodah v Sloveniji. 2023:1-10. Dostopno na: https://nijz.si/wp-content/uploads/2023/07/Epidemiolosko-spremljanje-povzrociteljev-nalezljivih-bolezni-v-odpadnih-vodah-v-Sloveniji-v-letu-2022.pdf
31) Genomic characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenem-resistant Escherichia coli from urban wastewater in Australia","Rahman Z, McLaws ML, Thomas T.","Microbiologyopen. 2024 Apr
32) Genomic insight into transmission mechanisms of carbapenem-producing Citrobacter spp. isolates between the WWTP and connecting rivers","Wu T, Zou H, Xia H, Zhou Z, Zhao L, Meng M, Li Q, Guan Y, Li X.","Ecotoxicol Environ Saf. 2023 Jun 17
33) Genomic surveillance of Escherichia coli in municipal wastewater treatment plants as an indicator of clinically relevant pathogens and their resistance genes","Raven KE, Ludden C, Gouliouris T, Blane B, Naydenova P, Brown NM, Parkhill J, Peacock SJ.","Microb Genom. 2019 May
34) Gholipour, S., Shamsizadeh, Z., Halabowski, D., Gwenzi, W., & Nikaeen, M. (2024). Combating antibiotic resistance using wastewater surveillance: Significance, applications, challenges, and future directions. *Science of the Total Environment, 908*, 168056. https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168056
35) Gram-negative bacteria carrying β-lactamase encoding genes in hospital and urban wastewater in Brazil","Zagui GS, de Andrade LN, Moreira NC, Silva TV, Machado GP, da Costa Darini AL, Segura-Muñoz SI.","Environ Monit Assess. 2020 May 17
36) Hendriksen RS, Munk P, Njage P, van Bunnik B, McNally L, Lukjancenko O, Röder T, Nieuwenhuijse D, Pedersen SK, Kjeldgaard J, Kaas RS, Clausen PTLC, Vogt JK, Leekitcharoenphon P, van de Schans MGM, Zuidema T, de Roda Husman AM, Rasmussen S, Petersen B; Global Sewage Surveillance project consortium; Amid C, Cochrane G, Sicheritz-Ponten T, Schmitt H, Alvarez JRM, Aidara-Kane A, Pamp SJ, Lund O, Hald T, Woolhouse M, Koopmans MP, Vigre H, Petersen TN, Aarestrup FM. Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. Nat Commun. 2019 Mar 8;10(1):1124. doi: 10.1038/s41467-019-08853-3. PMID: 30850636; PMCID: PMC6408512.
37) High diversity of the emerging pathogen Acinetobacter baumannii and other Acinetobacter spp. in raw manure, biogas plants digestates, and rural and urban wastewater treatment plants with system specific antimicrobial resistance profiles","Pulami D, Kämpfer P, Glaeser SP.","Sci Total Environ. 2023 Feb 10
38) High frequency of gram-negative bacilli harboring bla(KPC-2) in the different stages of wastewater treatment plant: A successful mechanism of resistance to carbapenems outside the hospital settings","Rodríguez EA, Aristizábal-Hoyos AM, Morales-Zapata S, Arias L, Jiménez JN.","J Environ Manage. 2020 Oct 1
39) High prevalence of Escherichia coli co-harboring conjugative plasmids with colistin- and carbapenem resistance genes in a wastewater treatment plant in China","Wang D, Zou H, Zhao L, Li Q, Meng M, Li X, Berglund B.","Int J Hyg Environ Health. 2023 May

40) KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harbouring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant","Galler H, Feierl G, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Grisold AJ, Luxner J, Zarfel G.","Clin Microbiol Infect. 2014 Feb
41) Longitudinal monitoring reveals the emergence and spread of bla(GES-5)-harboring carbapenem-resistant Klebsiella quasipneumoniae in a Hong Kong hospital wastewater discharge line","Liu X, Wong MKL, Zhang D, Chan DCL, Chan OSK, Chan GPL, Shum MH, Peng Y, Lai CKC, Cowling BJ, Zhang T, Fukuda K, Lam TT, Tun HM.","Sci Total Environ. 2023 Dec 10
42) Monitoring viruses and beta-lactam resistance genes through wastewater surveillance during a COVID-19 surge in Suwon, South Korea","Singh R, Ryu J, Park SS, Kim S, Kim K.","Sci Total Environ. 2024 Apr 20
43) Multidrug resistance and diversity of resistance profiles in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli throughout a wastewater treatment plant in Colombia","Rodríguez EA, Garzón LM, Gómez ID, Jiménez JN.","J Glob Antimicrob Resist. 2020 Sep
44) Multidrug-resistant Enterobacter spp. in wastewater and surface water: Molecular characterization of β-lactam resistance and metal tolerance genes","Zagui GS, Moreira NC, Santos DV, Paschoalato CFPR, Sierra J, Nadal M, Domingo JL, Darini ALC, Andrade LN, Segura-Muñoz SI.","Environ Res. 2023 Sep 15
45) Multidrug-resistant ESBL-producing Klebsiella pneumoniae complex in Czech hospitals, wastewaters and surface waters","Davidova-Gerzova L, Lausova J, Sukkar I, Nechutna L, Kubackova P, Krutova M, Bezdicek M, Dolejska M.","Antimicrob Resist Infect Control. 2024 Nov 26
46) Multiple β-Lactam Resistance Gene-Carrying Plasmid Harbored by Klebsiella quasipneumoniae Isolated from Urban Sewage in Japan","Suzuki Y, Ida M, Kubota H, Ariyoshi T, Murakami K, Kobayashi M, Kato R, Hirai A, Suzuki J, Sadamasu K.","mSphere. 2019 Sep 25
47) Municipal Wastewaters Carry Important Carbapenemase Genes Independent of Hospital Input and Can Mirror Clinical Resistance Patterns","Teban-Man A, Szekeres E, Fang P, Klümper U, Hegedus A, Baricz A, Berendonk TU, Pârvu M, Coman C.","Microbiol Spectr. 2022 Apr 27
48) Munk, P.; Brinch, C.; Møller, F. D.; Petersen, T. N.; Hendriksen, R. S.; Seyfarth, A. M.; Kjeldgaard, J. S.; Svendsen, C. A.; van Bunnik, B.; Berglund, F.; Larsson, D. G. J.; Koopmans, M.; Woolhouse, M.; Aarestrup, F. M. Genomic Analysis of Sewage from 101 Countries Reveals Global Landscape of Antimicrobial Resistance. Nat Commun 2022, 13 (1), 7251. https://doi.org/10.1038/s41467-022-34312-7.
49) Nacionalni inštitut za javno zdravje. (2023). Karbapenemaze – proti antibiotikom odporne bakterije z encimi ESBL in/ali karbapenemazami. Nalezljive bolezni od A do Ž. https://nijz.si/nalezljive-bolezni/nalezljive-bolezni-od-a-do-z/karbapenemaze-proti-antibiotikom-odporne-bakterije-z-encimi-esbl-in-ali-karbapenemazami/
50) Nacionalni inštitut za javno zdravje. (2024). *Pilotno epidemiološko spremljanje na karbapeneme odpornih bakterij v odpadnih vodah v Sloveniji (V3-24040)*. https://nijz.si/projekti/pilotno-epidemiolosko-spremljanje-na-karbapeneme-odpornih-bakterij-v-odpadnih-vodah-v-sloveniji-v3-24040/
51) Occurrence and persistence of carbapenemases genes in hospital and wastewater treatment plants and propagation in the receiving river","Proia L, Anzil A, Borrego C, Farrè M, Llorca M, Sanchis J, Bogaerts P, Balcázar JL, Servais P.","J Hazard Mater. 2018 Sep 15
52) Occurrence of Klebsiella pneumoniae ST244 and ST11 extensively drug-resistant producing KPC, NDM, OXA-370 in wastewater, Brazil","Montenegro K, Flores C, Nascimento APA, Farias BO, Brito ASG, Magaldi M, Gimenez A, de Filippis I, Clementino MM, Bianco K, Saggioro E, Barrocas P.","J Appl Microbiol. 2023 Jul 4

