

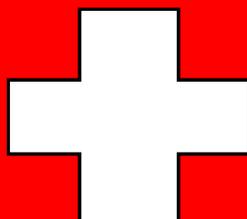
Commissione internazionale
per la protezione delle acque italo-svizzere

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

Programma triennale 2016 - 2018
Campagna 2016

a cura di Nicola Solcà

Bellinzona 2017



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 fiumi immissari**

Programma triennale 2016-2018

Campagna 2016

a cura di Nicola Solcà

Bellinzona 2017

Indice

- 1. Introduzione generale**
- 2. Ricerca e monitoraggio di determinanti genici di resistenza agli antibiotici nelle acque del Lago Ceresio e di alcuni fiumi immissari**
 - 2.1. Resistenza agli antibiotici – aspetti generali e ambiente acquatico**
 - 2.2. Materiali e metodi**
 - 2.2.1. Punti di campionamento e prelievi
 - 2.2.2. Analisi molecolari per l'identificazione e quantificazione dei geni di resistenza
 - 2.3. Risultati e discussione**
 - 2.3.1. Valutazione della presenza di determinanti genici di resistenza agli antibiotici
 - 2.3.2. Quantificazione dei geni di resistenza agli antibiotici
 - 2.4. Conclusioni**
- 3. Bibliografia**
- 4. Allegati**

1. Introduzione generale

Nicola Solcà

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

Lo sviluppo di resistenze agli antibiotici, compresi quelli sintetici o semisintetici, utilizzati per esempio in ambito medico, ospedaliero o veterinario, è oggetto di preoccupazione in quanto mette a repentaglio l'efficacia dei farmaci sviluppati per tutelare la salute umana ed animale. È ampiamente riconosciuto come la presenza di batteri resistenti agli antibiotici sia più alta nei luoghi di maggiore utilizzo, come gli ospedali o le attività di allevamento agricolo intensivo. Attraverso le acque, batteri resistenti, residui di antibiotici e altre sostanze possono contaminare l'ambiente, sia direttamente che indirettamente, attraverso gli impianti di depurazione delle acque (IDA). Questi ultimi possono da un lato ridurre sostanzialmente il carico di batteri ma dall'altro anche fungere da ambiente propizio allo sviluppo di resistenze.

I meccanismi grazie ai quali i batteri sviluppano resistenze agli antibiotici sono molteplici ed includono fenomeni già presenti in natura: i microrganismi che producono antibiotici possiedono infatti anche le informazioni genetiche necessarie a proteggerli dall'azione dell'antibiotico prodotto. Queste informazioni genetiche possono essere trasferite anche ad altri microrganismi, permettendone così la diffusione verso batteri eventualmente patogeni per l'uomo o gli animali. Oltre allo sviluppo di resistenze presso i luoghi di maggiore impiego degli antibiotici che esercitano una pressione selettiva sui batteri favorendo quelli resistenti, è stato dimostrato che pure concentrazioni residue di antibiotici nell'ambiente possono stimolare l'apparizione di fenomeni di resistenza. Vista la scarsità di dati ambientali, il rafforzamento del monitoraggio in natura rappresenta una misura essenziale per valutare complessivamente la problematica dello sviluppo e della diffusione di geni di resistenza agli antibiotici.

Le conoscenze acquisite nell'ambito delle ricerche CIP AIS sul lago di Lugano e contemplate dal programma esecutivo 2013-2015 sulle sostanze pericolose, in particolare le verifiche sulla presenza di microinquinanti idrosolubili nelle acque dei fiumi immissari (Campagna 2013) e del lago (Campagna 2014), forniscono un quadro complessivo della pressione antropica esercitata dai microinquinanti sulle acque dell'ecosistema del lago Ceresio. In linea con le aspettative, tale pressione è maggiore sui corsi d'acqua a valle degli IDA e tanto maggiore quanto più alta è la popolazione allacciata agli impianti e quanto minore la diluizione delle acque scaricate nei ricettori naturali. Nelle acque del lago, nonostante le concentrazioni generalmente ridotte, si osserva un aumento dei residui lungo l'asse da est verso ovest, in linea con la struttura morfologica del Ceresio e con la pressione esercitata dai fiumi immissari.

