

Commissione internazionale  
per la protezione delle acque italo-svizzere



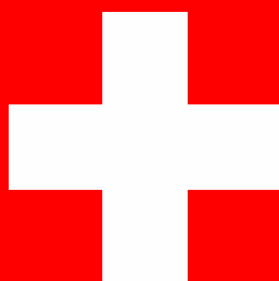
**PROGRAMMA 2019-2021**

**RAPPORTO ANNUALE 2019**

**RICERCA E MONITORAGGIO DI DETERMINATI  
GENICI DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI NELLE  
ACQUE DEL CERESIO E DI ALCUNI IMMISSARI**

*a cura di*  
Nicola Solcà

Bellinzona, 2020





Commissione internazionale per la  
protezione delle acque italo-svizzere

**Lago di Lugano:**

**Ricerca e monitoraggio di determinati genici di  
resistenza agli antibiotici nelle acque del Ceresio e  
di alcuni immissari**

Programma 2019-2021

**Rapporto annuale 2019**

*a cura di Nicola Solcà*

Bellinzona 2019



## Abstract

The emergence and the increase of antibiotic resistant microorganisms is a growing threat to global public health. The environment is an important reservoir of antibiotic resistant genes (ARGs) and of resistant bacteria (ARBs) and it is currently considered to play a relevant role in their dissemination. The environmental monitoring that characterizes the occurrence and source of ARGs and ARBs is therefore particularly important to address the challenge of antimicrobial resistance for health risk assessment and mitigation strategies.

During 2019, we investigated the diffusion of antibiotic resistance determinants and of antibiotic resistant bacteria in water samples collected from the Lake of Lugano and some tributary rivers, namely Veduggio, Cassarate and Magliasina. Five antibiotics resistance genes, that confers resistance to the major classes of antibiotics used in clinical and veterinary medicine ( $\beta$ -lactams, macrolides, tetracycline, quinolones and sulphonamides), the *int1* gene, considered a proxy of bacterial resistance, and the 16S rDNA gene were quantified by qPCR. Each sample was also analysed for isolating and identifying multi-resistant bacteria.

Results highlight that *int1* and almost all the resistant genes investigated could be quantified in nearly every sample. Their presence was particularly relevant in the river Veduggio, sampled downstream of the outlet of the wastewater treatment plant of Bioggio. This river was also the most contaminated by resistant bacteria.

The comparison between the 2019 and the 2016 campaigns of samplings indicates a substantial data stability for the river Magliasina, an improvement of the water quality referred to ARGs and ARBs in the river Cassarate and a negative trend in the river Veduggio. The wastewater treatment plant influencing the river Cassarate was put out of order in 2017, whereas the harmful impact of the outlet of the Bioggio installation on the river Veduggio was confirmed. The load of resistance determinants in the Lake of Lugano water remained rather stable. The influence of the river inputs on the water body is mitigated by the dilution effect and could probably be detected only over a longer time.

Our results as those of others worldwide confirm the role played by the wastewater plants as source of ARGs and ARBs contaminating the water environment. Although these implants already reduce substantially the load of bacteria that can be transmitted through the water cycle, they can also act as proper environment to the development of resistances and the release of antibiotic residues, ARGs and ARBs. The removal of the discharge of these installations leads to a clear decrease in the release of the resistance determinants, suggesting that a positive environmental response can take place in short times. The wastewater treatment plants can therefore represent a suitable ring of the resistance spread chain to act on to implement reduction and containment.

## **Indice**

### **1 Introduzione generale**

### **2. Resistenza agli antibiotici – aspetti generali e ambiente acquatico**

### **3. Materiali e metodi**

#### 3.1. Punti di campionamento e prelievi

#### 3.2. Analisi molecolari per l'identificazione e la quantificazione dei geni di resistenza

#### 3.3. Indagini batteriologiche

### **4. Risultati del monitoraggio del 2019**

#### 4.1 Identificazione e quantificazione di determinanti genici di resistenza agli antibiotici

*Presenza/assenza di determinati genici di resistenza*

*Abbondanza assoluta dei geni di resistenza e del gene intl*

*Abbondanza relativa dei geni di resistenza e del gene intl*

#### 4.2 Indagini batteriologiche

*Conte batteriche totali*

*Isolamento e identificazione di batteri resistenti agli antibiotici*

### **5. Confronto dei risultati delle analisi quantitative 2016 e 2019**

#### 5.1 Identificazione e quantificazione di determinanti genici di resistenza agli antibiotici

*Abbondanza assoluta dei geni di resistenza*

*Abbondanza relativa dei geni di resistenza*

### **6. Conclusioni**

### **7. Bibliografia**

### **8. Allegati**

## 1. Introduzione generale

*Nicola Solcà*

*Sezione per la protezione dell'aria, dell'acqua e del suolo – UGRAS, Bellinzona*

L'insorgenza di batteri resistenti è tra i problemi sanitari globali più rilevanti dei nostri tempi. Per ridurre l'incremento delle resistenze, la Svizzera ha lanciato nel 2015 una strategia nazionale contro le resistenze agli antibiotici (StAR), che vuole affrontare il problema attraverso un approccio integrato "one health", tenendo debito conto di misure e ripercussioni in ambito umano, animale, agricolo e ambientale.

I meccanismi, grazie ai quali i batteri possono sviluppare resistenze agli antibiotici, sono molteplici e includono anche fenomeni presenti in natura. I batteri che acquisiscono queste informazioni genetiche sono potenzialmente in grado di trasferirle ai propri discendenti oppure ad altri batteri, inclusi quelli patogeni per l'uomo o per gli animali. Nei luoghi di maggiore impiego o concentrazione di antibiotici, i residui nell'ambiente possono stimolare l'apparizione di fenomeni di resistenza.

Per il comparto ambientale, la StAR prevede al momento la necessità di acquisire nuove conoscenze attraverso diversi programmi di approfondimento scientifico e un numero ancora limitato di misure d'intervento, la principale delle quali riguarda l'ammodernamento d'importanti impianti di depurazione delle acque reflue (IDA). Nonostante gli IDA riducano già oggi sostanzialmente il carico di batteri che può venire trasmesso attraverso il ciclo delle acque, essi possono anche fungere, nel percorso attraverso il ciclo delle acque, da ambiente propizio allo sviluppo di resistenze e al rilascio di residui di antibiotici. I risultati delle campagne CIP AIS degli scorsi anni, così come quelli presentati in questo rapporto e altre evidenze scientifiche, confermano il ruolo degli IDA.

Un aspetto molto interessante della ricerca qui presentata, vista la dismissione a partire dal 2017 dell'IDA di Cadro sul fiume Cassarate, è il confronto tra i dati del 2016 e quelli del 2019. I risultati mostrano come la rimozione dello scarico di questo impianto abbia portato a una chiara diminuzione delle resistenze nelle acque del Cassarate, suggerendo quindi che una risposta ambientale positiva può avvenire, proprio agendo sugli impianti di depurazione delle acque reflue e come previsto dalla StAR, in tempi ristretti.

È interessante anche notare come gli organi federali preposti alla valutazione del rischio e alla determinazione di standard di qualità ambientali (SQA) per i microinquinanti organici nell'ambiente – in particolare il *Centro svizzero d'ecotossicologia applicata* – stiano promuovendo degli approfondimenti sul rischio legato ai residui di antibiotici nell'ambiente, considerando accanto agli effetti ecotossicologici più tradizionali anche i possibili risvolti nell'induzione allo sviluppo di resistenze. Primi risultati mostrano come per la maggior parte degli antibiotici gli SQA siano sufficientemente protettivi anche per l'ambito della resistenza batterica, ma con rilevanti eccezioni. Quindi, accanto a ulteriori approfondimenti tutt'ora in corso, sarà verosimilmente necessario considerare attentamente anche il tema della resistenza batterica nella procedura di calcolo degli SQA e, di riflesso, anche negli standard di qualità di trattamento e gestione delle acque reflue.

In conclusione, la ricerca descritta in questo rapporto si inserisce nella strategia StAR per meglio comprendere lo sviluppo e la diffusione di popolamenti di batteri resistenti nell'ambiente. I risultati si integrano inoltre nel quadro complessivo delle conoscenze raccolte sul Ceresio dalla CIP AIS negli ultimi 8 anni, in relazione alla pressione antropica esercitata dai microinquinanti,

rispettivamente dalle attività umane che ne sono all'origine. Le campagne 2016 e 2019 confermano il ruolo delle acque quale veicolo di diffusione ambientale di geni di resistenza e gli IDA come opportuno anello della catena per implementare, in questo ambito, interventi di riduzione e contenimento. Per una buona riuscita della strategia federale, non sarà tuttavia possibile prescindere da una decisiva riduzione del consumo di antibiotici alla fonte: nonostante diversi progressi, molti miglioramenti in questo ambito devono ancora essere realizzati. Per un monitoraggio più regolare in ambito CIP AIS sul Ceresio, le misurazioni sulla presenza di geni di resistenza e batteri resistenti verranno in futuro condotte all'interno della Sezione 1, che tratta da diversi anni questo tema per il lago Maggiore.



## **Ricerca e monitoraggio di determinanti genici di resistenza agli antibiotici nelle acque del Lago Ceresio e di alcuni fiumi immissari**

*Antonella Demarta e Federica Mauri*

*Scuola universitaria professionale della svizzera italiana – DACD, LMA, Bellinzona*

### **2. Resistenza agli antibiotici – aspetti generali e ambiente acquatico**

La presenza di antibiotici nelle acque è uno dei problemi ambientali emergenti che possono mettere a rischio la salute dell'uomo e degli ecosistemi. Infatti, queste sostanze, anche se in concentrazioni sub-letali e difficilmente quantificabili, possono sul lungo termine promuovere direttamente o indirettamente l'insorgenza di antibiotico-resistenza nei batteri. L'acqua può perciò diventare un serbatoio di popolazioni batteriche resistenti agli antibiotici e di geni di resistenza. È già stato dimostrato che questi ultimi possono essere trasferiti a batteri patogeni che in ambiente ospedaliero sono causa di decine di migliaia di decessi l'anno in Europa e USA con ingenti costi per i sistemi sanitari nazionali (Rodriguez-Mozaz et al. 2015; OMS 2018).

L'incremento dell'antibiotico resistenza può essere controllato unicamente attraverso un'azione coordinata che consideri l'educazione ad un utilizzo corretto degli antibiotici e lo sviluppo di nuove sostanze attive ma anche la conoscenza della diffusione dell'antibiotico resistenza nell'ambiente e delle strategie attuabili per la sua riduzione. Il monitoraggio ambientale è perciò fondamentale per il controllo della diffusione dell'antibiotico resistenza. Inoltre, la continuità nel tempo di questo tipo di indagine permette di acquisire un'immagine complessiva della diffusione dell'antibiotico resistenza nell'ecosistema e fornisce anche dati con evidenti applicazioni pratiche quali, ad esempio, l'impatto delle strategie messe in atto per la riduzione dei microinquinanti.

Dalla campagna di monitoraggio CIP AIS del 2016 (CIP AIS 2017), è emerso che i geni di resistenza agli antibiotici (geni ABR) comunemente utilizzati in clinica e veterinaria sono presenti nei batteri del Lago di Lugano e specialmente dei fiumi immissari influenzati da impianti di depurazione (IDA). In base a questi risultati e vista l'importanza del monitoraggio ambientale per quanto riguarda le strategie di limitazione dell'antibiotico resistenza, nel 2019 è stato deciso di eseguire nuovamente le indagini sulle acque del Lago di Lugano e degli immissari. Rispetto alla Campagna CIP AIS del 2016, sono stati effettuati alcuni cambiamenti e miglioramenti che verranno indicati e motivati di seguito.

