

Commissione internazionale  
per la protezione delle acque italo-svizzere



**PROGRAMMA 2019-2021**

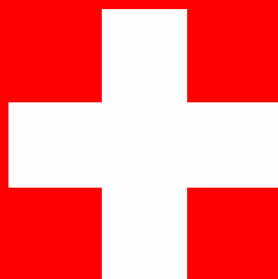
**RAPPORTO ANNUALE 2020**

**RICERCA E MONITORAGGIO DI DETERMINANTI GENICI DI  
RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI NELLE ACQUE DI ALCUNI FIUMI IMMISSARI DEL  
LAGO DI LUGANO**

*a cura di*

Federica Mauri

Mendrisio, 2022





I dati riportati nel presente volume possono essere utilizzati purché se ne citi la fonte come segue:  
**Istituto microbiologia (IM-SUPSI). 2022:** Ricerca e monitoraggio di determinanti genici di resistenza agli antibiotici nelle acque di alcuni fiumi immissari del Lago Lugano. Programma triennale 2019-2021. Campagna 2020. Commissione Internazionale per la Protezione delle Acque Italo-Svizzere (Ed.); 31 pp.

## Sintesi

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare se le attività antropiche possano influenzare le popolazioni batteriche naturalmente presenti negli ambienti acquatici in termini di resistenza agli antibiotici. Per raggiungere il nostro obiettivo abbiamo studiato la presenza di determinanti di resistenza agli antibiotici in campioni d'acqua raccolti da alcuni fiumi affluenti. Abbiamo analizzato i campioni d'acqua mediante qPCR per quantificare cinque geni di resistenza agli antibiotici (ARG) che conferiscono resistenza alle principali classi di antibiotici utilizzati in ambito clinico e veterinario ( $\beta$ -lattamici, macrolidi, tetracicline, chinoloni e sulfamidici) e abbiamo quantificato il gene *intl1* che codifica per l'integrasi. Utilizzando piastre selettive e spettrometria di massa, abbiamo isolato e identificato i batteri multiresistenti. I campioni d'acqua sono stati raccolti mensilmente da gennaio 2020 a dicembre 2020, da tre fiumi situati nella Svizzera meridionale (Vedeggio, Cassarate e Magliasina). La conta totale delle cellule in tutti i campioni d'acqua è stata valutata mediante conteggio su piastra agar. Abbiamo trovato almeno cinque geni quantificabili *sull1*, *qnrS*, *tetA*, *bla<sub>CTXM</sub>*, *ermB* soprattutto nel fiume influenzato dagli impianti di trattamento delle acque reflue. I batteri multiresistenti trovati nei nostri campioni possono essere suddivisi in batteri ambientali (*Aeromonas spp.*, *Acinetobacter spp.* e *Stenotrophomonas spp.*) e batteri commensali umani clinicamente rilevanti (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii*). I nostri risultati indicano che l'ambiente idrico è una grande fonte di ARG e potrebbe essere considerato il contesto ideale per la trasmissione della resistenza da batteri ambientali non patogeni o potenzialmente patogeni (serbatoio) a patogeni umani (vettore).

## Summary

The aim of this work was to assess if anthropic activities could influence the bacterial populations naturally present in water environments in terms of antibiotic resistance. To reach our objective we investigate the presence of antibiotic resistance determinants in water samples collected from some tributary rivers. We analysed water samples by qPCR to quantify five antibiotics resistance genes that confers resistance to the major classes of antibiotics used in clinical and veterinary ( $\beta$ -lactams, macrolides, tetracycline, quinolones and sulphonamides) then we quantified the *intI* gene that codify for integrase. Using selective plates and mass spectrometry, we isolated and identified multi-resistant bacteria. Water samples were collected from January 2020 to December 2020, from three rivers located in south Switzerland (Vedeggio, Cassarate and Magliasina). Total count of viable cells in all water samples were evaluated by agar plate count. We found at least five quantifiable genes *sullI*, *qnrS*, *tetA*, *bla<sub>CTXM</sub>*, *ermB* especially in the river influenced by wastewater treatment plants. Multi-resistant bacteria found in our samples could be divided in, mostly environmental (*Aeromonas spp.*, *Acinetobacter spp.* e *Stenotrophomonas spp.*) and human commensal bacteria clinically relevant (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* and *Citrobacter freundii*). Our results indicate that water environment is a big source of ARGs and could be considered the ideal setting for the transmission of resistance from environmental non-pathogenic or potentially pathogenic bacteria (reservoir) to human pathogens (vector).

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>8</b>
1.1. RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI – ASPETTI GENERALI E AMBIENTE ACQUATICO .....	8
1.2. PUNTI DI CAMPIONAMENTO E PRELIEVI .....	9
<b>2. IDENTIFICAZIONE E QUANTIFICAZIONE DI DETERMINANTI GENICI DI RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI .....</b>	<b>10</b>
2.1. PRESENZA/ASSENZA DI DETERMINATI GENICI DI RESISTENZA.....	10
2.2. <i>ABBONDANZA ASSOLUTA DEI GENI DI RESISTENZA E DEL GENE INT1</i> .....	10
2.3. <i>ABBONDANZA RELATIVA DEI GENI DI RESISTENZA E DEL GENE INT1</i> .....	12
<b>3. INDAGINI BATTERIOLOGICHE.....</b>	<b>14</b>
3.1. CONTE BATTERICHE TOTALI.....	14
3.2. ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE DI BATTERI RESISTENTI AGLI ANTIBIOTICI .....	14
<b>4. CONFRONTO DEI RISULTATI DELLE ANALISI QUANTITATIVE NEI FIUMI (2016, 2019 E 2020) .....</b>	<b>17</b>
4.1. QUANTIFICAZIONE E TENDENZA ANNUALE DELLA QUANTITÀ ASSOLUTA E RELATIVA DEI DETERMINANTI GENICI DI RESISTENZA .....	17
<b>5. CONCLUSIONI .....</b>	<b>20</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>23</b>
<b>ALLEGATI .....</b>	<b>27</b>
<b>APPENDICE I APPROFONDIMENTI METODOLOGICI .....</b>	<b>29</b>