L'obiettivo principale del presente studio è di valutare la presenza, la distribuzione e la tipologia di geni di resistenza agli antibiotici nelle popolazioni batteriche delle acque del lago Ceresio e in quelle di alcuni suoi tributari, allo scopo di verificare una possibile correlazione con la presenza di microinquinanti in generale e di antibiotici in particolare. Tali residui rappresentano contemporaneamente un indicatore dell'impiego di antibiotici nei rispettivi comprensori di evacuazione delle acque reflue e una probabile fonte di ulteriore sviluppo di popolamenti batterici resistenti.

Oltre alle autrici del rapporto tecnico, si ringraziano per l'organizzazione e l'esecuzione dei prelievi Giuseppe Ranieri e Antonio Pessina della Sezione per la protezione dell'aria, dell'acqua e del suolo nonché Andreas Bruder dell'Istituto scienze della terra della SUPSI.

2. 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

2.1. Resistenza agli antibiotici – aspetti generali e ambiente acquatico

L'aumento di batteri sempre più resistenti agli antibiotici è diventato un problema diffuso in tutto il mondo. È stato stimato che le infezioni nosocomiali causate da batteri multi-resistenti provocano circa 25.000 morti all'anno in USA e in Europa e 58.000 morti all'anno in India (Chaudhary 2016). La problematica non è relativa solo all'ambiente ospedaliero ma anche all'ambiente naturale, specialmente quello acquatico, che sembra avere un ruolo fondamentale nella diffusione della resistenza agli antibiotici. Da una parte, i batteri non patogeni che vivono naturalmente in ambiente acquatico possono sviluppare resistenza agli antibiotici e fungere da tramite di geni, detti geni di resistenza agli antibiotici (geni ABR), che se trasferiti a batteri patogeni alloctoni (presenti nell'ambiente ma derivanti da altre fonti come per esempio le feci di uomo e animali) conferiscono resistenza. D'altra parte, nell'ambiente acquatico confluiscono gli scarichi degli impianti di depurazione delle acque reflue urbane, ospedaliere e industriali come pure le acque di dilavamento dei terreni agricoli. Nonostante l'efficacia degli impianti di depurazione, una minima parte di microinquinanti, tra cui anche gli antibiotici, i batteri patogeni e i geni di resistenza, possono raggiungere e contaminare le acque di superficie.

Anche se il destino dei batteri resistenti e dei geni di resistenza agli antibiotici negli ambienti acquatici fortemente antropizzati non è del tutto chiaro, la loro presenza potrebbe rappresentare un problema indiretto per la salute umana. Da sempre, infatti, l'acqua è utilizzata dall'uomo per molteplici attività, dall'irrigazione, all'allevamento e per il consumo personale, e attraverso questi svariati usi batteri resistenti e geni di resistenza potrebbero ritornare dall'ambiente all'uomo o agli animali.

Studi precedenti hanno evidenziato, mediante monitoraggio delle acque lacustri, la presenza di batteri antibiotico-resistenti e di geni di resistenza agli antibiotici in 21 laghi della Svizzera interna (Czekalski et al., 2012; Czekalski et al., 2014; Czekalski et al., 2015) e nel Lago Maggiore (Di Cesare et al., 2015; Di Cesare et al., 2016). Prendendo spunto da questi lavori è stato deciso di valutare anche la situazione del Lago Ceresio, per il quale non sono ancora disponibili dati esaustivi.

Il Lago Ceresio (o Lago di Lugano) può essere considerato un ambiente antropizzato. La maggior parte dei suoi fiumi immissari, inoltre, risentono soprattutto nella parte terminale dell'azione dei principali impianti di depurazione delle acque (IDA) della zona. Di riflesso, sono misurabili nelle acque del lago ma soprattutto in alcuni degli immissari, residui di microinquinanti idrosolubili e di antibiotici (CIPAIS 2013; CIPAIS 2014). Con lo scopo di valutare l'impatto antropico in termini di antibiotico resistenza e un'eventuale correlazione con la pressione esercitata dai microinquinanti idrosolubili è stata valutata la presenza, nel Lago Ceresio e in alcuni fiumi immissari, di determinati genici che conferiscono resistenza alle principali classi di antibiotici maggiormente utilizzati in clinica e veterinaria. Sono state scelte le acque di tre fiumi (Laveggio, Vedeggio e Cassarate) a valle dei rispettivi impianti di depurazione e quelle di un fiume (Magliasina) che, pur trovandosi in