### 3. Materiali e metodi

#### 3.1. Punti di campionamento e prelievi

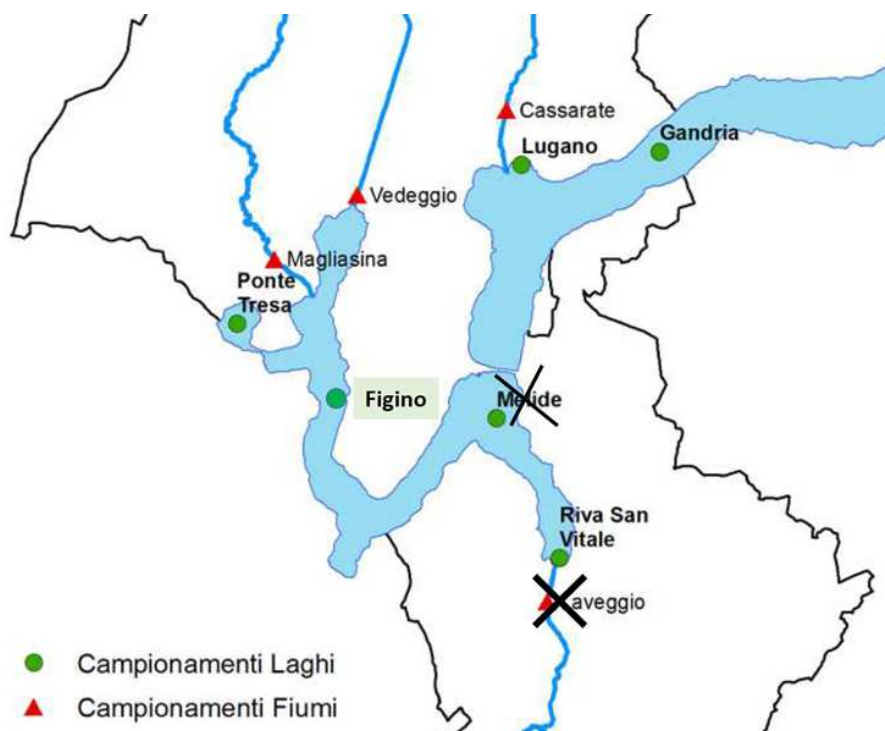
Il monitoraggio delle acque è iniziato nel mese di gennaio del 2019. I prelievi sul Lago di Lugano sono stati effettuati a cadenza stagionale (marzo, giugno, settembre e novembre) mentre quelli dei fiumi a cadenza mensile (gennaio-dicembre). La Figura 1 mostra tutti i punti di campionamento considerati per le indagini del 2019 e le relative modifiche rispetto alla campagna del 2016 (CIPAIS 2017). Per ogni campionamento è stato prelevato 1 litro di acqua e i campioni sono stati mantenuti a 4°C ed analizzati entro otto ore dal prelievo. Il prelievo delle acque pelagiche a Gandria e Ponte Tresa è stato effettuato mediante un campionatore integrale (Züllig AG, Rheineck) in grado di raccogliere l'acqua in continuo da 20 metri di profondità fino in superficie (campione integrato). I prelievi vicino alla costa sono stati eseguiti a Lugano alla profondità di 40 metri nei pressi dell'attuale stazione di captazione dell'acqua potabile, mentre a Riva San Vitale alla profondità di 33 metri nel punto in cui è prevista la costruzione di un nuovo impianto di captazione per l'approvvigionamento di acqua potabile. Per la raccolta di questi due campioni è stato utilizzato un campionatore con chiusura a distanza (modello PWS, della ditta Hydrobios, Kiel, D). Nel 2019 è stato aggiunto il prelievo pelagico (integrato 0-20 metri) al largo di Figino. Questo punto è monitorato anche per i parametri limnologici ed è localizzato in una zona del Lago da cui viene captata acqua per l'impianto di potabilizzazione di Casoro (Barbengo).

I tre fiumi scelti presentano tre diversi scenari: il fiume Vedeggio è situato a valle dell'impianto di depurazione (IDA) di Bioggio, il fiume Cassarate è anch'esso collocato a valle di un impianto di depurazione che però è stato dismesso nel gennaio del 2017 (le acque reflue precedentemente trattate in questo impianto confluiscono ora all'IDA di Bioggio), infine la Magliasina non raccoglie le acque di alcun impianto di depurazione e nel suo tratto finale attraversa una zona periurbana con un impatto antropico medio-alto. Il fiume Laveggio non è più stato campionato in quanto i risultati ottenuti nel 2016 erano simili a quelli del fiume Vedeggio.

#### Figura 1:

Illustrazione dei punti di prelievo del lago di Lugano (cerchi verdi) e dei tre immissari (triangoli rossi) considerati nel monitoraggio.

Il fiume Laveggio è stato escluso dal campionamento, mentre la stazione di Figino è stata aggiunta come campione lacustre.



### 3.2. Analisi molecolari per l'identificazione e la quantificazione dei geni di resistenza

Poiché durante il monitoraggio del 2016 i geni *bla<sub>OXA</sub>*, *suIII* e *tetB* non sono mai stati rilevati e il gene *tetM* è risultato solo a volte presente ma mai quantificabile, è stato deciso di non indagare ulteriormente questi geni nel 2019. Anche i geni *vanA* (resistenza alla vancomicina) e *mcr-1* (resistenza alla colistina), inizialmente proposti, non sono stati considerati nei campionamenti del 2019 in quanto sembrerebbe che siano presenti soprattutto nelle acque di scarico prima del trattamento negli impianti di depurazione e solo in quantità minime nelle acque depurate (Hembach et al. 2017; Jäger et al. 2018; Pazda et al. 2019). Per contro, è stata introdotta la ricerca del gene *ermB* che conferisce la resistenza ai macrolidi, antibiotici ampiamente utilizzati in clinica. Per quanto riguarda i geni di resistenza ai  $\beta$ -lattamici è stato deciso di indagare il gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, isolato in campioni clinici già da circa 15 anni e più recentemente anche dall'ambiente soprattutto in ceppi di *Escherichia coli* (M.-F. Lartigue et al. 2007; R Cantón 2009; Zarfel et al. 2017). Il gene era risultato negativo nello screening qualitativo del 2016, ma delle analisi svolte tramite PCR quantitativa nel 2017 e 2018 dal nostro laboratorio hanno mostrato la sua presenza nei campioni del fiume Veduggio e in batteri resistenti isolati dall'ambiente acquatico. Per questo motivo, nel 2019 il gene *bla<sub>CTX-M</sub>* è stato quantificato (qPCR) nei campioni del fiume Veduggio e ricercato nei batteri multi-resistenti tramite PCR qualitativa.

La Tabella 1 riassume i geni indagati durante il 2019 in tutti i campioni. Si tratta di 5 geni che danno resistenza alle classi di antibiotici maggiormente utilizzate in medicina umana e veterinaria. Oltre ai geni di resistenza è stato quantificato anche il gene *intl* che codifica per l'integrasi degli integroni di classe I, potenziali marcatori molecolari dell'impatto antropico sulle popolazioni batteriche ambientali e coinvolti anche nella diffusione delle resistenze (Gillings et al. 2015; Nardelli et al. 2012; Stalder et al. 2012).

**Tabella 1: Classi degli antibiotici e relativi geni che conferiscono resistenza analizzati nello studio. Per ogni gene è indicato anche il meccanismo che induce resistenza all'antibiotico e la localizzazione.**

Classe antibiotico	Gene indagato	Meccanismo di resistenza e localizzazione	Localizzazione
$\beta$ -lattamici	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Codifica per enzimi detti $\beta$ -lattamasi che inattivano l'antibiotico.	Plasmidio
Fluorochinoloni	<i>qnrS</i>	Codifica per una forma mutata della proteina bersaglio che non viene riconosciuta dall'antibiotico.	Plasmidio
Sulfamidici	<i>suIII</i>	Codifica per una forma alternativa della proteina bersaglio che non viene riconosciuta dall'antibiotico.	Plasmidio
Tetracicline	<i>tetA</i>	Codifica per una pompa a efflusso che elimina l'antibiotico dalla cellula.	Plasmidio
Macrolidi	<i>ermB</i>	Codifica per una metilasi che modifica la proteina bersaglio rendendola irrecognoscibile dall'antibiotico.	Cromosoma o plasmidio

I metodi utilizzati per le analisi molecolari, conformi a quelli implementati dal Water Research Institute di Verbania, sono sostanzialmente gli stessi impiegati nel 2016 (CIPAI 2017). In particolare, è stato comunque deciso di effettuare su tutti i campioni di acqua l'analisi quantitativa tramite qPCR tralasciando l'analisi qualitativa (PCR) utilizzata nel 2016 che è stata riservata all'analisi delle colture batteriche multi-resistenti. Data la maggiore sensibilità riscontrata con la qPCR e per poter garantire il confronto e l'armonizzazione dei dati del 2019 con quelli del 2016 (soprattutto per il Lago), è stato deciso di eseguire retroattivamente l'analisi quantitativa (qPCR) sui campioni del 2016 risultati negativi allo screening qualitativo per i geni di resistenza. Queste

analisi, benché non programmate inizialmente, rientrano nel preventivo di spesa definito in sostituzione alla ricerca dei geni *mcr-1* e *vanA*.

Il DNA dei controlli positivi di ogni gene (standard) è stato purificato e quantificato per creare la curva di calibrazione (Di Cesare et al. 2013). Il limite di quantificazione (LOQ: limit of quantification), che corrisponde alla concentrazione minima degli standard che lo strumento è in grado di quantificare, è stato determinato come descritto da Czekalski *et al.* (Czekalski, Gascón Díez, and Bürgmann 2014). Nella Tabella 2 sono riportati i valori di LOQ (copie/ml) per i geni considerati in questo studio.

**Tabella 2: Limite di quantificazione dei geni presi in considerazione in questo studio; i valori sono espressi in copie/ml.**

Standard	16S rDNA	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>ermB</i>	<i>tetA</i>	<i>intI</i>
LOQ (copie / ml)	5.E+01	2.E+01	6.E+00	5.E+01	4.E+01	3.E+02	2.E+01

Lo strumento per l'analisi quantitativa dei campioni è il termociclatore 7500/7500 *Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems)* e la quantificazione è effettuata attraverso marcatura con *Fast SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems)*. I risultati sono espressi sia come abbondanza assoluta (copie del gene per ml di acqua filtrati) sia come abbondanza relativa (tramite normalizzazione al numero di copie del gene 16S rDNA, utilizzato come indicatore del numero totale di cellule batteriche). I campioni nei quali la presenza di un gene non era quantificabile sono stati valutati unicamente per presenza/assenza del determinante di resistenza.

### 3.3 Indagini batteriologiche

Per la carica batterica totale (Total Viable Count), o conta dei germi aerobi mesofili, è stata utilizzata la tecnica delle membrane filtranti che consiste nel filtrare un volume conosciuto di campione attraverso una membrana di cellulosa di porosità 0,45 µm che viene poi posta in una piastra contenente il terreno PCA (Plate Count Agar). Dopo incubazione in termostato a 30°C per 48 ore vengono contate tutte le colonie batteriche che si sono sviluppate. La quantità di batteri è espressa in unità formanti colonie per ml di acqua filtrata (UFC/ml).

Per determinare la presenza di batteri multi-resistenti nei campioni d'acqua è stata utilizzata la stessa tecnica ma le membrane sono state poste su piastre selettive contenenti diverse combinazioni di antibiotici. Di seguito sono riportate le combinazioni scelte: CIP: CTX (ciprofloxacina: cefotaxime) 2:4 µg/ml; NOR: CEF (norfloxacina: cefodoxime) 4:8 µg/ml; CLR: TE (claritromicina: tetraciclina) 4:8 µg/ml. Da ogni piastra sono state isolate da un minimo di 5 a un massimo di 30 colonie la cui identificazione, a livello di genere o specie, è stata effettuata mediante MALDI-TOF MS. Dai batteri multi-resistenti, raggruppati in base alla famiglia, genere o specie, è stato estratto il DNA per determinare la presenza di geni di resistenza mediante PCR. I geni ricercati sono stati gli stessi quantificati nei campioni d'acqua (Tabella 1), compreso il gene per l'integrasi. Lo scopo è stato di cercare di individuare quali batteri possono fungere da serbatoi/vettori di geni di resistenza.