53) O'Keeffe, J. (2021). Wastewater-based epidemiology: Current uses and future opportunities as a public health surveillance tool. Environmental Health Review, 64(3), 44–52. https://doi.org/10.5864/d2021-015pubs.ciphi.ca+4pubs.ciphi.ca+4pubs.ciphi.ca+4
54) Oliveira, M., Nunes, M., Barreto Crespo, M. T., & Silva, A. F. (2020). The environmental contribution to the dissemination of carbapenem and (fluoro)quinolone resistance genes by discharged and reused wastewater effluents: The role of cellular and extracellular DNA. *Water Research, 182*, 116011. https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116011
55) Persistent transmission of carbapenem-resistant, hypervirulent Klebsiella pneumoniae between a hospital and urban aquatic environments","Zou H, Zhou Z, Berglund B, Zheng B, Meng M, Zhao L, Zhang H, Wang Z, Wu T, Li Q, Li X.","Water Res. 2023 Aug 15
56) Pokorná, L. REPARES (Research Platform on Antibiotic Resistance Spread through Wastewater Treatment Plants). https://repares.vscht.cz/project.
57) Prevalence and Fate of Carbapenemase Genes in a Wastewater Treatment Plant in Northern China","Yang F, Mao D, Zhou H, Luo Y.","PLoS One. 2016 May 26
58) Prevalence of a carbapenem-resistance gene (KPC), vancomycin-resistance genes (van A/B) and a methicillin-resistance gene (mecA) in hospital and municipal sewage in a southwestern province of Saudi Arabia","Basode VK, Abdulhaq A, Alamoudi MUA, Tohari HM, Quhal WA, Madkhali AM, Hobani YH, Hershan AA.","BMC Res Notes. 2018 Jan 15
59) Prevalence of Antibiotic-Resistant Bacteria ESKAPE among Healthy People Estimated by Monitoring of Municipal Wastewater","Nishiyama M, Praise S, Tsurumaki K, Baba H, Kanamori H, Watanabe T.","Antibiotics (Basel). 2021 Apr 26
60) Prevalence of enteric opportunistic pathogens and extended-spectrum cephalosporin- and carbapenem-resistant coliforms and genes in wastewater from municipal wastewater treatment plants in Croatia","Puljko A, Milaković M, Križanović S, Kosić-Vukšić J, Babić I, Petrić I, Maravić A, Jelić M, Udiković-Kolić N.","J Hazard Mater. 2022 Apr 5
61) Queenan, A. M., & Bush, K. (2007). Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. Clinical Microbiology Reviews, 20(3), 440–458. https://doi.org/10.1128/CMR.00001-07
62) Resistance profiles and diversity of β-lactamases in Escherichia coli strains isolated from city-scale sewage surveillance in Bergen, Norway mimic clinical prevalence","Grevskott DH, Ghavidel FZ, Svanevik CS, Marathe NP.","Ecotoxicol Environ Saf. 2021 Dec 15
63) Rodríguez, E. A., Aristizábal-Hoyos, A. M., Morales-Zapata, S., Arias, L., & Jiménez, J. N. (2020). High frequency of gram-negative bacilli harboring blaKPC-2 in the different stages of wastewater treatment plant: A successful mechanism of resistance to carbapenems outside the hospital settings. Science of The Total Environment, 748, 141325. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32778323/
64) Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial resistance: A growing serious threat for global public health. Healthcare, 11(13), 1946. https://doi.org/10.3390/healthcare11131946
65) Surveillance of antibiotic resistant Escherichia coli in human populations through urban wastewater in ten European countries","Huijbers PMC, Larsson DGJ, Flach CF.","Environ Pollut. 2020 Jun
66) Teban-Man A, Szekeres E, Fang P, Klümper U, Hegedus A, Baricz A, Berendonk TU, Pârvu M, Coman C. Municipal Wastewaters Carry Important Carbapenemase Genes Independent of Hospital Input and Can Mirror Clinical Resistance Patterns. Microbiol Spectr. 2022 Apr 27;10(2):e0271121. doi: 10.1128/spectrum.02711-21. Epub 2022 Mar 2. PMID: 35234513; PMCID: PMC8941857.
67) The environmental contribution to the dissemination of carbapenem and (fluoro)quinolone resistance genes by discharged and reused wastewater effluents: The role of cellular and