una zona antropizzata, non è influenzato direttamente dalla presenza di un IDA. Per quanto riguarda il lago si è scelto di analizzare tre tipologie di acque pelagiche (Gandria, Melide e Ponte Tresa), lontano dalla costa, e due tipologie di acque litorali (Lugano, Riva San Vitale) situate nei pressi di un impianto di captazione (in attività o previsto) per l'acqua potabile.

2.2. Materiali e metodi

2.2.1. Punti di campionamento e prelievi

Il monitoraggio delle acque è iniziato a gennaio 2016 e si è concluso in dicembre 2016. La Figura 1 illustra i diversi punti di campionamento considerati nella presente indagine. Con l'eccezione dei due punti di prelievo delle acque litorali presso Lugano e Riva San Vitale, tutti i luoghi sono già stati considerati anche nelle precedenti ricerche CIP AIS per la quantificazione di microinquinanti idrosolubili (CIP AIS 2013; CIP AIS 2014).

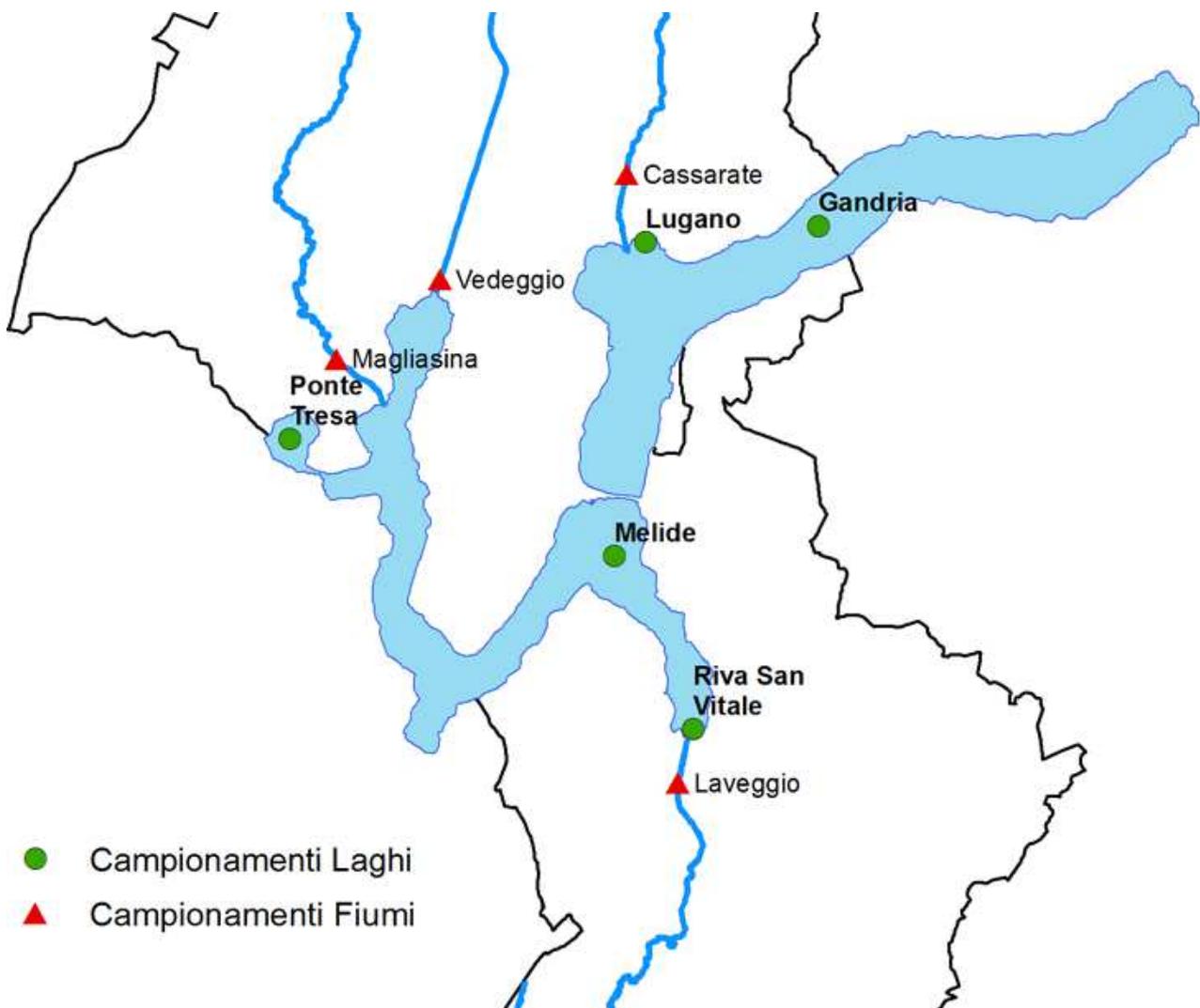


Figura 1: Illustrazione del lago di Lugano e dei quattro immissari considerati nel presente studio. Sono indicati i luoghi di prelievo delle acque di lago (cerchi verdi) e delle acque di fiume (triangoli rossi)

I prelievi dai cinque punti del lago sono avvenuti a cadenza stagionale (febbraio, maggio, agosto, novembre) e dai quattro fiumi immissari a cadenza mensile (gennaio-dicembre). 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, Melide 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 paraggi dell'attuale stazione di captazione dell'acqua potabile, rispettivamente 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).

Il prelievo dell'acqua dai quattro fiumi immissari è stato eseguito in superficie ed in corrente piena utilizzando un contenitore di plastica risciacquato più volte. Il campione d'acqua è stato riversato in bottiglie di vetro sterili per il trasporto in laboratorio. I punti di prelievo di Veduggio, Cassarate e Laveggio sono influenzati dalle acque provenienti dagli IDA di Bioggio, Lugano e Mendrisio. Per contro, come già evidenziato, le acque campionate dalla Magliasina non raccolgono gli scarichi di impianti di depurazione di acque comunali o consortili.