## 4. Risultati del monitoraggio del 2019

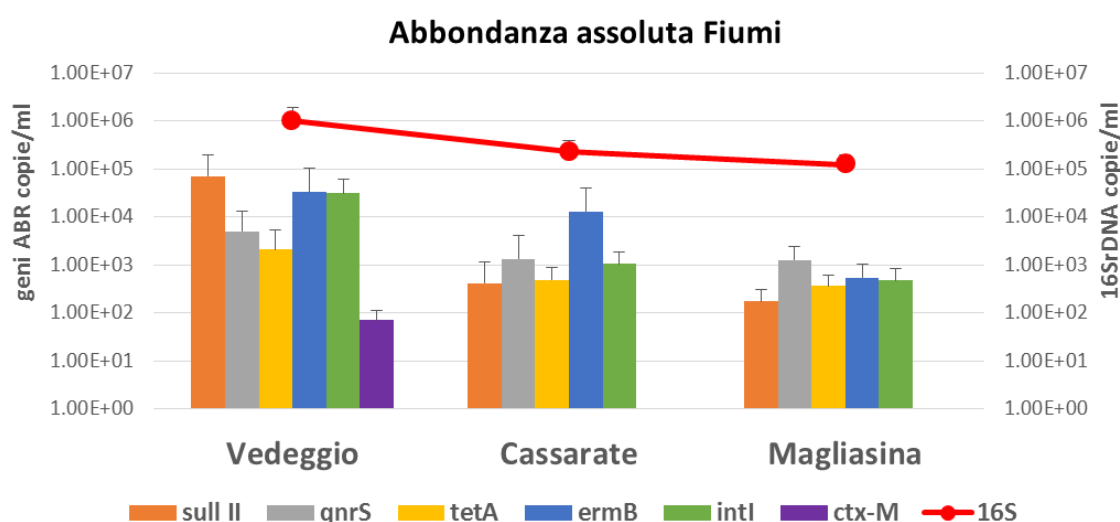
### 4.1 Identificazione e quantificazione di determinanti genici di resistenza agli antibiotici

#### Presenza/assenza di determinati genici di resistenza

I risultati del monitoraggio del 2019 mostrano che in tutti i campioni d'acqua raccolti mensilmente nel fiume Veduggio erano presenti tutti i geni di resistenza ricercati così come il gene per l'integrasi. Al contrario, nei campioni dei fiumi Magliasina e Cassarate i geni *qnrS*, *ermB* e *tetA* erano talvolta assenti o presenti ma sotto il limite di quantificazione. Nel lago i geni *sulII*, *tetA* e *intI* sono stati i più frequenti, presenti in tutti i punti di campionamento.

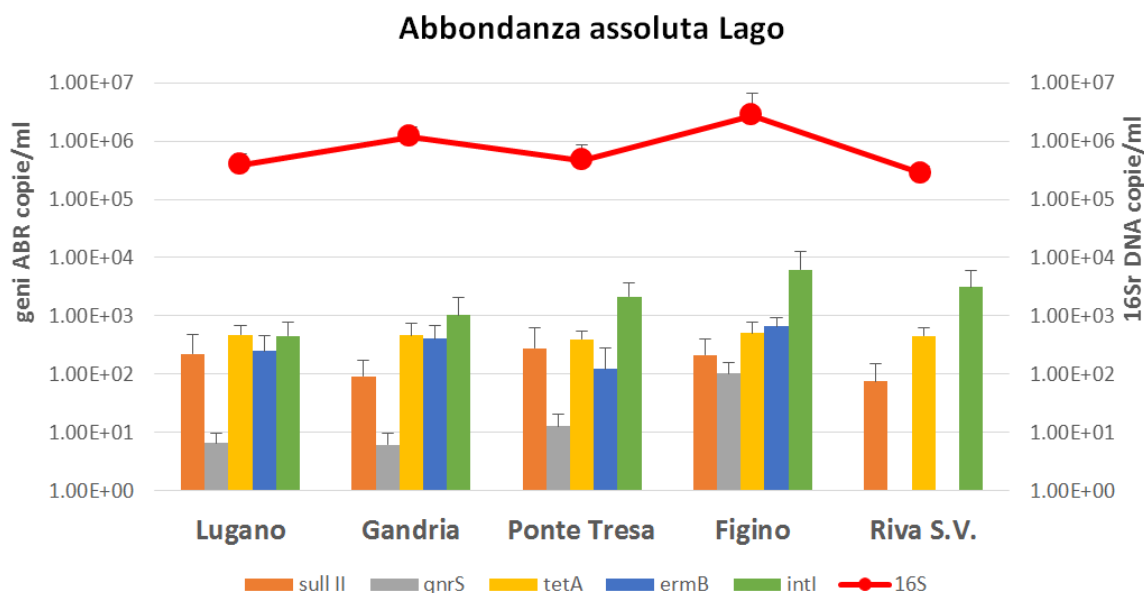
#### Abbondanza assoluta dei geni di resistenza e del gene *intI*

Le abbondanze assolute dei vari geni possono essere considerate un indice del grado di contaminazione dei diversi campioni (Su et al. 2020). Per quanto riguarda i nostri risultati, l'abbondanza assoluta dei determinanti genici di resistenza e del gene 16S rDNA nei tre fiumi immissari mette in evidenza delle differenze riconducibili al diverso grado di antropizzazione a cui sono sottoposti. In dettaglio, come si evince dalla Figura 2, la popolazione batterica totale è più abbondante nel fiume Veduggio (media annuale 16S rDNA  $1E+06$  copie/ml) rispetto al Cassarate (media annuale 16S rDNA  $2E+05$  copie/ml) e al Magliasina (media annuale 16S rDNA  $1E+05$  copie/ml). Anche la quantità di determinanti genici di resistenza è maggiore nel Veduggio dove la media annuale complessiva dei geni di resistenza e del gene *intI* è pari a  $3E+04$  copie/ml (Cassarate  $3E+03$  copie/ml; Magliasina  $6E+02$  copie/ml). In ordine decrescente i geni di resistenza più abbondanti tra quelli ricercati nei tre fiumi sono: *sulII* (media annuale complessiva  $2E+04$  copie/ml), *ermB* (media annuale complessiva  $2E+04$  copie/ml), *intI* (media annuale complessiva  $1E+04$  copie/ml), *qnrS* (media annuale complessiva  $3E+03$  copie/ml) e *tetA* (media annuale complessiva  $1E+03$  copie/ml). Il gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, che conferisce resistenza alle cefalosporine anche di 3° e 4° generazione e che è stato indagato nel 2019 solo nel fiume Veduggio, è molto meno abbondante (media annuale  $7E+01$  copie/ml) rispetto agli altri geni di resistenza.



**Figura 2:** Medie annuali dell'abbondanza assoluta dei geni di resistenza (geni ABR), del gene *intI* e del gene 16S rDNA nei fiumi. La quantità è espressa in copie del gene per ml di acqua campionata su scala logaritmica. Le barre rappresentano l'errore standard dei replicati della qPCR.

Nei campionamenti del Lago di Lugano (Figura 3) non si osservano variazioni importanti nell'abbondanza assoluta dei geni di resistenza, fatta eccezione per il punto di Figino dove le medie annuali della quantità di determinanti genici di resistenza ( $2E+03$  copie/ml) e della popolazione batterica totale ( $3E+06$  copie del gene 16S rDNA/ml) sono dieci volte maggiori a quanto misurato negli altri punti. In tutti i campionamenti il gene per l'integrone di classe uno (*intl*) è quello più abbondante (media annuale  $3E+03$  copie/ml), seguito da *tetA* ( $5E+02$  copie/ml), *ermB* ( $4E+02$  copie/ml), *sulII* ( $2E+02$  copie/ml) e infine *qnrS* ( $3E+01$  copie/ml).



**Figura 3:** Grafico delle medie annuali dell'abbondanza assoluta dei geni di resistenza (geni ABR), del gene *intl* e del gene *16S rDNA* nel Lago di Lugano. La quantità è espressa in copie del gene per ml di acqua campionata su scala logaritmica. Le barre rappresentano l'errore standard dei replicati della qPCR.

#### Abbondanza relativa dei geni di resistenza e del gene *intl*

L'abbondanza relativa è espressa dalla quantità assoluta di copie di un gene rispetto al numero totale di microorganismi presenti nel campione che è dato dalla quantità assoluta del gene 16S rDNA. La Tabella 3 riassume i valori di abbondanza relativa dei geni indagati espressi in percentuale per i campionamenti nei fiumi.

Nel Veduggio il gene *intl* è presente in media nel 3.4% della popolazione batterica totale espressa come numero di copie di 16S rDNA mentre nei fiumi Cassarate e Magliasina in meno dell'1% della popolazione batterica totale. *sulII* è presente mediamente nel 9.7% dei batteri dei campionamenti del Veduggio. In febbraio, agosto, settembre e ottobre la percentuale di batteri contenenti questo gene è stata compresa tra 1% e 10%, in luglio e novembre è stata di 14.4% e di 10 %, rispettivamente, mentre ha raggiunto il massimo di abbondanza relativa del 65% nel mese di dicembre. Nel Cassarate e nella Magliasina *sulII* ha sempre potuto essere quantificato e risulta mediamente presente in circa 1 cellula batterica ogni 1'000.

Nei campioni d'acqua di fiume l'abbondanza relativa del gene *tetA* è risultata mediamente sempre inferiore a 2 copie del gene ogni 1'000 copie del gene 16S rDNA. L'abbondanza relativa media di *qnrS* nel Veduggio è risultata essere di circa 4 copie ogni 1000 copie di 16S rDNA. Nel Cassarate

e nella Magliasina, questo valore è leggermente superiore anche se in alcuni campioni il gene era presente ma non quantificabile. Il gene *ermB* è stato rilevato in circa 3 copie ogni 100 copie di 16S rDNA in media nei fiumi Veduggio e Cassarate. In questo ultimo fiume è stato raggiunto una quantità relativa di copie pari a circa il 14% nei mesi di novembre e dicembre, mentre nel Veduggio l'abbondanza relativa massima di 20.6 copie di *ermB* ogni 100 copie di 16S rDNA è stata misurata nel mese di agosto. Per contro, la quantità relativa di questo gene nel fiume Magliasina ha raggiunto mediamente le 2 copie ogni 1000 di 16S rDNA. Inoltre, *ermB* è spesso risultato non quantificabile. Il gene *bla*CTX-M, pur essendo presente in tutti i campioni del fiume Veduggio anche se non sempre quantificabile, ha raggiunto concentrazioni relative medie di circa 0.04 copie/1000 copie di 16S rDNA, molto inferiori agli altri geni analizzati nel corso dell'anno.

**Tabella 3: Abbondanza relativa dei determinanti genici di resistenza nei fiumi espressa in percentuale del numero di copie del gene 16S rDNA. I dati del campionamento del fiume Cassarate di agosto sono stati scartati poiché le forti piogge hanno falsato i risultati.**

<b>Veduggio</b>	<i>suII</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrS</i>	<i>ermB</i>	<i>intI</i>	<i>bla</i> CTX-M
Gennaio	1.78	0.17	0.43	0.31	9.06	0.00000
Febbraio	8.50	0.16	0.68	0.09	13.95	0.01479
Marzo	0.06	0.02	0.08	0.05	1.94	0.00007
Aprile	0.56	0.06	0.04	0.22	2.92	0.00053
Maggio	0.89	0.11	0.03	0.26	1.30	0.00043
Giugno	0.74	0.83	0.74	1.48	4.50	0.00364
Luglio	14.39	0.09	0.04	0.11	0.76	0.00682
Agosto	3.60	0.41	0.11	20.61	1.06	0.02804
Settembre	4.45	0.12	0.07	0.22	0.35	0.00579
Ottobre	7.06	0.13	0.80	0.40	1.25	0.00000
Novembre	10.06	0.23	1.56	12.96	1.54	0.00295
Dicembre	65.14	0.05	0.45	3.28	2.02	0.00000

<b>Cassarate</b>	<i>suII</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrS</i>	<i>ermB</i>	<i>intI</i>
Gennaio	0.03	0.07	0.21	0.68	1.16
Febbraio	0.12	0.07	0.00	0.16	0.68
Marzo	0.10	0.19	0.16	0.28	0.54
Aprile	0.22	0.22	0.01	5.81	0.44
Maggio	0.04	0.17	0.00	0.24	0.21
Giugno	0.04	0.37	0.00	0.24	0.30
Luglio	0.16	0.02	0.05	0.01	0.29
Agosto					
Settembre	0.21	0.08	0.04	0.03	0.16
Ottobre	0.10	0.12	0.28	0.16	0.13
Novembre	0.42	0.13	1.35	13.98	0.42
Dicembre	0.26	0.33	4.11	13.67	1.97