extracellular DNA","Oliveira M, Nunes M, Barreto Crespo MT, Silva AF.","Water Res. 2020 Sep 1
68) The fate of carbapenem-resistant bacteria in a wastewater treatment plant","Hrenovic J, Ivankovic T, Ivekovic D, Repec S, Stipanicev D, Ganjto M.","Water Res. 2017 Dec 1
69) Tracing clinically-relevant antimicrobial resistances in Acinetobacter baumannii-calcoaceticus complex across diverse environments: A study spanning clinical, livestock, and wastewater treatment settings","Savin M, Sib E, Heinemann C, Eichel VM, Nurjadi D, Klose M, Andre Hammerl J, Binsker U, Mutters NT.","Environ Int. 2024 Apr
70) Tracking Klebsiella pneumoniae carbapenemase gene as an indicator of antimicrobial resistance dissemination from a hospital to surface water via a municipal wastewater treatment plant","Loudermilk EM, Kotay SM, Barry KE, Parikh HI, Colosi LM, Mathers AJ.","Water Res. 2022 Apr 15
71) Transmission of clones of carbapenem-resistant Escherichia coli between a hospital and an urban wastewater treatment plant","Wang D, Berglund B, Li Q, Shangguan X, Li J, Liu F, Yao F, Li X.","Environ Pollut. 2023 Nov 1
72) Treated wastewater: A hotspot for multidrug- and colistin-resistant Klebsiella pneumoniae","Di Cesare A, Cornacchia A, Sbaffi T, Sabatino R, Corno G, Cammà C, Calistri P, Pomilio F.","Environ Pollut. 2024 Oct 15
73) VIM-1-producing Enterobacter asburiae with mobile colistin resistance genes from wastewaters","Sukkar I, Valcek A, Dolejska M.","BMC Genomics. 2024 Sep 17
74) Wastewater is a reservoir for clinically relevant carbapenemase- and 16s rRNA methylase-producing Enterobacteriaceae","Zurfluh K, Bagutti C, Brodmann P, Alt M, Schulze J, Fanning S, Stephan R, Nüesch-Inderbinen M.","Int J Antimicrob Agents. 2017 Sep
75) Wastewater Surveillance Detected Carbapenemase Enzymes in Clinically Relevant Gram-Negative Bacteria in Helsinki, Finland
76) World Health Organization. (2019). Ten threats to global health in 2019. https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019
77) β-lactam resistance genes in bacteriophage and bacterial DNA from wastewater, river water, and irrigation water in Washington State","Zhang A, Call DR, Besser TE, Liu J, Jones L, Wang H, Davis MA.","Water Res. 2019 Sep 15

8. Priloge

8.1 Metode dela

Pregledali smo raziskave, ki preučujejo prisotnost bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi, vzorčeni na vtoku v komunalno čistilno napravo (KČN). V pregled literature smo vključili raziskave, ki so obravnavale bakterije, odporne proti karbapenemom, ter/ali prisotnost karbapenemaz oziroma genov za karbapenemaze.