2.2.2. Analisi molecolari per l'identificazione e quantificazione dei geni di resistenza

Le analisi molecolari sono state svolte presso il Laboratorio Microbiologia Applicata della SUPSI. Per poter confrontare i risultati, le metodologie e i geni scelti sono gli stessi utilizzati in lavori precedenti, in particolare sul Lago Maggiore (Czekalski et al., 2012; Di Cesare et al., 2015), fatta eccezione per il gene *bla*_{OXA-48} che conferisce resistenza ai beta-lattamici di ultima generazione, scelto poiché negli ultimi anni si è verificato un aumento della diffusione di questo gene sia in ambito ospedaliero che comunitario (Lee et al., 2016; Zurfluh et al., 2015).

Screening qualitativo

Sui campioni d'acqua è stato eseguito uno screening qualitativo (presenza/assenza) mediante PCR (Polimerase Chain Reaction) di un ampio pool di determinanti molecolari coinvolti nello sviluppo di antibiotico resistenza. La Tabella 1 riassume i geni che codificano la resistenza alle diverse classi di antibiotici indagati. Si tratta di 11 geni che danno resistenza a diverse classi di antibiotici, scelte tra quelle maggiormente utilizzate in medicina umana e veterinaria.

Oltre ai geni di resistenza è stata valutata anche la presenza dell'integrone di classe I mediante amplificazione del gene per l'integrasi *intl*. Gli integroni di classe 1 sono potenziali marcatori molecolari della presenza di antibiotico resistenze in ambiente. Questi elementi genici sono coinvolti nella diffusione delle resistenze perché sono in grado di integrare dei geni di resistenza sotto forma di cassetta (Deng et al., 2015).