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

Antonella Demarta e Federica Mauri

Scuola universitaria professionale della svizzera italiana – DACD, IM, Mendrisio

### Programma 2020

Il programma di analisi per il 2020 è stato leggermente modificato, in considerazione dei risultati ottenuti nelle scorse campagne e di alcuni test aggiuntivi eseguiti presso il nostro laboratorio al di fuori della campagna CIP AIS, rispettando il budget approvato dalla Commissione. Le variazioni al programma, esposte e motivate di seguito, sono state introdotte per migliorare la qualità delle analisi e per permettere il confronto dei risultati con le campagne precedenti. Per l'anno 2020 sono stati previsti i campionamenti dei tre fiumi Vedeggio, Cassarate e Magliasina con cadenza mensile per la ricerca di determinanti molecolari coinvolti nello sviluppo di antibiotico resistenza: il gene per l'integrasi *intl* e i geni *suII*, *tetA*, *qnrS*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, e *ermB* che conferiscono resistenza, rispettivamente, a sulfamidici, tetracicline, fluorochinoloni,  $\beta$ -lattamici e macrolidi, antibiotici largamente utilizzati in medicina umana e veterinaria. Come nel 2019, lo screening qualitativo tramite PCR è stato sostituito con l'analisi quantitativa di tutti i geni che saranno poi rapportati al gene 16S rDNA, quantificato come indicatore della popolazione batterica totale. La ricerca dei geni *vanA* (resistenza alla vancomicina) e *mcr-1* (resistenza alla colistina), presenti soprattutto nelle acque di scarico prima del trattamento negli impianti di depurazione e solo in quantità minime nelle acque depurate, non è stata eseguita già durante la Campagna 2019 ed è stata sostituita dalla ricerca dei geni di resistenza nei batteri multi-resistenti isolati. Per quanto riguarda i geni di resistenza ai  $\beta$ -lattamici, la ricerca qualitativa di *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* è stata sostituita dal 2019 con la ricerca quantitativa (qPCR) del gene *bla<sub>CTX-M</sub>* nei campioni del Vedeggio e la ricerca qualitativa tramite PCR nei batteri multi-resistenti isolati sulle piastre selettive. Il cambiamento intercorso deriva dalla migliore correlazione tra la diffusione del gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, e l'uso clinico di  $\beta$ -lattamici: *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* erano i geni che conferiscono il fenotipo ESBL predominante negli anni '80 – '90, ma la loro prevalenza è diminuita in favore dei geni *bla<sub>CTX-M</sub>*. Inoltre, questo gene presente soprattutto nelle enterobatteriacee di interesse clinico come *E. coli* e *K. pneumoniae*, (Zeynudin et al. 2018) può essere trasferito anche ad altre specie batteriche ambientali come *P. aeruginosa*, *S. malthophilia* (Maravić et al. 2014) e *Aeromonas spp.* (Maravić et al. 2013), che possono fungere da vettori contribuendo alla diffusione della resistenza a microrganismi patogeni o patogeni opportunisti. Dal programma del 2020, come già nello scorso anno, sono state eliminate le analisi di citometria a flusso, per l'impossibilità del laboratorio di analizzare i campioni su tutto l'arco dell'anno, e quelle di isolamento dei batteri da piastra selettiva contenente Trimethoprim/Sulfamethoxazolo che si è rivelata non abbastanza selettiva.

## 1. Introduzione

### 1.1. 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 (Martins and Rabinowitz 2020; WHO 2020). 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 (Huijbers, Flach, and Larsson 2019). 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. Il confronto dei dati sulla diffusione dei determinanti di resistenza agli antibiotici delle campagne 2016, 2019 e 2020 indica il miglioramento del fiume Cassarate, una tendenza alla diminuzione nel torrente Magliasina e una tendenza all'aumento nel fiume Veduggio, confermando l'impatto sulla qualità delle acque degli impianti di depurazione.



## 1.2. Punti di campionamento e prelievi

Il monitoraggio delle acque è iniziato nel mese di gennaio del 2020. I prelievi dei fiumi sono stati effettuati a cadenza mensile (gennaio-dicembre). La Figura 1 mostra tutti i punti di campionamento considerati per le indagini del 2020. 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. I tre fiumi scelti presentano tre diversi scenari: il fiume Vedeggio è situato a valle dell'impianto di depurazione acque (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.



**Figura 1:** Illustrazione dell'ubicazione dei punti di campionamento dei tre immissari (stelle) considerati nel monitoraggio 2020, nella mappa è indicata anche la posizione (cerchi) dei due impianti di depurazione delle acque (IDA) del medio-Cassarate chiuso dal 2017 e l'IDA di Bioggio tuttora attivo.

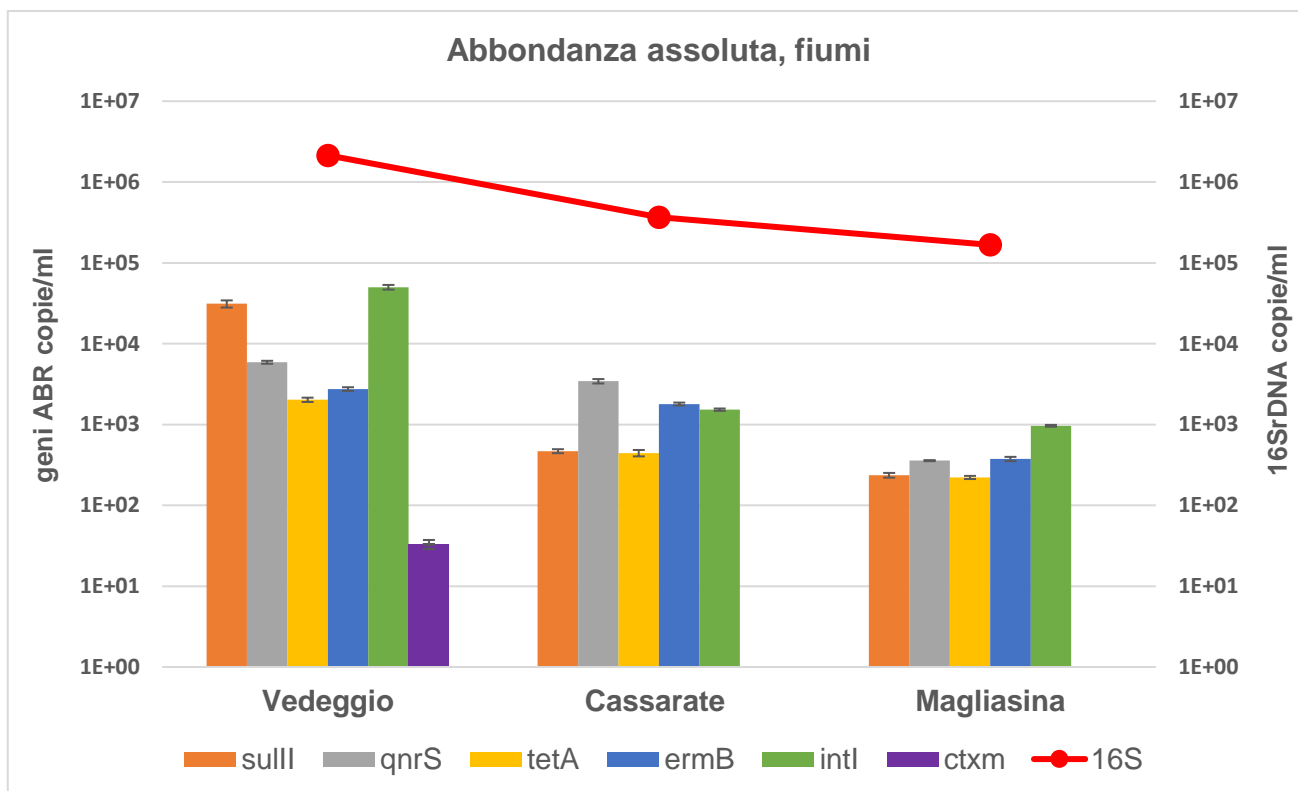
## 2. Identificazione e quantificazione di determinanti genici di resistenza agli antibiotici