Sistematični pregled literature smo izvedli v podatkovni bazi PubMed. Iskalni niz je bil pripravljen v angleščini in je vključeval ključne besede ter Boolove operaterje: "((wastewater) OR (waste water) OR (sewer) OR (sewage) OR (treatment plants)) AND ((Klebsiella Pneumoniae) OR (K. pneumoniae) OR (Carbapenem-resistant Enterobacterales) OR (CRE) OR (carbapenemase-producing Enterobacteriaceae) OR (CPE) OR (carbapenem resistance) OR (carbapenemases) OR (beta-lactam resistance) OR (carbapenem) OR (Carbapenem resistant Acinetobacter) OR (carbapenem resistant Pseudomonas aeruginosa) OR (CRA) OR (CRPs)) AND ((surveillance) OR (wastewater-based surveillance) OR (monitoring) OR (outbreak) OR (prevalence) OR (survey) OR (detection)). Iskanje literature smo izvedli enkrat in je vključevalo vse zadetke iz podatkovne baze PubMed do 27. 11. 2024.

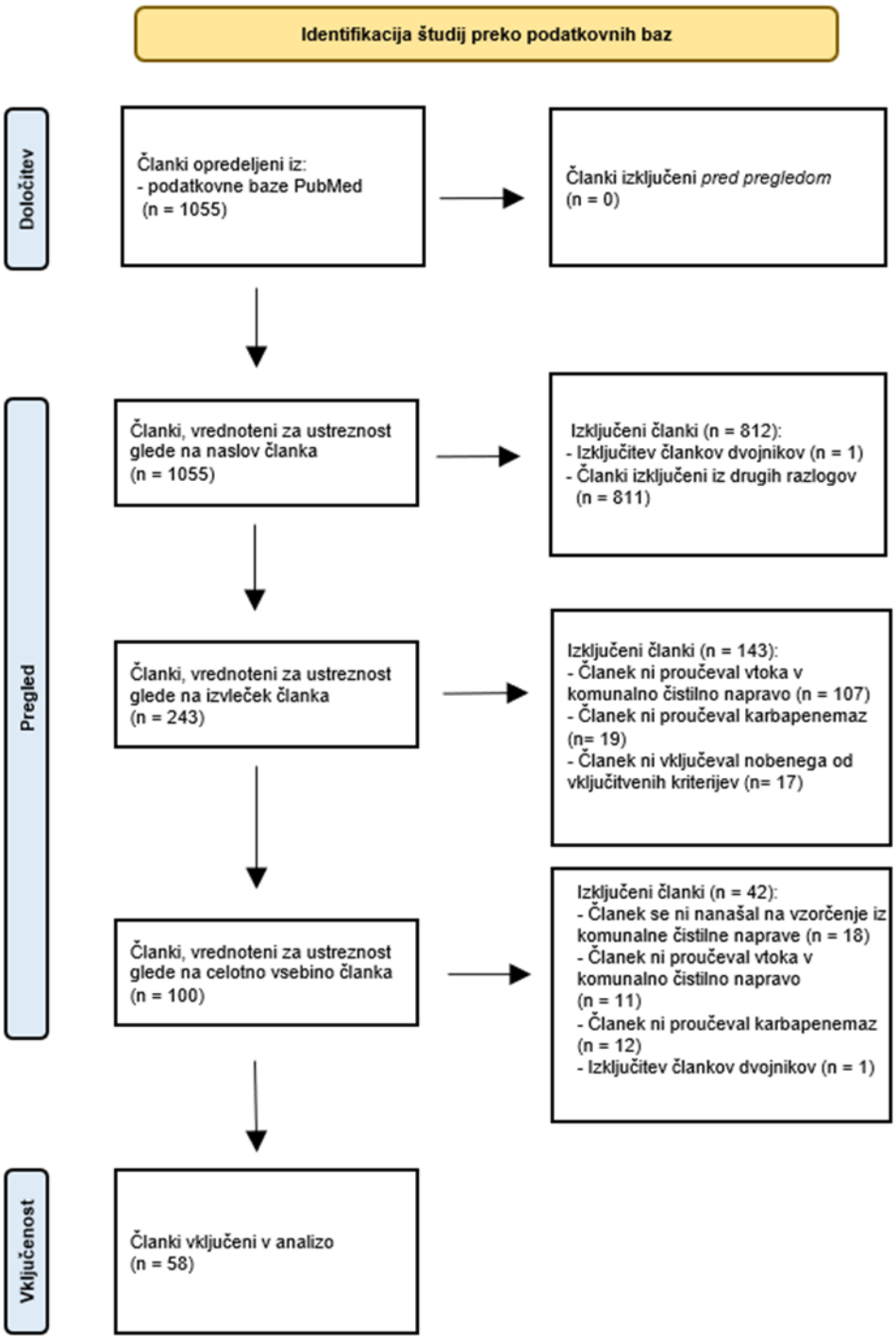
Pregled zadetkov izbranega iskalnega niza je bil opravljen v petih korakih in skladno s Prednostnimi poročili za sistematične preglede in meta-analizo (Preferred Reporting Items for Systematic review and Meta-Analysis protocols – PRISMA) (Page et al., 2021).