Magliasina	<i>sull</i>	<i>tetA</i>	<i>qnrS</i>	<i>ermB</i>	<i>intl</i>
Gennaio	0.01	0.24	0.00	0.00	0.40
Febbraio	0.04	0.06	0.00	0.02	0.33
Marzo	0.18	0.15	0.44	0.27	0.34
Aprile	0.12	0.18	0.58	0.87	0.77
Maggio	0.04	0.31	1.43	0.04	0.17
Giugno	0.03	0.45	1.11	0.01	0.19
Luglio	0.24	0.43	0.00	0.02	0.23
Agosto	0.12	0.12	1.14	0.01	0.75
Settembre	0.29	0.07	0.32	0.02	0.54
Ottobre	0.31	0.09	0.27	0.39	0.94
Novembre	0.13	0.03	0.70	0.00	0.08
Dicembre	0.28	0.09	0.00	0.28	0.10

■ > 50%   
 ■ 10-50%   
 ■ 1-10%   
 ■ < 1%   
 ■ non quantificabile   
 ■ assente   
 ■ dato scartato

Nel Lago di Lugano l'abbondanza relativa media annuale dei geni di resistenza indagati nei campionamenti del Lago oscilla tra circa lo 0.3 % (Figino) e lo 0.05 % (Gandria). *intl*, *tetA*, *ermB* e *sull* si riconfermano i geni più abbondanti mentre *qnrS* è spesso al di sotto del limite di quantificazione (Tabella 4). Il gene *intl* è stato presente in tutti i campioni ed ha raggiunto l'abbondanza relativa maggiore nei campioni di Riva San Vitale (circa una copia del gene ogni 100 copie di 16S rDNA sulla media annuale). Anche il gene *sull* ha potuto essere rilevato e quantificato in tutti i campioni analizzati raggiungendo la quantità relativa massima di 0.12 copie/100 copie di 16S rDNA come media annuale a Ponte Tresa. Al contrario, in 3 campioni il gene *qnrS* non è stato rilevato e in 12 è stato rilevato ma non è stato possibile quantificarlo (Tabella 4). Globalmente, questo gene è stato il meno presente nei campioni analizzati raggiungendo al massimo la quantità di 7 copie/1000 copie di 16S rDNA (campionamento primaverile a Ponte Tresa). Solo nel campione primaverile prelevato a Ponte Tresa il gene *tetA* ha superato la quantità relativa di una copia/100 copie di 16S rDNA. Il gene è però sempre stato rilevato ed in poche occasioni la quantità è risultata sotto al limite di quantificazione. Nei campioni prelevati a Lugano l'abbondanza relativa media di questo gene è stata di 0.15%. Il gene *ermB* è stato quantificato in 6 campioni su 20 analizzati. Il gene non ha mai superato l'abbondanza relativa media annua di 3 copie su 1000 copie di 16S rDNA.

**Tabella 4: Abbondanza relativa dei determinanti genici di resistenza nel Lago Lugano espressa in percentuale del numero di copie del gene 16SrDNA. I dati del campionamento di Figino in giugno sono stati scartati per problemi nell'estrazione del DNA.**

	Lugano					Gandria				
	<i>sull</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>intl</i>	<i>sull</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>intl</i>
Primavera	0.01	0	0.20	0.01	0.19	0.01	0.001	0.17	0.01	0.51
Estate	0.04	0	0.32	0	0.12	0.004	0	0.02	-	0.06
Autunno	0.05	0.002	0.09	0	0.05	0	0	0.01	0	0.01
Inverno	0.09	0	0	0.06	0.12	0.02	0	0.04	0.08	0.05



Ponte Tresa						Figino					
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>intl</i>		<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>intl</i>
Primavera	0.12	0.07	1.82	0	0		0	0	0	0	0.03
Estate	0.01	0	0.06	-	0.55						
Autunno	0	-	0.05	0	0.30		0.03	-	0.04	0	0.07
Inverno	0.37	-	0	0.06	0.09		0.01	0.01	0	0.08	1.92

Riva San Vitale					
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>intl</i>
Primavera	0.01	0	0	0	1.47
Estate	0.01	0	0.18	0	0.38
Autunno	0.05	0	0.12	0	0.25
Inverno	0.02	0	0.19	0	2.76

> 50%    
 10-50%    
 1-10%    
 < 1%    
 non quantificabile    
 assente    
 dato scartato

#### 4.2 Indagini batteriologiche

##### Conte batteriche totali

Il numero totale di batteri nei tre fiumi immissari (Tabella 5) fluttua dalle 72 UFC/ml (Magliasina in gennaio) alle 5960 UFC/ml (Veduggio in luglio). Si nota un aumento del numero di colonie nei mesi più caldi, da maggio a ottobre. Anche con questa analisi sono evidenti le differenze tra i tre fiumi immissari: il Veduggio presenta un numero di batteri superiore (media annuale 1572 UFC/ml) rispetto a Cassarate e Magliasina (media annuale circa 520 UFC/ml).

**Tabella 5: Conte totali mensili dei batteri presenti nei campionamenti dei tre fiumi immissari, espresse in unità formanti colonie per ml (UFC/ml).**

	Veduggio	Cassarate	Magliasina
Gennaio	590	867	72
Febbraio	593	86	84
Marzo	860	126	155
Aprile	443	313	353
Maggio	1030	560	777
Giugno	2460	693	873
Luglio	5960	857	1053
Agosto	2467	-	1003
Settembre	1073	633	650
Ottobre	1057	403	450
Novembre	-	-	-
Dicembre	753	683	340
<b>Media annuale</b>	<b>1572</b>	<b>522</b>	<b>528</b>

I dati relativi al campionamento di agosto del fiume Cassarate e quelli di novembre per tutti e tre i fiumi sono stati omessi perché influenzati fortemente dalle abbondanti piogge.

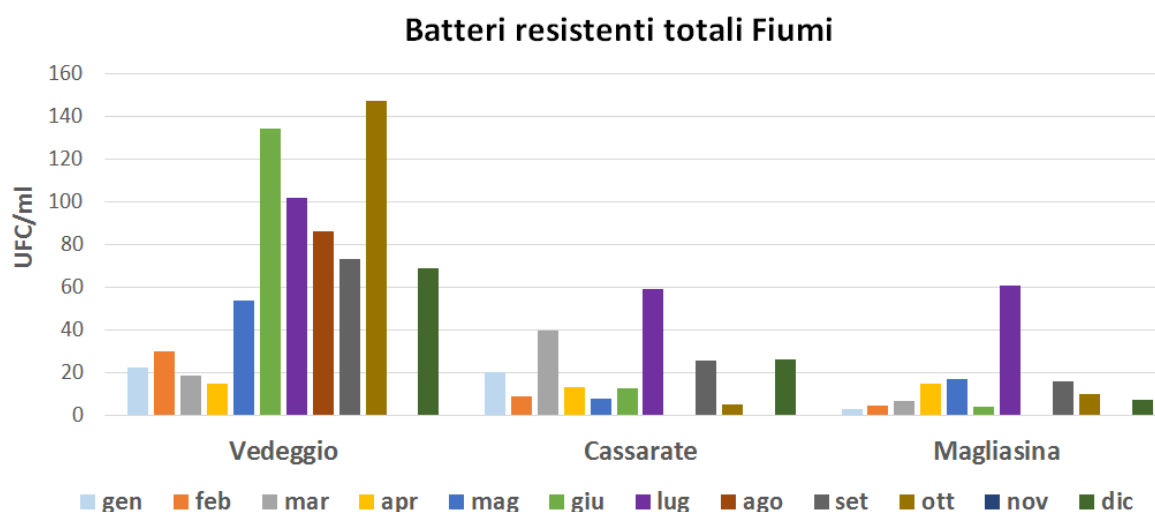
Nel Lago di Lugano (Tabella 6) il numero totale di batteri varia da 11 UFC/ml (Gandria in giugno) a 275 UFC/ml (Ponte Tresa in inverno). In questi campioni è più difficile osservare un chiaro andamento stagionale. Le conte totali dei batteri del Lago di Lugano sono inferiori rispetto ai fiumi probabilmente a causa dell'effetto di diluizione degli apporti dei fiumi e di un numero inferiore di batteri coltivabili. Il numero medio di batteri coltivabili è particolarmente contenuto nei campionamenti effettuati a Gandria (il campionamento è effettuato in mezzo al lago nel punto di maggiore profondità) e nei due campionamenti effettuati in profondità (Lugano e Riva San Vitale), ambienti poco esposti ad influenze antropiche dirette. A Figino e Ponte Tresa è stato contato in media il maggior numero di colonie: entrambi i siti di campionamento sono localizzati in punti dove si misura un carico importante di nutrienti (CIPAIS 2019).

**Tabella 6: Conte totali mensili dei batteri presenti nei campionamenti del Lago di Lugano, espresse in unità formanti colonie per ml (UFC/ml).**

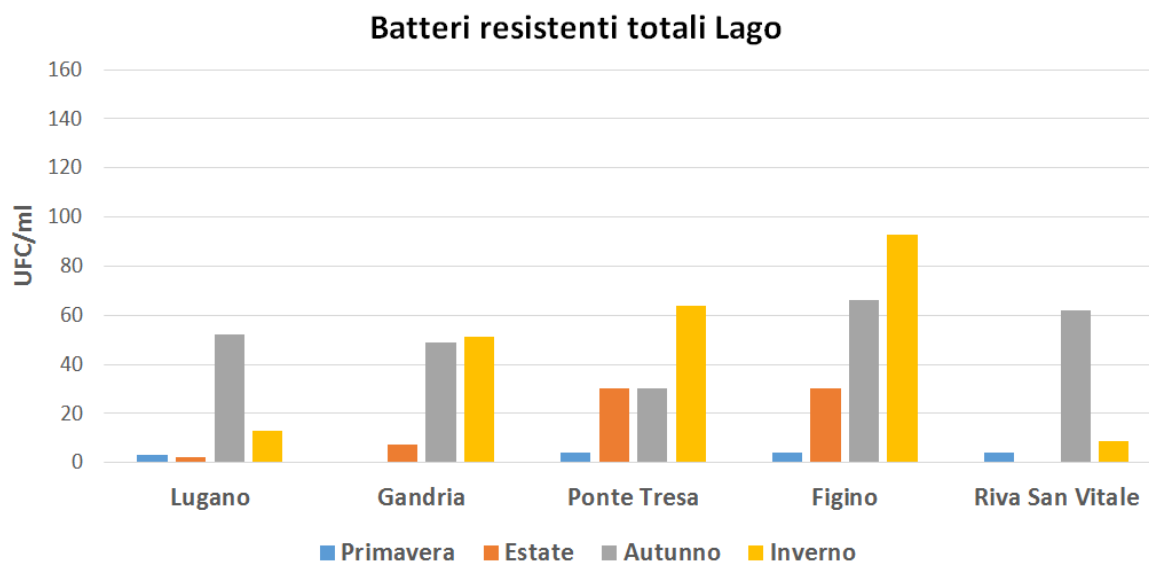
	Lugano	Gandria	Ponte Tresa	Figino	Riva San Vitale
Primavera	45	72	132	136	88
Estate	57	11	173	300	64
Autunno	111	94	92	122	113
Inverno	60	125	275	93	51
<b>Media annuale</b>	<b>68</b>	<b>75</b>	<b>168</b>	<b>163</b>	<b>79</b>

#### *Isolamento e identificazione di batteri resistenti agli antibiotici*

Il numero totale di batteri multi-resistenti è stato determinato sommando le colonie cresciute sui vari terreni contenenti le combinazioni di antibiotici (vedi Materiali e Metodi, punto 2.1). In linea con le conte batteriche totali, il maggior numero di batteri resistenti è stato rilevato nel Vedeggio, per quanto riguarda i fiumi (Figura 4), e nei punti di campionamento del Lago a Ponte Tresa e Figino (Figura 5). L'andamento stagionale si sovrappone a quanto osservato per le cariche batteriche totali.



**Figura 4:** Conte totali mensili dei batteri multi-resistenti presenti nei tre fiumi immissari, espresse in unità formanti colonie per ml (UFC/ml). I dati relativi al campionamento di agosto dei fiumi Cassarate e Magliasina e quelli di novembre per tutti e tre i fiumi sono stati omessi perché influenzati fortemente dalle abbondanti piogge.



**Figura 5:** Conte totali mensili dei batteri multi-resistenti presenti nel Lago, espresse in unità formanti colonie per ml (UFC/ml).