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

I risultati del monitoraggio del 2020 mostrano che in tutti i campioni d'acqua raccolti mensilmente nel fiume Vedeggio 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 *sullI* erano talvolta assenti o presenti ma sotto il limite di quantificazione.

### 2.2. 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 Vedeggio (media annuale 16S rDNA  $2 \cdot 10^6$  copie/ml) rispetto al Cassarate (media annuale 16S rDNA  $4 \cdot 10^5$  copie/ml) e al Magliasina (media annuale 16S rDNA  $2 \cdot 10^5$  copie/ml). Anche la quantità di determinanti genici di resistenza è maggiore nel Vedeggio dove la media annuale complessiva dei geni di resistenza e del gene *intI* è pari a  $2 \cdot 10^4$  copie/ml (Cassarate  $2 \cdot 10^3$  copie/ml; Magliasina  $5 \cdot 10^2$  copie/ml). In ordine decrescente i geni di resistenza più abbondanti tra quelli ricercati nei tre fiumi sono: *intI* (media annuale complessiva dei tre fiumi  $2 \cdot 10^4$  copie/ml), *sullI* (media annuale complessiva dei tre fiumi  $1 \cdot 10^4$  copie/ml), *qnrS* ed *ermB* (medie annuali complessive dei tre fiumi  $3 \cdot 10^3$  copie/ml e  $2 \cdot 10^3$  copie/ml), *tetA* (media annuale complessiva dei tre fiumi  $9 \cdot 10^2$  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 2020 solo nel fiume Vedeggio, è molto meno abbondante (media annuale  $3 \cdot 10^1$  copie/ml) rispetto agli altri geni di resistenza.



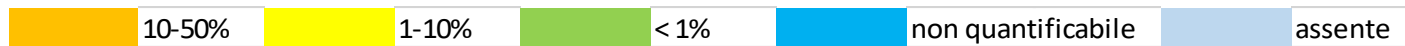
**Figura 2:** Medie annuali dell'abbondanza assoluta dei geni di resistenza (geni ABR), del gene *intl* e del gene *16S rDNA* nei fiumi. La quantità è espressa in copie del gene per ml di acqua campionata su scala logaritmica. Le barre rappresentano l'errore standard dei replicati della qPCR.

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

L'abbondanza relativa è espressa come rapporto tra la 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 1 riassume i valori di abbondanza relativa dei geni indagati espressi in percentuale per i campionamenti nei fiumi. Nel Vedeggio il gene *intl* è presente in media nel 2.3% 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. *suII* è presente mediamente nel 3.2 % dei batteri dei campionamenti del Vedeggio. In gennaio, aprile, maggio e dicembre la percentuale di batteri contenenti questo gene è stata compresa tra 1% e 20%, mentre nei restanti mesi è risultata inferiore all'1%. Nel Cassarate *suII* è presente nella popolazione batterica al di sotto dell'1% eccetto nel campionamento del mese di dicembre dove raggiunge l'1.5%. Nei campioni d'acqua dei fiumi Vedeggio e Cassarate l'abbondanza relativa del gene *tetA* è risultata mediamente uguale o inferiore a 3 copie del gene ogni 1'000 copie del gene 16S rDNA. L'abbondanza relativa media di *qnrS* nel Vedeggio e nel Cassarate è risultata essere di circa 8 copie ogni 1'000 copie di 16S rDNA. Il gene *ermB* è stato rilevato in circa 1.5 copie ogni 100 copie di 16SrDNA nel fiume Vedeggio e 5 copie ogni 1'000 copie di 16SrDNA nel Cassarate. Nel Magliasina i geni *suII*, *qnrS*, *tetA* ed *ermB* sono presenti tutti al di sotto dell'1% sul totale della popolazione batterica. Il gene *bla<sub>CTX-M</sub>*, pur essendo presente in tutti i campioni del fiume Vedeggio anche se non sempre quantificabile, ha raggiunto concentrazioni relative medie di circa 0.02 copie/1000 copie di 16S rDNA, molto inferiori agli altri geni analizzati nel corso dell'anno.

**Tabella 1:** Abbondanza relativa dei determinanti genici di resistenza nei fiumi espressa in percentuale del numero di copie del gene *16S rDNA*.

	Veduggio						Cassarate					Magliasina				
	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	ctxm	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl
gennaio	4.0	0.2	0.05	0.1	0.5	0	0.1	0.3	0.1	0.1	0.2	0	0	0.04	0.04	0.1
febbraio	0.7	0.1	0.02	0.03	0.7	0.001	0.004		0.01	0.01	0.1	0		0.01		0.1
marzo	0.8	0.1	0.04	0.03	1.2	0	0.01	0.01	0.1	0.01	0.3	0.05	0.02	0.04	0.04	0.1
aprile	20	1.1	1.4	1.8	5.4	0	0.1	0.3	0.9	1.9	0.7	0.1	0.03	0.4	0.2	0.5
maggio	1.6	0.7	1.2	0.6	2.0	0.005	0.1	0	0.5	0.3	0.4	0.1	0	0.3	0.1	0.3
giugno	0.5	3.9	0.09	15	2.6	0	0.02	2.4	0.04	1.8	0.2	0.03	0.9	0.1	0.01	0.4
luglio	0.2	0.1	0.03	0.13	0.4	0	0.1	0.2	0.03	0.1	0.4	0.1	0.1	0.02	0.03	0.8
agosto	0.5	1.9	0.3	0.3	3.5	0.005	0.2	4.9	0.1	0.4	1.0	0.1	0.1	0.1	0.03	1.0
settembre	0.3	0.7	0.2	0.4	2.8	0.001	0.2	0.03	0.1	0.5	0.6	0.2	0.3	0.1	0.3	1.0
ottobre	0.2	0.1	0.03	0.02	1.6	0	0.1	0.04	0.03	0.4	0.2	0.01	0	0.03	0.01	0.1
novembre	0.9	0.1	0.01	0.03	3.7	0.0005	0.03		0.1	0.2	0.4	0.1		0.1	0	0.4
dicembre	9.7	0.4	0.06	0.3	3.6	0.009	1.5	0	0.1	0.2	0.7	0.5	0	0.04	0	0.3