Quantificazione dei geni di resistenza

La quantificazione dei geni di resistenza agli antibiotici è stata effettuata mediante PCR quantitativa su tutti i campioni di DNA risultati positivi allo screening qualitativo. Il DNA dei controlli positivi di ogni gene è stato purificato e quantificato per la produzione degli standard utilizzati per definire il limite di identificazione (Di Cesare et al., 2013; Di Cesare et al., 2015). Il limite di identificazione (LOD limit of detection) corrisponde alla minima concentrazione identificata sulla base di analisi di campioni di riferimento. I LOD riferiti a un litro di campione in esame per i geni

16S, *sullI*, *qnrS*, *tetA* e *bla_{TEM}* sono compresi tra 1 e $5.0 \cdot 10^1$ copie / ml. I geni *bla_{SHV}* e *tetM* possono essere quantificati solo con minore sensibilità (LOD compreso tra $1.0 \cdot 10^2$ e $1.0 \cdot 10^4$ copie / ml).

I campioni sono stati analizzati con termociclatore 7500/7500 *Fast Real Time PCR System*, *Applied Biosystems* attraverso marcatura con *Fast SYBRTM Green Master Mix* (*Applied Biosystems*). I risultati sono espressi sia come numero assoluto di copie di ciascun gene per ml di acqua filtrati, sia in rapporto al numero di copie del gene 16S rRNA, utilizzato come indicatore del numero totale di cellule batteriche.

Tabella 1: Classe di antibiotici e relativi geni che conferiscono resistenza analizzati nello studio. Per ogni gene è indicato anche il meccanismo che induce resistenza all'antibiotico.

Classe antibiotico	Geni ABR	Meccanismo di resistenza
β-lattamici	<i>bla TEM</i>	Codificano per enzimi detti β-lattamasi che inattivano l'antibiotico
	<i>bla CTX-M</i>	
	<i>bla SHV</i>	
	<i>bla OXA-48</i>	
Fluorochinoloni	<i>qnr A</i>	Codificano per una forma mutata della proteina bersaglio che non viene riconosciuta dall'antibiotico
	<i>qnr S</i>	
Sulfamidici	<i>sullI</i>	Codificano per una forma alternativa della proteina bersaglio che non viene riconosciuta dall'antibiotico
	<i>sullII</i>	
Tetracicline	<i>tet A</i>	A e B codificano per pompe a efflusso che eliminano l'antibiotico dalla cellula; M altera la proteina bersaglio proteggendola dall'azione dell'antibiotico.
	<i>tet B</i>	
	<i>tet M</i>	

2.3. Risultati e discussione

2.3.1. Valutazione della presenza di determinanti genici di resistenza agli antibiotici

I risultati del monitoraggio del Lago Ceresio e fiumi immissari per il 2016 (Tabella 2 e Tabella 3) evidenziano la presenza di diversi geni di resistenza agli antibiotici, in linea con gli studi eseguiti in precedenza in particolare sul Lago di Ginevra e sulla parte italiana del Lago Maggiore (Czekalski et al., 2012; C.N.R.- I.S.E., 2016). Il gene *sullI*, che conferisce resistenza ai sulfamidici, è il più

diffuso ed è presente sia nei fiumi situati a valle di un impianto di depurazione sia nella Magliasina. In Svizzera i sulfamidici sono antibiotici ancora largamente utilizzati sia per l'uomo che per gli animali e fanno parte delle cinque sostanze indicate dall' Ufficio federale dell'ambiente come indicatori dell'efficacia degli impianti di depurazione (Götz et al., 2010; Abegglen e Siegrist, 2012). Nel corso delle precedenti indagini della CIP AIS sulla presenza di microinquinanti idrosolubili sono state ritrovate quantità significative ($>10 \text{ ng l}^{-1}$) di sulfamidici, in particolare nelle acque dei fiumi campionate a valle degli IDA (CIP AIS 2013). La presenza continua del gene *sulll* sembrerebbe quindi almeno parzialmente correlabile alla presenza dei sulfamidici nelle acque benché questo gene potrebbe anche essere costitutivamente presente nel DNA di batteri ambientali e sia ritenuto molto comune su plasmidi diffusi nei Gram negativi. Queste considerazioni farebbero ipotizzare meccanismi di selezione complementari a quelli influenzati dalla presenza dell'antibiotico (Kehrenberg e Schwarz, 2001) e potrebbero spiegare la presenza del gene *sulll* anche nella Magliasina, dove i sulfamidici si sono sempre rivelati al di sotto del limite di quantificazione (CIP AIS 2013).