Dall'identificazione delle colonie dei batteri multi-resistenti è emerso che nei fiumi quelli più frequenti appartengono ai generi *Acinetobacter* e *Stenotrophomonas* e alla famiglia delle *Flavobacteriaceae*. I primi due generi risultano tra i più frequenti anche nei campionamenti dal Lago dove le *Flavobacteriaceae* sono però poco rappresentate e dove invece risultano più frequentemente i batteri appartenenti al genere *Brevundimonas* (Tabella 7).

**Tabella 7: Distribuzione delle colonie di batteri multi-resistenti totali e degli isolati identificati nei campionamenti di fiumi e Lago.**

	Veduggio	Cassarate	Magliasina	Lugano	Gandria	Figino	Ponte Tresa	Riva San Vitale
<b>Numero totale di colonie di batteri multi-resistenti</b>	<b>352</b>	<b>251</b>	<b>136</b>	<b>80</b>	<b>41</b>	<b>59</b>	<b>85</b>	<b>68</b>
<i>Stenotrophomonas sp</i>	55	73	43	35	8	33	2	42
<i>Acinetobacter sp</i>	100	79	47	22	10	13	40	6
Flavobacteriaceae	109	37	20	1	12	2	5	
<i>Aeromonas sp</i>	40	6	1	3	4	1	20	6
<i>Brevundimonas sp</i>	4	12	3	17	6	10	12	14
Enterobacteriaceae ambientali	32	30	22	2	0	0	3	0
<i>Escherichia coli</i>	9	3	0	0	0	0	2	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	1	0	0	1	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	1	10	0	0	0	0	1	0

La ricerca dei geni di resistenza è stata eseguita tramite PCR sull'estratto di DNA ottenuto dal mix di colonie appartenenti allo stesso genere o famiglia cresciute sui terreni contenenti le varie combinazioni di antibiotici. Le Tabelle 8 e 9 in allegato riassumono la distribuzione dei determinanti di resistenza evidenziati nei pool batterici suddivisi secondo i campionamenti.

Nelle colture di *Acinetobacter* isolate da Veduggio e Cassarate è stato possibile evidenziare la presenza del gene *suII* che conferisce resistenza ai sulfamidici mentre in quelle dal Magliasina era presente anche *tetA*. Ambedue i geni sono frequentemente riscontrati nei ceppi ambientali di *Acinetobacter*. Nei ceppi isolati dai campioni del Lago non è stato possibile individuare nessuno dei geni di resistenza indagati. Anche gli *Stenotrophomonas* sono molto diffusi nell'ambiente e come il genere precedente presentano vari meccanismi che conferiscono resistenza intrinseca o acquisita agli antibiotici quali pompe a efflusso, enzimi inattivanti e alterazioni della membrana esterna. Nelle colture analizzate non è però stato possibile trovare nessuno dei geni di resistenza indagati.

Tra i batteri multi-resistenti che possono essere considerati dei serbatoi di geni di resistenza, si confermano quelli appartenenti al genere *Aeromonas* (Carnelli, Mauri, and Demarta 2017): nei ceppi provenienti da Veduggio e Ponte Tresa sono stati trovati rispettivamente i geni *qnrS* e *tetA* e *qnrS*, *tetA* e *ermB*. Il gene *qnrS* è stato identificato anche in *Aeromonas* isolati a Riva San Vitale mentre il gene *intl* era presente in ceppi isolati da Veduggio, Gandria, Ponte Tresa e Riva San Vitale.

Anche se il numero di *E. coli* multi-resistenti identificati nei campioni analizzati è stato in generale molto contenuto, in quelli isolati dal Veduggio sono stati identificati tutti i geni di resistenza ricercati compreso il gene *intl* confermando ulteriormente l'impatto dell'impianto di depurazione delle acque su questo corso d'acqua.

Il gene di resistenza *bla*<sub>CTX-M</sub>, il più diffuso tra le *Enterobacteriaceae* cliniche che mostrano un profilo di resistenza a largo spettro ai beta-lattamici (Ramadan et al. 2019), è stato identificato oltre che negli *E. coli* del Veduggio anche nei due ceppi di *Enterobacter cloacae* multi-resistenti isolati dal Cassarate (dati non mostrati) e nelle due colture identificate come Enterobatteriacee ambientali dei campionamenti del Lago a Lugano. Il gene *ermB* è stato trovato in sia in *E. coli* che in *Aeromonas sp.*

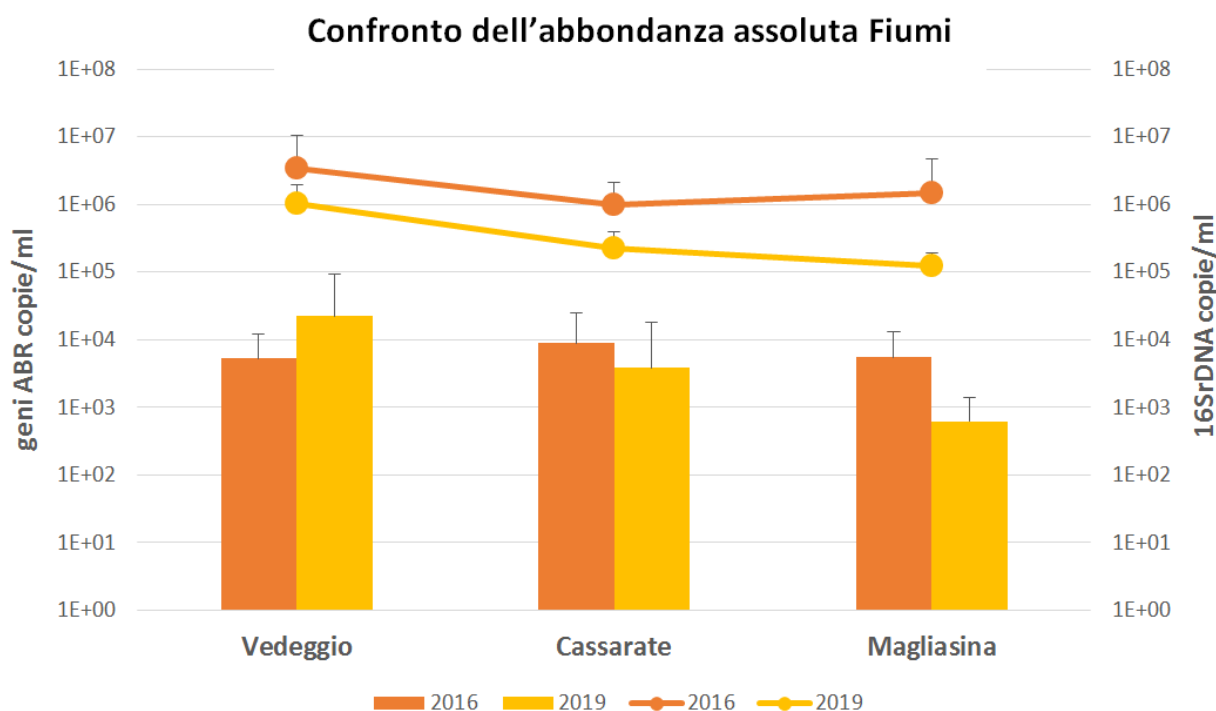
## 5. Confronto dei risultati delle analisi quantitative 2016 e 2019

Nel corso del 2019 sono state eseguite le analisi quantitative tramite qPCR degli estratti di DNA dei campioni raccolti durante la campagna di monitoraggio del 2016 risultati negativi allo screening qualitativo per permettere un raffronto tra le due campagne di campionamenti. Da queste analisi è stato escluso il gene *int1* per il quale nel 2016 non era stata prevista la quantificazione. Di seguito sono riportati i risultati aggiornati della campagna 2016 messi a confronto con i dati ottenuti durante il 2019.

### 5.1 Identificazione e quantificazione di determinanti genici di resistenza agli antibiotici

#### Abbondanza assoluta dei geni di resistenza

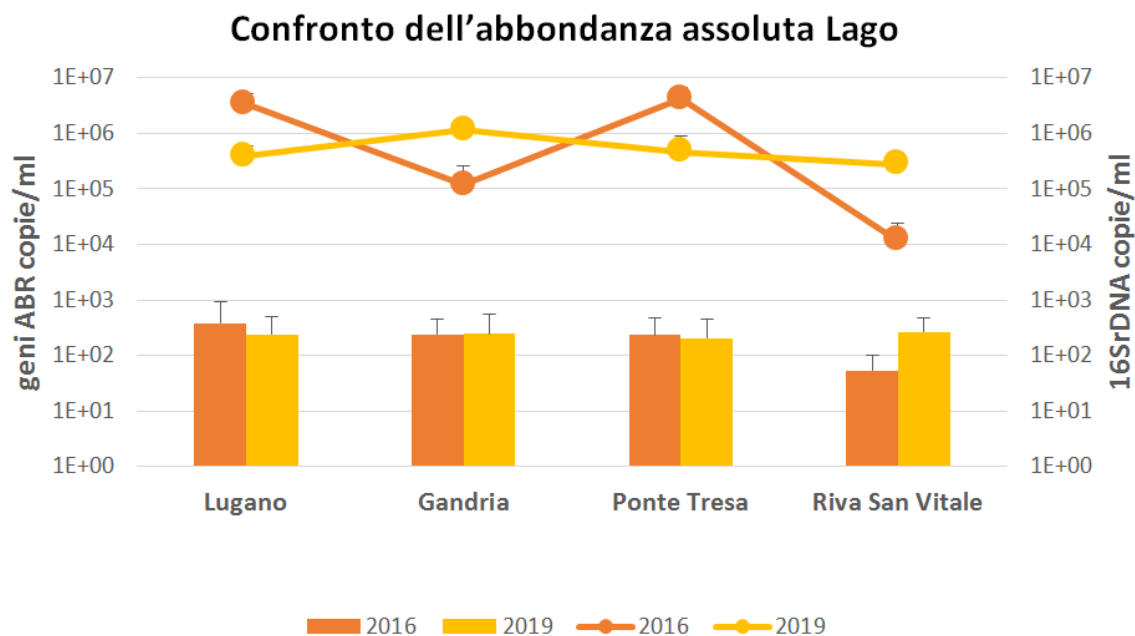
Il confronto dei risultati dell'abbondanza assoluta nel 2016 e 2019 dei geni di resistenza e del gene 16S rDNA (Figura 6), evidenzia una riduzione di circa un fattore 10 della quantità assoluta della popolazione batterica totale (da circa  $1E+06$  a  $1E+05$  copie/ml) nei fiumi Cassarate e Magliasina e una pressoché stabilità (da  $3E+06$  a  $1E+06$  copie/ml) nel Vedeggio. Anche l'abbondanza assoluta media dei geni di resistenza in Cassarate e Magliasina diminuisce (Cassarate da  $9E+03$  a  $4E+03$  copie/ml; Magliasina da  $5E+03$  a  $6E+02$  copie/ml) mentre si assiste ad un aumento di questo valore nel fiume Vedeggio (da  $5E+03$  a  $2E+04$  copie/ml).



**Figura 6.** Confronto tra le medie annuali del 2016 e del 2019 dell'abbondanza assoluta dei geni di resistenza e del gene *16S rDNA* nei fiumi. La quantità è espressa in copie del gene per ml di acqua campionata su scala logaritmica. Le barre rappresentano l'errore standard dei replicati della qPCR.

Nei campionamenti del Lago di Lugano (Figura 7) non si osservano variazioni significative nell'abbondanza assoluta dei geni di resistenza tra i due anni, fatta eccezione per il punto di Riva

San Vitale dove questo valore è aumentato da  $3E+01$  a  $1E+02$  copie/ml. Per quanto riguarda la quantità assoluta della popolazione batterica totale la tendenza non è chiaramente delineata e si nota un andamento altalenante (Figura 7): in aumento a Gandria (da  $1E+05$  a  $1E+06$  copie/ml) e Riva San Vitale (da  $1E+04$  a  $3E+05$  copie/ml) e in diminuzione a Lugano (da  $3E+06$  a  $4E+05$  copie/ml) e Ponte Tresa (da  $4E+06$  a  $5E+05$  copie/ml).