### 3. Indagini batteriologiche

#### 3.1. Conte batteriche totali

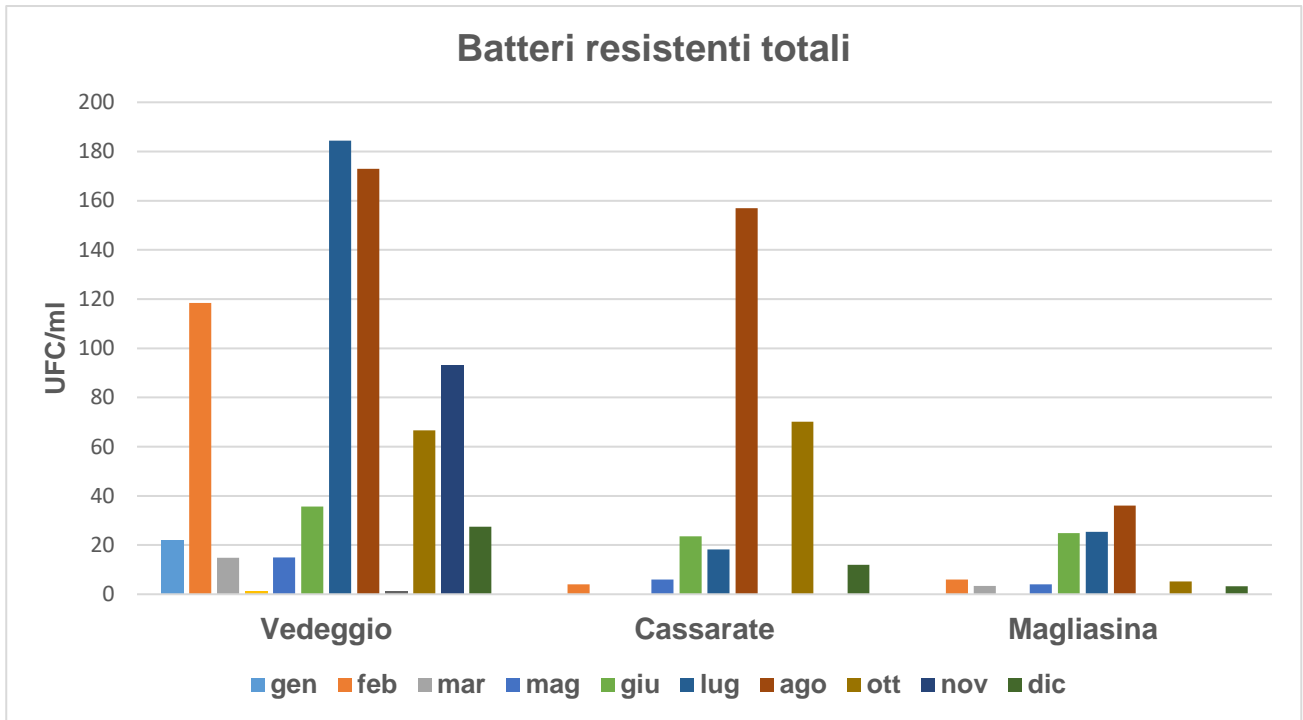
Il numero totale di batteri nei tre fiumi immissari (Tabella 2) fluttua dalle 71 UFC/ml (Magliasina in gennaio) alle 3000 UFC/ml (Vedeggio in settembre). Si nota un aumento del numero di colonie nei mesi più caldi, da giugno a ottobre, e in aprile a seguito di un evento di pioggia intenso. Anche con questa analisi sono evidenti le differenze tra i tre fiumi immissari: il Vedeggio presenta un numero di batteri superiore (media annuale 1446 UFC/ml) rispetto a Cassarate e Magliasina (media annuale circa 728 UFC/ml e 621 UFC/ml rispettivamente).

**Tabella 2:** Conte totali mensili dei batteri presenti nei campionamenti dei tre fiumi immissari, espresse in unità formanti colonie per ml (UFC/ml).

	<b>Vedeggio</b>	<b>Cassarate</b>	<b>Magliasina</b>
gennaio	1123	83	71
febbraio	1227	777	122
marzo	1030	373	367
aprile	1833	1417	1360
maggio	983	587	480
giugno	1067	507	717
luglio	1050	460	390
agosto	1613	1327	767
settembre	3000	1615	1803
ottobre	1043	1360	1190
novembre	2413	116	98
dicembre	970	121	94

#### 3.2. 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). In linea con le conte batteriche totali, il maggior numero di batteri resistenti è stato rilevato nel Vedeggio, per quanto riguarda i fiumi (Figura 3). L'andamento stagionale si sovrappone a quanto osservato per le cariche batteriche totali.



**Figura 3:** 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 aprile e settembre per tutti e tre i fiumi sono stati omessi perché influenzati fortemente dalle abbondanti piogge.

Dall'identificazione delle colonie dei batteri multi-resistenti è emerso che quelli più frequenti appartengono ai generi *Stenotrophomonas*, *Acinetobacter*, *Aeromonas* e alla famiglia delle Flavobacteriacee e delle Enterobacteriacee ambientali. Nel fiume Veduggio sono stati trovati frequentemente anche *Escherichia coli*, *Enterococcus faecium* e *Comamonas sp.* (Tabella 3).

**Tabella 3:** Distribuzione delle colonie di batteri multi-resistenti totali e degli isolati identificati nei campionamenti dei fiumi.