Izbor literature je bil izveden postopno po korakih s strani avtorjev te študije. V prvem koraku smo preverili ustreznost člankov glede na njihov naslov, z upoštevanjem vključitvenega kriterija, da se članek nanaša na spremljanje bakterij s karbapenemazami v odpadni vodi. V naslednjem koraku smo izvedli pregled izvlečka članka. Vsak avtor je članku dodelil oceno »Da« ali »Ne«, glede na vključitvene kriterije (Slika 1). To je bilo izvedeno za vsak korak sistematičnega pregleda literature, med posameznimi koraki pa so se vsi avtorji sestali in razpravljali o svojih odločitvah, da bi dosegli skupno soglasje o tem, katere članke vključiti v pregled. Poleg tega smo v zadnjem koraku izvedli pregled celotne vsebine člankov, da bi preverili njihovo ustreznost.

Iz člankov, ki smo jih vključili v končni izbor smo pridobili podatke o vrsti preučevanih bakterij, odpornosti proti karbapenemom, državi izvajanja raziskave, obdobju spremljanja, lokaciji vzorčenja, fazi vzorčenja (tekoča, tekoča in trdna), številu vzorčnih mest, pogostosti vzorčenja, uporabljenih metodah vzorčenja, količini zbranih vzorcev za analizo, načinih uporabe rezultatov ter o predlaganih javnozdravstvenih ukrepih.

V izbor člankov za pregled literature je bilo iz podatkovne baze PubMed vključenih 1055 zadetkov iskalnega niza, ki so bili objavljeni do 27. 11. 2024. Skupno je bilo v naš končni izbor vključenih 58 člankov z 58 relevantnimi raziskavami (Slika 1).

Slika 1: Diagram poteka izbora člankov za sistematični pregled literature.



8.2 Analiza podatkov

Za lažjo primerjavo podatkov je bilo število raziskav pretvorjeno v deleže. Izbrane raziskave smo analizirali z namenom pridobitve podatkov o:

- povzročiteljih,
- preučevani rezistenci proti karbapenemom,
- izsledkih in predlaganih javnozdravstvenih ukrepih,
- državah izvajanja raziskav,
- obdobju spremljanja,
- lokaciji vzorčenja (npr. komunalna čistilna naprava (KČN), površinske vode, kanalizacijske vode…)
- fazi vzorčenja (tekoča ali trdna in tekoča),
- številu vzorčnih mest,
- pogostosti vzorčenja,
- uporabljenih metodah vzorčenja,
- količini zbranih vzorcev za analizo (volumen vzorca).

Predstavljeni podatki o spremljanju bakterij, odpornih proti karbapenemom, v odpadni vodi so omejeni na raziskave, pridobljene z našim pregledom literature.