**Figura 7:** Confronto tra le medie annuali del 2016 e del 2019 dell'abbondanza assoluta dei geni di resistenza e del gene *16S rDNA* nel Lago. La quantità è espressa in copie del gene per ml di acqua campionata su scala logaritmica. Le barre rappresentano l'errore standard dei replicati della qPCR.

#### *Abbondanza relativa dei geni di resistenza*

La normalizzazione dei dati rispetto al numero di copie del gene *16S rDNA* permette di paragonare in modo più efficace l'andamento delle resistenze tra il 2016 e il 2019, mettendo in evidenza le differenze per ogni singolo gene analizzato. La Tabella 10 mostra l'assenza di un andamento stagionale nella distribuzione delle resistenze. Il gene *suII* è stato il più diffuso nei due anni presi in considerazione, seguito dai geni *ermB* e *qnrS*. Il Veduggio è stato il fiume con la più alta quantità relativa di geni di resistenza e nel quale si è osservato l'aumento medio del 2.1% delle resistenze considerate (Tabella 11) dovuto in particolare all'aumento dei geni *suII* (6.7%) ed *ermB* (3.3%) non controbilanciato da una diminuzione poco significativa dei geni *qnrS* (-0.8%) e *tetA* (-1%). I dati dei due anni confermano che il Veduggio subisce il forte impatto antropico dovuto all'IDA di Bioggio. Le Tabelle 10 e 11 evidenziano anche il netto miglioramento delle condizioni del fiume Cassarate in seguito alla chiusura dell'impianto di depurazione: la quantità relativa media dei geni di resistenza è diminuita del 12.4% in particolare grazie alla diminuzione dei geni *suII* (-23.8%) e *tetA* (-25.5%). La Magliasina resta il fiume meno carico in geni di resistenza e mostra una leggera riduzione delle resistenze pari al 3.1% (Tabella 11). Come per il Cassarate, ma in misura molto minore, i geni con la variazione maggiore nei due anni sono *suII* (-8% nel 2019) e *tetA* (-4.9% nel 2019).

**Tabella 10: Confronto dell'abbondanza relativa dei determinanti genici di resistenza nel 2016 e nel 2019 nei fiumi espressa in percentuale del numero di copie del gene 16S rDNA. I dati del campionamento del fiume Magliasina di aprile 2016 sono stati scartati per problemi all'estrazione del DNA, mentre quelli di agosto 2019 del Cassarate sono stati scartati perché le forti piogge hanno falsato i risultati.**

Veduggio	2016					2019				
	<i>suII</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>ctx-M</i>	<i>suII</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>ctx-M</i>
Gennaio	1.71	0.13	0.69	0.03	0	1.78	0.43	0.17	0.31	0
Febbraio	11.75	5.07	3.54	0.10	0	8.50	0.68	0.16	0.09	0.0148
Marzo	9.99	3.74	3.00	0.03	0	0.06	0.08	0.02	0.05	0
Aprile	10.23	1.25	3.39	0.09	0	0.56	0.04	0.06	0.22	0
Maggio	0.61	0.81	0.65	0.07	0	0.89	0.03	0.11	0.26	0
Giugno	0.36	0.15	0.41	0.05	0.01	0.74	0.74	0.83	1.48	0.0036
Luglio	0.21	0.13	0.29	0.02	0	14.39	0.04	0.09	0.11	0
Agosto	0	0.21	0.34	0.02	0	3.60	0.11	0.41	20.61	0.0280
Settembre	0.54	1.41	0.34	0.03	0.01	4.45	0.07	0.12	0.22	0
Ottobre	0.08	0.07	0.03	0.01	0.0004	7.06	0.80	0.13	0.40	0
Novembre	1.07	0.02	0.18	0.003	0	10.06	1.56	0.23	12.96	0.0029
Dicembre	0.40	-	-	0	0	65.14	0.45	0.05	3.28	0

Cassarate	2016				2019			
	<i>suII</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>suII</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>
Gennaio	7.66	3.71	3.25	0.09	0.03	0.21	0	0.68
Febbraio	0	11.23	0	0.23	0.12	0	0	0.16
Marzo	13.54	6.74	9.45	0.74	0.10	0.16	0.19	0.28
Aprile	26.77	2.07	2.90	0.80	0.22	0.01	0.22	5.81
Maggio	232.73	0	282.07	17.01	0.04	0.003	0.17	0.24
Giugno	3.97	4.45	2.68	0.08	0.04	0.003	0.37	0.24
Luglio	0.47	0.05	0.74	0.01	0.16	0.05	0	0
Agosto	0.85	0.17	5.30	0.10				
Settembre	0	0.12	0.28	0.03	0.21	0.04	0	0
Ottobre	0.37	0.22	0.54	0.03	0.10	0.28	0	0.16
Novembre	0.38	0.01	0.08	0.00	0.42	1.35	0.13	13.98
Dicembre	0.31	0.03	0.06	0.01	0.26	4.11	0	13.67

Magliasina	2016				2019			
	<i>suII</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>suII</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>
Gennaio	-	-	26.75	-	0	-	0	-
Febbraio	-	-	-	-	0.04	0	0	0
Marzo	55.33	-	-	0.35	0.18	0.44	0	0.27
Aprile					0	0	0	0.87
Maggio	1.81	-	2.90	0	0.04	1.43	0.31	0.04
Giugno	0.58	-	-	0.18	0.03	1.11	0	0
Luglio	0.35	0.21	0.60	0.10	0.24	0	0.43	0
Agosto	-	-	3.03	0	0.12	1.14	0	0
Settembre	0.03	0.01	0.10	0	0.29	0.32	0	0
Ottobre	0.22	-	0.43	-	0.31	0.27	0	0.58
Novembre	2.86	-	-	-	0.13	0.70	0	0
Dicembre	3.89	-	1.11	-	0.28	0	0	0.43

> 50%    
  10-50%    
  1-10%    
  < 1%    
  non quantificabile    
  assente    
  dato scartato

**Tabella 11.** Differenza percentuale tra il 2019 e il 2016 delle abbondanze relative medie dei geni di resistenza nei fiumi. Il gene *bla*<sub>CTX-M</sub> è stato escluso perché in quantità sempre poco rilevanti anche quando presente.

differenza % ABR 2019-2016					
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	media
<b>Veduggio</b>	6.7	-0.8	-1.0	3.3	2.1
<b>Cassarate</b>	-23.8	-1.8	-25.5	1.6	-12.4
<b>Magliasina</b>	-8.0	0.4	-4.9	0.1	-3.1

Nel Lago non si evidenziano grosse differenze in termini di abbondanza relativa dei geni di resistenza tra il 2016 e il 2019. Si nota però un aumento globale in termini di presenza/assenza di geni di resistenza in particolare per quanto riguarda i geni *qnrS* e *tetA* (Tabella 12). Il cambiamento più visibile è stato rilevato nei campionamenti di Riva San Vitale dove si nota una diminuzione media della quantità relativa di geni di resistenza di ca. 1% rispetto al 2016 dovuta soprattutto alla diminuzione del 3.5% del gene *ermB* (Tabella 12). In questo punto di campionamento le quantità assolute e relative dei geni di resistenza presentano evoluzioni opposte imputabili presumibilmente ai valori molto contenuti rilevati: il numero medio di copie di geni di resistenza, in entrambi gli anni, era molto inferiore rispetto alla popolazione totale, variando rispettivamente da 8 a 0.3 copie di geni di resistenza ogni 1000 cellule batteriche (quantificate dall'abbondanza assoluta del gene 16S rDNA) nel 2016 e nel 2019 mentre la quantità assoluta di batteri con almeno un gene di resistenza è passata negli stessi anni da 30 a 100 batteri per ml.

**Tabella 12.** Confronto dell'abbondanza relativa dei determinanti genici di resistenza nel 2016 e nel 2019 nel Lago di Lugano espressa in percentuale del numero di copie del gene 16SrDNA.

Lugano	2016				2019			
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>
Primavera	0.002	-	0.02	-	0.008	0	0.2	0.01
Estate	0.03	-	0.01	0.001	0.04	0	0.322	0
Autunno	0.001	-	0.01	-	0.05	0.002	0.091	0
Inverno	0.002	-	0	0	0.09	0	0	0.06

Gandria	2016				2019			
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>
Primavera	-	-	0.99	-	0.006	0.001	0.17	0.009
Estate	0.05	-	0	-	0.004	0	0.02	-
Autunno	0	-	0	0.03	0	0	0.01	0
Inverno	0.36	-	0	-	0.02	0	0.04	0.08

Ponte Tresa	2016				2019			
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>
Primavera	0.002	-	0.01	0	0.12	0.07	1.82	0
Estate	0.001	-	0.03	-	0.009	0	0.06	-
Autunno	0	-	0.007	-	0	-	0.05	0
Inverno	0.001	0.004	0.01	-	0.37	-	0	0.06



Riva S. Vitale	2016				2019			
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>
Primavera	0.66	-	-	2.30	0.01	0	0	0
Estate	1.46	-	0	8.12	0.01	0	0.18	0
Autunno	0.07	-	0	0.28	0.05	0	0.12	0
Inverno	0	-	0	-	0.02	0	0.19	0

■ > 50%   
■ 10-50%   
■ 1-10%   
■ < 1%   
■ non quantificabile   
■ assente

Tabella 13: Differenza percentuale tra 2019 e il 2016 delle abbondanze relative dei geni di resistenza nel Lago.

differenza % ABR 2019-2016					
	<i>sullI</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>	<i>ermB</i>	media
<b>Lugano</b>	0.04	0.0005	0.14	0.02	0.05
<b>Gandria</b>	-0.13	0.0003	-0.19	0.003	-0.08
<b>Ponte Tresa</b>	0.12	0.03	0.47	0.02	0.16
<b>Riva S. Vitale</b>	-0.53	0.00	0.12	-3.57	-0.99

## 6. Conclusioni

Il lago Ceresio ed in particolare i tre fiumi immissari indagati possono essere considerati serbatoi ambientali di geni di resistenza e di batteri resistenti agli antibiotici. I dati ottenuti confermano lo stretto nesso tra resistenza agli antibiotici e carico inquinante di origine umana nell'ambiente e il forte impatto degli impianti di depurazione come fonte significativa di geni di resistenza e batteri resistenti. Infatti, i dati di presenza/assenza di geni di resistenza nei diversi campioni analizzati dimostrano la maggiore positività dei campioni prelevati da acque, come quelle del Vedeggio e del Cassarate, sottoposte ad un maggior impatto antropico. La quantificazione dei determinanti genici di resistenza e la valutazione delle loro abbondanze assoluta e relativa, permettendo di approfondire il risultato qualitativo, confermano che il Vedeggio subisce l'impatto negativo dello scarico dell'impianto di depurazione delle acque di Bioggio. In questo fiume si può stimare che due cellule batteriche ogni 100 possiedono almeno 1 gene di resistenza. Considerando il dato quantitativo assoluto annuale medio di cellule per millilitro di campione che è di circa  $1E+6$ , il carico di batteri con almeno un gene di resistenza nel fiume corrisponde a circa 20'000 cellule al ml.

L'abbondanza relativa del gene *intl*, che codifica per l'integrasi degli integroni clinici di classe 1, è un indicatore (proxy) di inquinamento di origine antropica (Gillings et al. 2015). Questo gene è mediamente presente in poco più di 3 cellule ogni 100 (30'000 batteri/ml) nel Vedeggio, nello 0.6 % delle cellule del Cassarate (6'000 batteri/ml) e in 4 batteri ogni 1'000 nel Magliasina (4'000 batteri/ml). Appare quindi evidente come i risultati del Vedeggio siano pesantemente influenzati dal carico inquinante di origine antropica causato dall'impianto di depurazione. Per contro, nel Cassarate, dove il depuratore è stato dismesso nel gennaio 2017, si è assistito ad una riduzione della quantità di geni di resistenza in confronto ai risultati precedenti (CIP AIS 2017). Il fiume Magliasina risulta essere quello dove l'impatto antropico, misurato tramite la resistenza agli antibiotici, è minore. I geni di resistenza rilevati in questo fiume potrebbero essere presenti naturalmente nei batteri eterotrofi che popolano l'acqua (Pei et al. 2006) e solo in parte avere origine da altre fonti che possono fungere da serbatoio per la selezione di geni di resistenza agli antibiotici come ad esempio gli scaricatori di piena o le acque provenienti dal settore dell'agricoltura e da piccoli allevamenti.