	Veduggio	Cassarate	Magliasina
<b>NUMERO TOTALE DI COLONIE DI BATTERI MULTI-RESISTENTI</b>	<b>267</b>	<b>145</b>	<b>92</b>
<i>Stenotrophomonas sp</i>	69	61	32
<i>Acinetobacter sp</i>	32	55	29
<i>Flavobacteriaceae</i>	84	8	9
<i>Aeromonas sp</i>	20	6	5
<i>Escherichia coli</i>	12	0	0
Enterococchi	13	1	0
<i>Citrobacter freundii</i>	4	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	2	0	0
Enterobacteriaceae ambientali	12	13	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	0	0
<i>Pseudomonas</i>	4	1	1
<i>Comamonas</i>	14	0	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. La Tabella A2 in allegato riassume 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 *sullI* che conferisce resistenza ai sulfamidici e del gene *tetA* che conferisce resistenza alla tetraciclina. Ambedue i geni sono frequentemente riscontrati nei ceppi ambientali di *Acinetobacter* (Fresia et al. 2018; Zhang, Zhang, and Fang 2009). Nelle colture di *Stenotrophomonas* isolate da Veduggio e Cassarate è stato possibile trovare il gene *qnrS* che conferisce resistenza ai fluorochinoloni. Questo risultato è interessante poiché questo gene è stato trovato solo recentemente in ceppi ambientali di *Stenotrophomonas* (Furlan et al. 2019), benché questo genere sia molto diffuso nell'ambiente e come gli *Acinetobacter* presenti vari meccanismi che conferiscono resistenza intrinseca o acquisita agli antibiotici quali pompe a efflusso, enzimi inattivanti e alterazioni della membrana esterna. 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 quali sono stati trovati i geni *qnrS*, *tetA* e *intl* negli isolati dal Veduggio, *sullI* e *tetA* negli *Aeromonas* del Cassarate e *qnrS* nella Magliasina. 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 quasi tutti i geni di resistenza ricercati compreso il gene *intl*

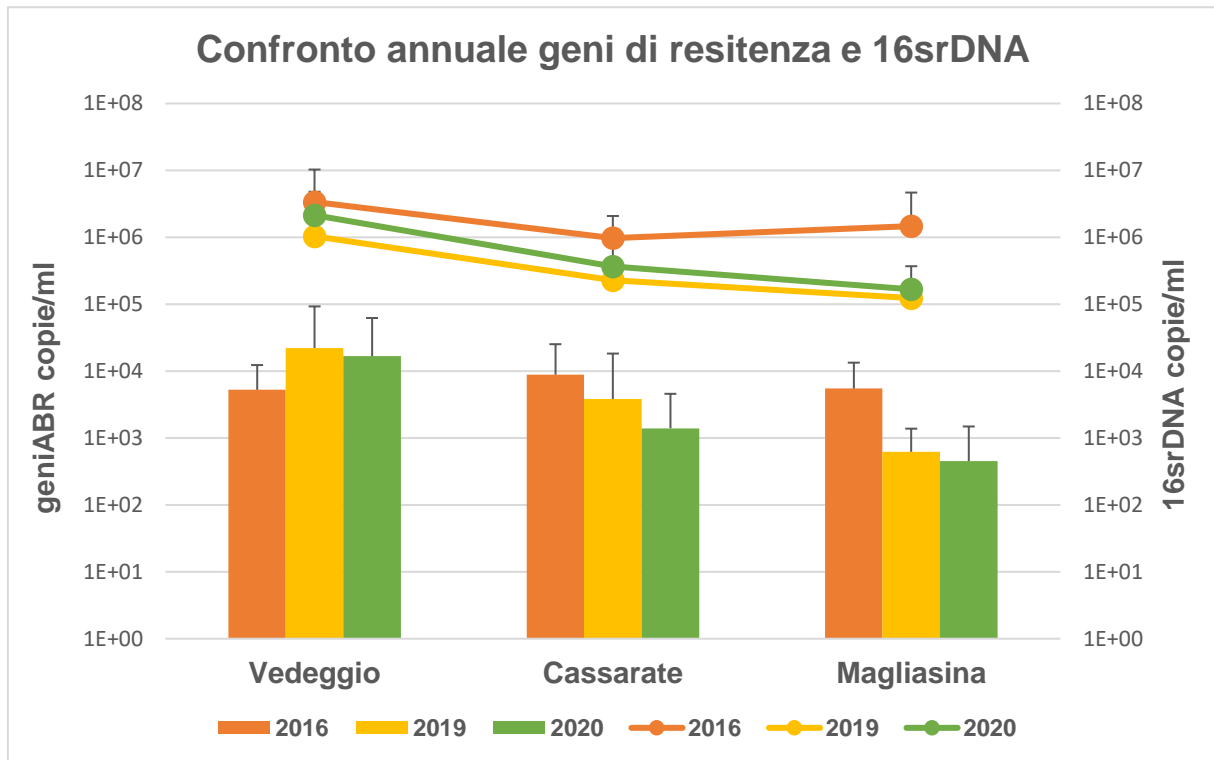


confermando ulteriormente l'impatto dell'impianto di depurazione delle acque su questo corso d'acqua. Il gene di resistenza *bla*<sub>CTX-M</sub>, il più diffuso tra le *Enterobacteriaceae* cliniche che mostrano un profilo di resistenza a largo spettro ai beta-lattamici (Ramadan et al. 2019) è stato identificato oltre che negli *E. coli* anche in un ceppo di *Enterobacter cloacae* del Vedeggio. Sempre dal Vedeggio, seppur un'unica volta, è stata isolata una *Klebsiella pneumoniae* resistente a sulfamidici e tetracicline e contenente il gene per l'integrasi. Oltre a contribuire alla diffusione delle resistenze in clinica, *Klebsiella pneumoniae* ha un ruolo chiave nello scambio di geni di resistenza dall'ambiente naturale a quello ospedaliero (Wyres and Holt 2018).

#### **4. Confronto dei risultati delle analisi quantitative nei fiumi (2016, 2019 e 2020)**

##### **4.1. Quantificazione e tendenza annuale della quantità assoluta e relativa dei determinanti genici di resistenza**

Il confronto dei risultati dell'abbondanza negli anni 2016, 2019 e 2020 del gene 16S rDNA (Figura 4), evidenzia una riduzione di circa un fattore 10 della quantità assoluta della popolazione batterica totale (da circa  $1 \cdot 10^6$  a  $2 \cdot 10^5$  copie/ml) nei fiumi Cassarate e Magliasina e una pressoché stabilità (da  $3 \cdot 10^6$  a  $2 \cdot 10^6$  copie/ml) nel Vedeggio. Anche l'abbondanza assoluta media dei geni di resistenza in Cassarate e Magliasina diminuisce (Cassarate  $9 \cdot 10^3$  copie/ml nel 2016,  $4 \cdot 10^3$  copie/ml nel 2019 e  $1.4 \cdot 10^3$  copie/ml nel 2020; Magliasina  $5 \cdot 10^3$  copie/ml nel 2016,  $6 \cdot 10^2$  copie/ml nel 2019 e  $4.5 \cdot 10^2$  copie/ml nel 2020) mentre si assiste ad un aumento di questo valore nel fiume Vedeggio ( $5 \cdot 10^3$  copie/ml nel 2016,  $2 \cdot 10^4$  copie/ml nel 2019 e nel 2020).



**Figura 4.** Confronto tra le medie annuali del 2016, 2019 e 2020 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 campione d'acqua su scala logaritmica. Le barre rappresentano l'errore standard dei replicati della qPCR. Le linee mostrano le medie annue del gene *16S rDNA* mentre le barre colorate raffigurano le medie annue della abbondanza assoluta dei geni di resistenza.

L'andamento annuale (2016-2019-2020) dell'antibiotico resistenza è stato calcolato con il metodo di Mann-Kendall per il calcolo della significatività statistica della tendenza, usato per determinare se una serie temporale ha una tendenza verso l'aumento o la diminuzione. Il metodo non richiede che i dati siano normalmente distribuiti o lineari (Hamed 2008), ma che non ci sia autocorrelazione. L'ipotesi nulla per questo test è che non ci sia una tendenza, e l'ipotesi alternativa è che ci sia una tendenza al rialzo o al ribasso (Xile and Changhe 2012; Hipel, Mcleod, and Weller 1989).

Le tabelle 4 e 5 mostrano l'andamento della quantità assoluta e relativa dei geni di resistenza e del gene *int1* calcolati sulle medie annuali nei tre fiumi. La significatività è data sia dal valore tau di Kendall che indica, mediante segno – o +, la tendenza all'aumento o alla diminuzione, che dal p-value. Dall'analisi statistica si nota una maggiore significatività quando si analizzano i dati in termini di quantità assoluta dei geni piuttosto che relativa alla popolazione batterica totale, probabilmente perché il confronto con il totale della popolazione batterica rappresenta una sorta di normalizzazione.

**Tabella 4:** Andamento annuale della quantità assoluta dei determinanti genici di resistenza nei tre fiumi.  $p < .05$  abbastanza significativo\*,  $p < .01$  molto significativo\*\*,  $p < .001$  altamente significativo\*\*\*.

	<b>Geni ABR: quantità assoluta</b>		
	<b>Kendall's Tau</b>	<b>p-value</b>	<b>Trend</b>
<b>Vedeggio</b>	0.24*	0.02	positivo
<b>Cassarate</b>	-0.35**	0.002	negativo
<b>Magliasina</b>	-0.43***	< .001	negativo

**Tabella 5:** Andamento annuale della quantità dei determinanti genici di resistenza relativa al totale della popolazione batterica nei tre fiumi  $p < .05$  abbastanza significativo\*,  $p < .01$  molto significativo\*\*,  $p < .001$  altamente significativo\*\*\*.

	<b>Geni ABR: quantità relativa</b>		
	<b>Kendall's Tau</b>	<b>p-value</b>	<b>Trend</b>
<b>Vedeggio</b>	0.13	0.14	nessuno
<b>Cassarate</b>	-0.21*	0.04	negativo
<b>Magliasina</b>	-0.23*	0.03	negativo

## 5. Conclusioni

I tre fiumi, Veduggio, Cassarate e Magliasina, immissari del Lago di Lugano indagati in questo studio, si confermano serbatoi ambientali di geni di resistenza e di batteri resistenti agli antibiotici. I dati ottenuti avvalorano lo stretto nesso tra resistenza agli antibiotici e carico inquinante di origine umana nell'ambiente e il forte impatto dell'impianto 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 Veduggio, 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 Veduggio subisce l'impatto negativo dello scarico dell'impianto di depurazione delle acque di Bioggio. In questo fiume si può stimare che una cellula batterica ogni 100 possiede almeno 1 gene di resistenza. Considerando il dato quantitativo assoluto annuale medio di cellule per millilitro di campione che è di circa  $2 \cdot 10^6$ , il carico di batteri con almeno un gene di resistenza nel fiume corrisponde a circa 20'000 cellule al ml. In riferimento all'abbondanza relativa del gene *intl*, che codifica per l'integrasi degli integroni clinici di classe 1 e che è un indicatore (proxy) di inquinamento di origine antropica (Gillings et al. 2015), si osserva che questo gene è mediamente presente in circa 2.3 cellule ogni 100 (40'000 batteri/ml) nel Veduggio, nello 0.4% delle cellule del Cassarate (8'000 batteri/ml) e in 4 batteri ogni 1'000 nel Magliasina (8'000 batteri/ml). Appare quindi evidente come i risultati del Veduggio 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. 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.

Il confronto dei dati sulla diffusione dei determinanti di resistenza agli antibiotici delle tre campagne CIP AIS del 2016, del 2019 e del 2020 indica una riduzione delle resistenze nella Magliasina, il continuo miglioramento del Cassarate in seguito alla chiusura dell'impianto e una leggera tendenza all'aumento nel fiume Veduggio, confermando ancora una volta l'impatto sulla qualità delle acque degli impianti di depurazione. L'andamento della resistenza nel corso dei tre anni risulta essere più significativo prendendo in considerazione la quantità assoluta dei determinati genici di resistenza. Questo dato conferma che, per provare a stabilire il rischio di trasmissione della resistenza in ambiente, non è sufficiente avere solo valori di abbondanza relativa o prevalenza ma è necessario considerare l'abbondanza assoluta. Infatti le cellule batteriche spesso si presentano in aggregati dove possono raggiungere dosi clinicamente rilevanti, anche se la loro abbondanza media in una

data fonte è apparentemente bassa (Manaia 2017). I geni *sul* e *tet*, specialmente abbondanti nel Cassarate e Magliasina, 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; Castrignanò et al. 2020). 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 0.02 copie/1000 copie di 16S rDNA, corrispondente a circa 20 batteri positivi per il gene per ogni ml di acqua campionata. *bla<sub>CTX-M</sub>*, il gene 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* e negli *Enterobacter cloacae* isolati dal Vedeggio. *bla<sub>CTX-M</sub>*, codifica per delle  $\beta$ -lattamasi ad ampio spettro (ESBL) e si è diffuso rapidamente dai ceppi clinici all'ambiente (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, González-Alba, and Galán 2012). 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; S.-Y. 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; J. Lu et al. 2020). 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; "Reflection Paper on Antimicrobial Resistance in the Environment : Considerations for Current and Future Risk Assessment of Veterinary Medicinal Products Reflection Paper on Antimicrobial Resistance in the Environment : Considerations for Current and Future" 2021). 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.