I risultati del monitoraggio delle acque del Lago sono comparabili a quelli ottenuti dall'analisi di altri laghi come il Lago di Ginevra in Svizzera (Czekalski et al. 2015, 2012) e il Lago Maggiore in Italia (Di Cesare et al. 2015). La minore quantità di geni di resistenza relativamente alla popolazione batterica totale e la minore presenza di batteri resistenti rispetto ai fiumi potrebbero essere dovute alla maggiore lontananza dagli scarichi e soprattutto alla maggiore diluizione delle acque contaminate, ciò spiegherebbe anche l'assenza di grandi differenze tra i vari punti di campionamento per quanto riguarda la distribuzione di geni e batteri resistenti. La presenza di geni di resistenza agli antibiotici e batteri resistenti nei pressi dell'impianto di captazione dell'acqua potabile richiede comunque ulteriori indagini per valutare il potenziale rischio del passaggio di questi geni alla rete idrica urbana.

Il confronto dei dati sulla diffusione dei determinanti di resistenza agli antibiotici delle due campagne CIP AIS del 2016 e del 2019 indicano una sostanziale stabilità nella Magliasina, il miglioramento del Cassarate e una leggera tendenza all'aumento nel fiume Vedeggio, confermando ancora una volta l'impatto sulla qualità delle acque degli impianti di depurazione. Il carico di determinanti di resistenza nei campionamenti a lago è rimasto invece piuttosto stabile, come certificato dai dati raffrontati delle due campagne. L'influsso degli apporti degli immissari sul

corpo d'acqua è mitigato dall'effetto di diluizione e probabilmente può essere rilevato solo su periodi di tempo più lunghi.

I geni *sul* e *tet* sono probabilmente stati selezionati dall'uso massiccio che si è fatto in passato di sulfamidici e tetracicline e sembrano oramai diventati parte integrante del genoma delle popolazioni batteriche ambientali (Czekalski et al. 2012; Berglund 2015). La diffusione dei geni *qnr* per la resistenza ai fluorochinoloni e *ermB* per quella ai macrolidi sembrerebbe invece più direttamente correlata all'attività antropica (Pallares-Vega et al. 2019). Il gene *qnrS* in particolare è stato isolato principalmente in presenza di acque di scarico, nei fanghi attivi e in corsi d'acqua situati nei pressi di impianti di depurazione (Berglund 2015). Da uno studio pubblicato nel 2011 sul consumo degli antibiotici a livello ospedaliero è emerso inoltre come nella Svizzera italiana il consumo di fluorochinoloni sia superiore rispetto al resto della Svizzera (Plüss-Suard et al. 2011; Filippini, Masiero, and Moschetti 2006), portando ad ipotizzare che la presenza del gene *qnr*, che non è stato trovato in altri laghi svizzeri (Czekalski et al. 2015, 2012), sia strettamente legata al maggiore utilizzo di questi antibiotici. Tra i geni di resistenza indagati sono da sottolineare i dati relativi al gene *bla<sub>CTX-M</sub>* che nel Vedeggio ha raggiunto concentrazioni relative medie di circa 0.04 copie/1000 copie di 16S rDNA, corrispondente a circa 40 batteri positivi per il gene per ogni ml di acqua campionata. *bla<sub>CTX-M</sub>*, il più diffuso tra le *Enterobacteriaceae* cliniche che mostrano un profilo di resistenza a largo spettro ai beta-lattamici (Ramadan et al. 2019) è stato identificato negli *E. coli* isolati dal Vedeggio ma anche in ceppi di *Enterobacter cloacae* multi-resistenti isolati dal Cassarate (dati non mostrati) e in *Enterobacteriaceae* ambientali isolate dai campionamenti del Lago a Lugano. *bla<sub>CTX-M</sub>* codifica per delle  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL) e si è diffuso rapidamente dai ceppi clinici all'ambiente (M. F. Lartigue et al. 2007; R Cantón et al. 2008) grazie al fatto di essere associato a plasmidi altamente mobilizzabili (Amos et al. 2014; Rafael Cantón and Coque 2006). La sua presenza in ceppi ambientali è strettamente collegata all'utilizzo massiccio degli antibiotici beta-lattamici. Il gene, presente soprattutto nelle enterobatteriacee di interesse clinico come *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae* (Wang et al. 2013), può essere trasferito anche ad altre specie batteriche della classe delle gammaproteobacteria come *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Aeromonas spp.* (Al Naiemi, Duim, and Bart 2006; Piotrowska et al. 2017; Lu et al. 2010) che possono fungere da vettori contribuendo alla diffusione della resistenza a microrganismi patogeni o patogeni opportunisti (Manaia 2017).

I batteri multi-resistenti isolati dai campioni d'acqua raccolti nel presente studio possono essere suddivisi in batteri prevalentemente ambientali (*Aeromonas spp.*, *Acinetobacter spp.* e *Stenotrophomonas spp.*) in grado di acquisire e trasferire facilmente l'antibiotico-resistenza orizzontalmente e batteri isolati nell'ambiente ma presenti nella normale flora umana e animale con possibile rilevanza clinica (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*). Anche questi batteri possono facilmente acquisire geni di resistenza e ritornare all'uomo per esempio attraverso il ciclo di riutilizzo dell'acqua (Manaia 2017; Aslan et al. 2018; Fahrenfeld et al. 2013).

Stabilire una soglia di rischio d'infezione per l'uomo legato alla quantità di batteri resistenti nell'ambiente è probabilmente impossibile: la presenza di batteri resistenti al di sotto della dose infettiva non può essere associata ad un basso fattore di rischio perché i batteri sono in grado di moltiplicarsi velocemente nel corpo umano (Manaia 2017; Ben et al. 2019) mentre la presenza anche sporadica di geni di resistenza potrebbe interferire con un eventuale trattamento. A fini preventivi per la salute pubblica si dovrebbe perciò applicare il principio di precauzione e tendere al raggiungimento dei livelli più bassi possibili delle quantità di geni di resistenza e di batteri resistenti anche nell'ambiente acquatico.

In una visione "One-Health", solo un monitoraggio continuo a medio-lungo termine permetterebbe di verificare i cambiamenti dello stato delle acque e di capire meglio il ruolo dell'ambiente nella diffusione di geni e di batteri resistenti.

## 7. Bibliografia

- Amos, G. C.A., P. M. Hawkey, W. H. Gaze, and E. M. Wellington. 2014. "Waste Water Effluent Contributes to the Dissemination of CTX-M-15 in the Natural Environment." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (7): 1785–91. <https://doi.org/10.1093/jac/dku079>.
- Aslan, Asli, Zachariah Cole, Anunay Bhattacharya, and Oghenekpaobor Oyibo. 2018. "Presence of Antibiotic-Resistant Escherichia Coli in Wastewater Treatment Plant Effluents Utilized as Water Reuse for Irrigation." *Water (Switzerland)* 10 (6). <https://doi.org/10.3390/w10060805>.
- Ben, Yujie, Caixia Fu, Min Hu, Lei Liu, Ming Hung Wong, and Chunmiao Zheng. 2019. "Human Health Risk Assessment of Antibiotic Resistance Associated with Antibiotic Residues in the Environment: A Review." *Environmental Research* 169 (July 2018): 483–93. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>.
- Berglund, Björn. 2015. "Environmental Dissemination of Antibiotic Resistance Genes and Correlation to Anthropogenic Contamination with Antibiotics." *Infection Ecology & Epidemiology* 5 (January): 28564. <https://doi.org/10.3402/iee.v5.28564>.
- Cantón, R. 2009. "Antibiotic Resistance Genes from the Environment: A Perspective through Newly Identified Antibiotic Resistance Mechanisms in the Clinical Setting." *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 15 Suppl 1 (January): 20–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02679.x>.
- Cantón, R, A Novais, A Valverde, E Machado, L Peixe, F Baquero, and T M Coque. 2008. "Prevalence and Spread of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Europe." *Clinical Microbiology and Infection* 14 Suppl 1 (January): 144–53. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01850.x>.
- Cantón, Rafael, and Teresa M Coque. 2006. "The CTX-M Beta-Lactamase Pandemic." *Current Opinion in Microbiology* 9 (5): 466–75. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.08.011>.
- Carnelli, Alessandro, Federica Mauri, and Antonella Demarta. 2017. "Characterization of Genetic Determinants Involved in Antibiotic Resistance in Aeromonas Spp. and Fecal Coliforms Isolated from Different Aquatic Environments." *Research in Microbiology*. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2017.02.006>.
- Cesare, Andrea Di, Ester M. Eckert, Alessia Teruggi, Diego Fontaneto, Roberto Bertoni, Cristiana Callieri, and Gianluca Corno. 2015. "Constitutive Presence of Antibiotic Resistance Genes within the Bacterial Community of a Large Subalpine Lake." *Molecular Ecology* 24 (15): 3888–3900. <https://doi.org/10.1111/mec.13293>.
- Cesare, Andrea Di, Gian Marco Luna, Carla Vignaroli, Sonia Pasquaroli, Sara Tota, Paolo Paroncini, and Francesca Biavasco. 2013. "Aquaculture Can Promote the Presence and Spread of Antibiotic-Resistant Enterococci in Marine Sediments." *PLoS ONE* 8 (4): e62838. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062838>.
- CIPAIS-Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere. 2017. "Lago di Lugano: ricerca e monitoraggio di determinati geni di resistenza agli antibiotici nelle acque del Ceresio e di alcuni fiumi immissari, Campagna 2016".
- CIPAIS - Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere. 2019. "Ricerche Sull'evoluzione del Lago di Lugano, Aspetti limnologici, Campagna 2018".
- Czekalski, Nadine, Tom Berthold, Serena Caucci, Andrea Egli, and Helmut Bürgmann. 2012. "Increased Levels of Multiresistant Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and Their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland." *Frontiers in Microbiology* 3 (MAR): 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00106>.
- Czekalski, Nadine, Elena Gascón Díez, and Helmut Bürgmann. 2014. "Wastewater as a Point Source of Antibiotic-Resistance Genes in the Sediment of a Freshwater Lake." *ISME Journal* 8 (7): 1381–90. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.8>.

- Czekalski, Nadine, Radhika Sigdel, Julia Birtel, Blake Matthews, and Helmut Bürgmann. 2015. "Does Human Activity Impact the Natural Antibiotic Resistance Background? Abundance of Antibiotic Resistance Genes in 21 Swiss Lakes." *Environment International* 81: 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.04.005>.
- Fahrenfeld, Nicole, Yanjun Ma, Maureen O'Brien, and Amy Pruden. 2013. "Reclaimed Water as a Reservoir of Antibiotic Resistance Genes: Distribution System and Irrigation Implications." *Frontiers in Microbiology* 4 (MAY): 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00130>.
- Filippini, Massimo, Giuliano Masiero, and Karine Moschetti. 2006. "Socioeconomic Determinants of Regional Differences in Outpatient Antibiotic Consumption: Evidence from Switzerland." *Health Policy* 78 (1): 77–92. <https://doi.org/10.1016/j.healthpol.2005.09.009>.
- Gillings, Michael R., William H. Gaze, Amy Pruden, Kornelia Smalla, James M. Tiedje, and Yong Guan Zhu. 2015. "Using the Class 1 Integron-Integrase Gene as a Proxy for Anthropogenic Pollution." *ISME Journal* 9 (6): 1269–79. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.226>.
- Hembach, Norman, Ferdinand Schmid, Johannes Alexander, Christian Hiller, Eike T. Rogall, and Thomas Schwartz. 2017. "Occurrence of the Mcr-1 Colistin Resistance Gene and Other Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes in Microbial Populations at Different Municipal Wastewater Treatment Plants in Germany." *Frontiers in Microbiology* 8 (JUL): 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282>.
- Jäger, Thomas, Norman Hembach, Christian Elpers, Arne Wieland, Johannes Alexander, Christian Hiller, Gerhard Krauter, and Thomas Schwartz. 2018. "Reduction of Antibiotic Resistant Bacteria During Conventional and Advanced Wastewater Treatment, and the Disseminated Loads Released to the Environment." *Frontiers in Microbiology* 9 (October): 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02599>.
- Lartigue, Marie-Frédérique, Catherine Zinsius, Aline Wenger, Jacques Bille, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. 2007. "Extended-Spectrum Beta-Lactamases of the CTX-M Type Now in Switzerland." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (8): 2855–60. <https://doi.org/10.1128/AAC.01614-06>.
- Lartigue, Marie-Frédérique, Catherine Zinsius, Aline Wenger, Jacques Bille, Laurent Poirel, and Patrice Nordmann. 2007. "Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases of the CTX-M Type Now in Switzerland." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51 (8): 2855–60. <https://doi.org/10.1128/AAC.01614-06>.
- Lu, Su-Ying, Ya-Li Zhang, Sui-Na Geng, Tian-Yu Li, Zhuo-Ming Ye, Dong-Sheng Zhang, Fei Zou, and Hong-Wei Zhou. 2010. "High Diversity of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Bacteria in an Urban River Sediment Habitat." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (17): 5972–76. <https://doi.org/10.1128/AEM.00711-10>.
- Manaia, Cèlia M. 2017. "Assessing the Risk of Antibiotic Resistance Transmission from the Environment to Humans: Non-Direct Proportionality between Abundance and Risk." *Trends in Microbiology* 25 (3): 173–81. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.11.014>.
- Naiemi, Nashwan Al, Birgitta Duim, and Aldert Bart. 2006. "A CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Pseudomonas Aeruginosa* and *Stenotrophomonas Maltophilia* [2]." *Journal of Medical Microbiology* 55 (11): 1607–8. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.46704-0>.
- Nardelli, Maximiliano, Paula Marina Scalzo, María Soledad Ramírez, María Paula Quiroga, Marcelo Hernán Cassini, and Daniela Centrón. 2012. "Class 1 Integrons in Environments with Different Degrees of Urbanization." *PLoS One* 7 (6): e39223. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039223>.
- OMS. 2018. "Antimicrobial resistance - Key facts". Disponible online alla pagina: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>.
- Pallares-Vega, Rebeca, Hetty Blaak, Rozemarijn van der Plaats, Ana M. de Roda Husman, Lucia Hernandez Leal, Mark C.M. van Loosdrecht, David G. Weissbrodt, and Heike Schmitt. 2019. "Determinants of Presence and Removal of Antibiotic Resistance Genes during WWTP Treatment: A Cross-Sectional Study." *Water Research* 161: 319–28. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.05.100>.
- Pazda, Magdalena, Jolanta Kumirska, Piotr Stepnowski, and Ewa Mulkiewicz. 2019. "Antibiotic Resistance Genes Identified in Wastewater Treatment Plant Systems – A Review." *Science of the Total Environment* 697: 134023. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134023>.

- Pei, Ruoting, Sung Chul Kim, Kenneth H. Carlson, and Amy Pruden. 2006. "Effect of River Landscape on the Sediment Concentrations of Antibiotics and Corresponding Antibiotic Resistance Genes (ARG)." *Water Research* 40 (12): 2427–35. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.04.017>.
- Piotrowska, Marta, Dominika Przygodzinska, Klaudia Matyjewicz, and Magdalena Popowska. 2017. "Occurrence and Variety of SS-Lactamase Genes among *Aeromonas* Spp. Isolated from Urban Wastewater Treatment Plant." *Frontiers in Microbiology* 8 (MAY): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00863>.
- Plüss-Suard, C., A. Pannatier, A. Kronenberg, K. Mühlemann, and G. Zanetti. 2011. "Hospital Antibiotic Consumption in Switzerland: Comparison of a Multicultural Country with Europe." *Journal of Hospital Infection* 79 (2): 166–71. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2011.05.028>.
- Ramadan, Ahmed A., Neveen A. Abdelaziz, Magdy A. Amin, and Ramy K. Aziz. 2019. "Novel BlaCTX-M Variants and Genotype-Phenotype Correlations among Clinical Isolates of Extended Spectrum Beta Lactamase-Producing *Escherichia Coli*." *Scientific Reports* 9 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39730-0>.
- Rodriguez-Mozaz, Sara, Sara Chamorro, Elisabet Marti, Belinda Huerta, Meritxell Gros, Alexandre Sànchez-Melsió, Carles M. Borrego, Damià Barceló, and Jose Luis Balcázar. 2015. "Occurrence of Antibiotics and Antibiotic Resistance Genes in Hospital and Urban Wastewaters and Their Impact on the Receiving River." *Water Research* 69: 234–42. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2014.11.021>.
- Stalder, Thibault, Olivier Barraud, Magali Casellas, Christophe Dagot, and Marie-Cécile Ploy. 2012. "Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance." *Frontiers in Microbiology* 3 (April): 119. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3321497&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Su, Sicong, Chenyu Li, Jiping Yang, Qunying Xu, Zhigang Qiu, Bin Xue, Shang Wang, et al. 2020. "Distribution of Antibiotic Resistance Genes in Three Different Natural Water Bodies—a Lake, River and Sea." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 17 (2): 1–12. <https://doi.org/10.3390/ijerph17020552>.
- Wang, Guiqing, Tiangui Huang, Pavan Kumar Makam Surendraiah, Kemeng Wang, Rashida Komal, Jian Zhuge, Chian Ru Chern, Alexander A. Kryszuk, Cassidy King, and Gary P. Wormser. 2013. "CTX-M  $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella Pneumoniae* in Suburban New York, New York, USA." *Emerging Infectious Diseases* 19 (11): 1803–10. <https://doi.org/10.3201.1911.121470>.
- Zarfel, Gernot, Michaela Lipp, Elena Gürtl, Bettina Folli, Rita Baumert, and Clemens Kittinger. 2017. "Troubled Water under the Bridge: Screening of River Mur Water Reveals Dominance of CTX-M Harboring *Escherichia Coli* and for the First Time an Environmental VIM-1 Producer in Austria." *Science of the Total Environment* 593–594: 399–405. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.138>.

## 8. Allegati

**Tabella 8: Distribuzione dei determinanti di resistenza negli isolati identificati nei campionamenti di fiumi.**

	FIUMI																	
	Veduggio						Cassarate						Magliasina					
	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Flavobacteriaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Brevundimonas</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacteriaceae ambientali	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

**Tabella 9: Distribuzione dei determinanti di resistenza negli isolati identificati nei campionamenti del Lago.**

	LAGO																													
	Lugano						Gandria						Figino						Ponte Tresa						Riva San Vitale					
	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I	<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	<i>sul</i> II	<i>qnr</i> S	<i>tet</i> A	<i>erm</i> B	<i>int</i> I
<i>Stenotrophomonas</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavobacteriaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>Brevundimonas</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterobacteriaceae ambientali	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter</i> spp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



**Tabella 14.** Sono riportati I valori espressi come copie di DNA per ml di acqua filtrati ottenuti dall'analisi quantitativa dei geni di resistenza agli antibiotici, del gene *16S rDNA* e del gene *intl*. Le tabelle si riferiscono ai fiumi Veduggio, Cassarate e Magliasina. NEG: negativo; NI: non incluso; < LOQ: al di sotto del limite di quantificazione (vedi valori in Tabella 2).

	Veduggio							Cassarate						Magliasina					
	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	ctxM	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl
Gennaio	9E+05	2E+04	4E+03	2E+03	3E+03	8E+04	< LOQ	2E+05	6E+01	4E+02	< LOQ	1E+03	2E+03	8E+04	< LOQ	neg	< LOQ	NEG	3E+02
Febbraio	5E+05	4E+04	3E+03	7E+02	4E+02	6E+04	7E+01	1E+05	2E+02	< LOQ	NEG	2E+02	8E+02	5E+04	2E+01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	2E+02
Marzo	4E+06	2E+03	3E+03	7E+02	2E+03	7E+04	< LOQ	2E+05	2E+02	3E+02	3E+02	5E+02	9E+02	1E+05	2E+02	6E+02	< LOQ	4E+02	5E+02
Aprile	6E+05	4E+03	2E+02	4E+02	1E+03	2E+04	< LOQ	2E+05	4E+02	1E+01	4E+02	1E+04	8E+02	1E+05	< LOQ	< LOQ	< LOQ	1E+03	1E+03
Maggio	6E+05	6E+03	2E+02	7E+02	2E+03	8E+03	< LOQ	3E+05	1E+02	9E+00	6E+02	8E+02	7E+02	2E+05	7E+01	3E+03	5E+02	7E+01	3E+02
Giugno	1E+06	1E+04	1E+04	1E+04	2E+04	7E+04	5E+01	3E+05	1E+02	9E+00	1E+03	8E+02	1E+03	3E+05	9E+01	4E+03	< LOQ	< LOQ	6E+02
Luglio	4E+05	5E+04	1E+02	3E+02	4E+02	3E+03	< LOQ	1E+05	2E+02	6E+01	NEG	< LOQ	4E+02	1E+05	3E+02	< LOQ	5E+02	< LOQ	2E+02
Agosto	4E+05	2E+04	5E+02	2E+03	9E+04	5E+03	1E+02	NI	NI	NI	NI	NI	NI	7E+04	9E+01	8E+02	< LOQ	< LOQ	5E+02
Settembre	7E+05	3E+04	4E+02	8E+02	1E+03	2E+03	< LOQ	1E+05	2E+02	5E+01	< LOQ	< LOQ	2E+02	1E+05	3E+02	4E+02	< LOQ	< LOQ	6E+02
Ottobre	8E+05	5E+04	6E+03	1E+03	3E+03	1E+04	< LOQ	2E+05	2E+02	6E+02	< LOQ	3E+02	3E+02	1E+05	4E+02	3E+02	< LOQ	8E+02	1E+03
Novembre	2E+06	2E+05	3E+04	4E+03	2E+05	3E+04	6E+01	6E+05	3E+03	9E+03	8E+02	9E+04	3E+03	1E+05	1E+02	8E+02	< LOQ	< LOQ	8E+01
Dicembre	7E+05	4E+05	3E+03	4E+02	2E+04	1E+04	< LOQ	8E+04	2E+02	3E+03	< LOQ	1E+04	2E+03	4E+04	1E+02	< LOQ	< LOQ	2E+02	4E+01

**Tabella 15.** Sono riportati i valori espressi come copie di DNA per ml di acqua filtrati ottenuti dall'analisi quantitativa dei geni di resistenza agli antibiotici, del gene 16SrDNA e del gene *intl*. Le tabelle si riferiscono ai punti di campionamento del Lago: Lugano, Gandria, Ponte Tresa, Figino e Riva San Vitale. NEG: negativo; NI: non incluso; < LOQ: al di sotto del limite di quantificazione (vedi valori in Tabella 2).

	Lugano						Gandria					
	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl
<b>Primavera</b>	3E+05	2E+01	< LOQ	6E+02	5E+01	6E+02	5E+05	3E+01	6E+00	9E+02	5E+01	3E+03
<b>Estate</b>	1E+05	6E+01	< LOQ	5E+02	< LOQ	2E+02	1E+06	4E+01	< LOQ	3E+02	NEG	7E+02
<b>Autunno</b>	4E+05	2E+02	7E+00	3E+02	< LOQ	2E+02	2E+06	< LOQ	< LOQ	3E+02	< LOQ	2E+02
<b>Inverno</b>	7E+05	6E+02	< LOQ	< LOQ	5E+02	9E+02	1E+06	2E+02	< LOQ	4E+02	8E+02	5E+02
	Ponte Tresa						Figino					
	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl
<b>Primavera</b>	2E+04	2E+01	1E+01	3E+02	< LOQ	< LOQ	9E+06	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3E+03
<b>Estate</b>	6E+05	5E+01	< LOQ	4E+02	NEG	3E+03	NI	NI	NI	NI	NI	NI
<b>Autunno</b>	1E+06	< LOQ	NEG	5E+02	< LOQ	3E+03	1E+06	4E+02	NEG	5E+02	< LOQ	1E+03
<b>Inverno</b>	2E+05	8E+02	NEG	< LOQ	1E+02	2E+02	8E+05	5E+01	1E+02	< LOQ	7E+02	2E+04
	Riva San Vitale											
	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl						
<b>Primavera</b>	2E+05	2E+01	< LOQ	< LOQ	< LOQ	3E+03						
<b>Estate</b>	2E+05	2E+01	< LOQ	4E+02	< LOQ	8E+02						
<b>Autunno</b>	4E+05	2E+02	< LOQ	5E+02	< LOQ	1E+03						
<b>Inverno</b>	3E+05	5E+01	< LOQ	5E+02	< LOQ	7E+03						