## 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, 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, José María González-Alba, and Juan Carlos Galán. 2012. "CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion." *Frontiers in Microbiology* 3 (APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>.
- 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>.
- Castrignanò, Erika, Andrew M. Kannan, Kathryn Proctor, Bruce Petrie, Sarah Hodgen, Edward J. Feil, Simon E. Lewis, et al. 2020. "(Fluoro)Quinolones and Quinolone Resistance Genes in the Aquatic Environment: A River Catchment Perspective." *Water Research* 182: 116015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116015>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- Fresia, Pablo, Verónica Antelo, Cecilia Salazar, Matías Giménez, Bruno D’Alessandro, Ebrahim Afshinnkoo, Christopher Mason, Gastón Gonnet, and Gregorio Iraola. 2018. “City-Wide Metagenomics Uncover Antibiotic Resistance Reservoirs in Urban Beach and Sewage Waters.” *Urban Metagenomics Uncover Antibiotic Resistance Reservoirs in Coastal Beach and Sewage Waters*, 456517. <https://doi.org/10.1101/456517>.
- Furlan, João Pedro Rueda, Danilo Garcia Sanchez, Inara Fernanda Lage Gallo, and Eliana Guedes Stehling. 2019. “Characterization of Acquired Antimicrobial Resistance Genes in Environmental *Stenotrophomonas Maltophilia* Isolates from Brazil.” *Microbial Drug Resistance* 25 (4): 475–79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0216>.
- 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>.
- Hamed, Khaled H. 2008. “Trend Detection in Hydrologic Data: The Mann-Kendall Trend Test under the Scaling Hypothesis.” *Journal of Hydrology* 349 (3–4): 350–63. <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2007.11.009>.
- Hipel, Keith W, A Jan Mcleod, and Roland R Weller. 1989. “DATA ANALYSIS OF WATER QUALITY TIME SERIES IN LAKE ERIE ’ as Being ‘ Greater than .’ For Instance , Concentration Values Less than the Limits of Detection . As a Further Major Com- Ment Study , Usually a Wide Variety of Statistical Tests Are the Statistic” 24 (3).
- Huijbers, Patricia M.C., Carl Fredrik Flach, and D. G. Joakim Larsson. 2019. “A Conceptual Framework for the Environmental Surveillance of Antibiotics and Antibiotic Resistance.” *Environment International* 130 (May): 104880. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.05.074>.
- 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, Jian, Yuxuan Zhang, Jun Wu, Jianhua Wang, and Ying Cai. 2020. “Fate of Antibiotic Resistance Genes in Reclaimed Water Reuse System with Integrated Membrane Process.” *Journal of Hazardous Materials* 382 (March 2019): 121025. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121025>.



- 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>.
- Maravić, Ana, Mirjana Skočibusic, Zeljana Fredotović, Svjetlana Cvjetan, Ivica Šamanić, and Jasna Puizina. 2014. "Characterization of Environmental CTX-M-15-Producing *Stenotrophomonas Maltophilia*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58 (10): 6333–34. <https://doi.org/10.1128/AAC.03601-14>.
- Maravić, Ana, Mirjana Skočibušić, Ivica Šamanić, Željana Fredotović, Svjetlana Cvjetan, Marinka Jutronić, and Jasna Puizina. 2013. "Aeromonas Spp. Simultaneously Harboring BlaCTX-M-15, BlaSHV-12, BlaPER-1 and BlaFOX-2, in Wild-Growing Mediterranean Mussel (*Mytilus Galloprovincialis*) from Adriatic Sea, Croatia." *International Journal of Food Microbiology* 166 (2): 301–8. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.010>.
- Martins, Andreza Francisco, and Peter Rabinowitz. 2020. "The Impact of Antimicrobial Resistance in the Environment on Public Health." *Future Microbiology* 15 (9): 699–702.
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- 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>.

“Reflection Paper on Antimicrobial Resistance in the Environment : Considerations for Current and Future Risk Assessment of Veterinary Medicinal Products Reflection Paper on Antimicrobial Resistance in the Environment : Considerations for Current and Futur.” 2021. *European Medicine Agency*.

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>.

WHO. 2020. “Antibiotic Resistance Key Facts\_2020.” 2020.

Wyres, Kelly L., and Kathryn E. Holt. 2018. “*Klebsiella Pneumoniae* as a Key Trafficker of Drug Resistance Genes from Environmental to Clinically Important Bacteria.” *Current Opinion in Microbiology* 45: 131–39. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2018.04.004>.

Xile, Du, and Lu Changhe. 2012. “Evaluation and Trend Analysis of Surface Water Quality in Zhengzhou in 1998–2008.” *Chinese Journal of Population Resources and Environment* 10 (4): 44–51. <https://doi.org/10.1080/10042857.2012.10685108>.

Zeynudin, Ahmed, Michael Pritsch, Sören Schubert, Maxim Messerer, Gabriele Liegl, Michael Hoelscher, Tefara Belachew, and Andreas Wieser. 2018. “Prevalence and Antibiotic Susceptibility Pattern of CTX-M Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases among Clinical Isolates of Gram-Negative Bacilli in Jimma, Ethiopia.” *BMC Infectious Diseases* 18 (1): 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3436-7>.

Zhang, Xu Xiang, Tong Zhang, and Herbert H.P. Fang. 2009. “Antibiotic Resistance Genes in Water Environment.” *Applied Microbiology and Biotechnology* 82 (3): 397–414. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1829-z>.

## Allegati

**Tabella A1.** 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; < LOQ: al di sotto del limite di quantificazione (vedi valori in Tabella M2).

	Veduggio							Cassarate							Magliasina				
	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	ctxm	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	16S	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl
<b>gennaio</b>	2.27E+06	9.11E+04	4.09E+03	1.11E+03	1.82E+03	1.16E+04	< LOQ	7.52E+04	5.54E+01	2.44E+02	4.31E+01	5.54E+01	1.34E+02	4.61E+04	< LOQ	< LOQ	1.92E+01	2.00E+01	5.10E+01
<b>febbraio</b>	3.82E+06	2.54E+04	5.59E+03	8.90E+02	1.29E+03	2.83E+04	3.05E+01	2.82E+05	1.16E+01	neg	2.82E+01	2.81E+01	1.96E+02	1.68E+05	< LOQ	neg	2.45E+01	neg	2.24E+02
<b>marzo</b>	6.33E+05	4.87E+03	4.07E+02	2.67E+02	1.74E+02	7.53E+03	< LOQ	2.73E+05	2.91E+01	2.94E+01	1.86E+02	2.89E+01	7.05E+02	1.24E+05	5.89E+01	2.01E+01	4.99E+01	5.22E+01	1.65E+02
<b>aprile</b>	5.44E+05	1.07E+05	6.11E+03	7.78E+03	9.64E+03	2.96E+04	< LOQ	3.03E+05	3.49E+02	8.56E+02	2.69E+03	5.87E+03	2.03E+03	2.59E+05	2.51E+02	8.59E+01	1.10E+03	5.91E+02	1.36E+03
<b>maggio</b>	1.92E+05	3.07E+03	1.29E+03	2.21E+03	1.10E+03	3.91E+03	9.34E+00	7.17E+04	5.91E+01	< LOQ	3.91E+02	2.30E+02	2.91E+02	4.33E+04	2.93E+01	< LOQ	1.16E+02	5.96E+01	1.12E+02
<b>giugno</b>	1.98E+05	1.03E+03	3.88E+03	1.73E+02	5.15E+02	5.11E+03	< LOQ	1.11E+05	2.20E+01	2.69E+03	4.26E+01	2.03E+03	2.07E+02	1.19E+05	2.98E+01	1.95E+01	7.12E+01	1.23E+01	5.16E+02
<b>luglio</b>	3.11E+06	5.67E+03	1.98E+03	8.92E+02	2.35E+02	1.25E+04	< LOQ	2.20E+05	1.21E+02	3.91E+02	6.70E+01	2.91E+02	9.15E+02	7.76E+04	6.73E+01	4.43E+01	1.84E+01	2.71E+01	6.48E+02
<b>agosto</b>	8.91E+05	4.14E+03	1.67E+04	2.94E+03	2.91E+03	3.09E+04	4.76E+01	4.59E+05	1.03E+03	2.23E+04	4.83E+02	1.84E+03	4.46E+03	9.36E+04	5.96E+01	5.06E+01	4.85E+01	3.11E+01	9.08E+02
<b>settembre</b>	3.24E+06	9.06E+03	2.27E+04	6.42E+03	1.15E+04	9.15E+04	3.03E+01	1.19E+06	1.79E+03	3.86E+02	8.72E+02	5.42E+03	6.61E+03	7.59E+05	1.61E+03	1.92E+03	1.11E+03	2.56E+03	7.22E+03
<b>ottobre</b>	9.39E+05	2.04E+03	7.44E+02	2.70E+02	2.07E+02	1.55E+04	< LOQ	1.31E+06	1.05E+03	5.40E+02	4.53E+02	5.52E+03	2.10E+03	2.58E+05	3.82E+01	< LOQ	6.84E+01	2.16E+01	1.82E+02
<b>novembre</b>	9.48E+06	8.30E+04	5.71E+03	1.12E+03	2.65E+03	3.49E+05	4.61E+01	5.12E+04	1.40E+01	neg	3.63E+01	8.25E+01	2.14E+02	1.87E+04	1.76E+01	neg	1.33E+01	< LOQ	7.22E+01
<b>dicembre</b>	3.85E+05	3.76E+04	1.48E+03	2.26E+02	9.77E+02	1.40E+04	3.45E+01	7.13E+04	1.09E+03	< LOQ	3.74E+01	1.30E+02	4.75E+02	3.88E+04	1.97E+02	< LOQ	1.47E+01	< LOQ	1.15E+02

**Tabella A2:** Distribuzione dei determinanti di resistenza negli isolati identificati nei campionamenti di fiumi.

	Veduggio						Cassarate						Magliasina					
	blaCt <sub>xm</sub>	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	blaCt <sub>xm</sub>	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl	blaCt <sub>xm</sub>	sullI	qnrS	tetA	ermB	intl
<i>Stenotrophomonas sp</i>	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acinetobacter sp</i>	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Flavobacteriaceae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Aeromonas sp</i>	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	+	-	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Enterococci	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	/	/	/	/	/	/	/
<i>Citrobacter freundii</i>	-	-	+	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Enterobacteriaceae ambientali	-	+	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Pseudomonas</i>	-	-	-	-	-	-	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>Comamonas</i>	-	-	-	-	-	+	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

## Appendice I Approfondimenti metodologici

**Capitolo 2.** La Tabella M1 riassume i geni indagati durante il 2020 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 M1:** 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.

<i>Classe antibiotico</i>	<i>Gene indagato</i>	<i>Meccanismo di resistenza e localizzazione</i>	<i>Localizzazione</i>
<b><i>β-lattamici</i></b>	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>	Codifica per enzimi detti β-lattamasi che inattivano l'antibiotico.	Plasmidio
<b><i>Fluorochinoloni</i></b>	<i>qnrS</i>	Codifica per una forma mutata della proteina bersaglio che non viene riconosciuta dall'antibiotico.	Plasmidio
<b><i>Sulfamidici</i></b>	<i>sulI</i>	Codifica per una forma alternativa della proteina bersaglio che non viene riconosciuta dall'antibiotico.	Plasmidio
<b><i>Tetracicline</i></b>	<i>tetA</i>	Codifica per una pompa a efflusso che elimina l'antibiotico dalla cellula.	Plasmidio
<b><i>Macrolidi</i></b>	<i>ermB</i>	Codifica per una metilasi che modifica la proteina bersaglio rendendola irriconoscibile 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 2019 (Solcà *et al.* 2020). Il DNA dei controlli positivi di ogni gene (standard) è stato purificato e quantificato per creare la curva di calibrazione (De Cesare *et al.* 2016). 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.* 2014. Nella Tabella M2 sono riportati i valori di LOQ (copie/ml) per i geni considerati in questo studio.

**Tabella M2:** Limite di quantificazione dei geni presi in considerazione in questo studio; i valori sono espressi in copie/ml. Sono indicati anche la percentuale di efficienza della qPCR e il valore di R<sup>2</sup> ricavati dalla retta standard.

<i>Standard</i>	Efficienza (%)	R <sup>2</sup>	LOQ (copie/ml)
<i>16SrRNA</i>	80.29	0.99	53
<i>sullI</i>	89.82	0.99	23
<i>qnrS</i>	119.50	0.98	60
<i>blaCTXM</i>	103.40	0.97	52
<i>ermB</i>	98.42	0.99	43
<i>tetA</i>	91.79	0.98	33

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<sup>TM</sup> 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

**Capitolo 3.** 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 M1), 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.

## Riferimenti bibliografici Appendice I

- Di Cesare, A., Eckert, E. M., D'Urso, S., Bertoni, R., Gillan, D. C., Wattiez, R., & Corno, G. (2016). Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 94, 208–214.  
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.049>
- 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>.
- 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>.
- 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>.
- Nicola Solcà, Federica Mauri, A. D. (2020). Ricerca e monitoraggio di determinanti genici di resistenza agli antibiotici nella acque del cesesio e di alcuni immissari. Campagna 2019.
- 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.