Gli altri geni più diffusi nei fiumi sono *qnrS* e *tetA-M*, che conferiscono resistenza rispettivamente ai fluorochinoloni e alle tetracicline, antibiotici ampiamente usati sia in clinica che in veterinaria (www.swissmedic.ch). La presenza di questi geni ABR non risulta stagionale ed è possibile notare una grande diversità tra le due tipologie di fiumi (Tabelle 2 e 3): nella Magliasina i geni *qnrS* e *tetA-M* sono meno frequenti rispetto agli altri fiumi, influenzati dagli impianti di depurazione. Purtroppo non sono disponibili dei dati relativi alle concentrazioni di fluorochinoloni e tetracicline nelle acque. Tuttavia, analogamente ad altri microinquinanti, è lecito supporre anche per queste categorie di antibiotici un impatto antropico rilevante degli IDA consortili e/o un loro relativo ruolo nella selezione di questi geni di resistenza. Meno frequenti ma comunque rilevabili sporadicamente sono i geni *bla* ($_{\text{TEM}}$ e $_{\text{SHV}}$) che codificano per delle β -lattamasi (Tabelle 2 e 3): la presenza di tali geni è strettamente legata all'utilizzo degli antibiotici in clinica ed è importante monitorarne la diffusione, in quanto conferiscono resistenza anche ad antibiotici β -lattamici di ultima generazione. Anche in questo caso si nota una differenza tra le acque dei fiumi sui quali grava un IDA (Tabella 2) e la Magliasina, dove il gene *bla* $_{\text{TEM}}$ è stato ritrovato una sola volta durante il mese di luglio (Tabella 3).

Nelle acque pelagiche di Gandria e Melide e nel punto di prelievo a Riva San Vitale non sono stati trovati geni ABR, al contrario dei punti di Lugano e Ponte Tresa dove sono stati rinvenuti rispettivamente i geni *sulll* e *bla* $_{\text{TEM}}$ e il gene *qnrS*, pure se in un unico campionamento (Tabella 4). La rilevazione sporadica di geni ABR nel lago può essere ricondotta alla maggiore quantità di acqua e alla maggiore distanza dagli scarichi, favorendo una diluizione molto superiore delle acque. La presenza di un gene *bla* che conferisce resistenza ai β -lattami nei pressi della captazione dell'acqua potabile dell'impianto di Lugano è un risultato che richiederebbe ulteriori indagini, volte in particolare a verificare la possibile trasmissione e il destino attraverso l'impianto di potabilizzazione e la rete di distribuzione urbana delle acque. Il numero esiguo di prelievi non consente di individuare eventuali differenze significative tra le acque litorali e le acque pelagiche. Sempre per lo stesso motivo è difficile trarre conclusioni generali su eventuali differenze relative alla qualità delle acque pelagiche, anche se è possibile notare come l'unico gene ABR identificato in queste acque deriva da un campione prelevato a Ponte Tresa, dove le concentrazioni di microinquinanti sono maggiori (CIP AIS 2014).

Tabella 3: Presenza (rosso) o assenza (bianco) di geni ABR nel fiume Magliasina, le cui acque non sono influenzate da un impianto di depurazione.

Antibiotico		gene ABR	gen	feb	mar	apr	mag	giu	lug	ago	set	ott	nov	dic
β-lattamici	<i>bla</i> (TEM)													
	<i>bla</i> (SHV)													
	<i>bla</i> (CTX-M)													
	<i>bla</i> (oxa 48)													
Fluorochinoloni	<i>qnrA</i>													
	<i>qnrS</i>													
Tetracicline	<i>tetA</i>													
	<i>tetM</i>													
	<i>tetB</i>													
Sulfamidici	<i>sullI</i>													
	<i>sullII</i>													
Integrone classe 1	<i>intl</i>													

Tabella 4: Presenza (rosso) o assenza (bianco) di geni ABR nei cinque punti del Lago Ceresio. Sono riportati i risultati solo per i geni positivi almeno una volta. I risultati completi, inclusi i ritrovamenti negativi, sono disponibili nell'allegato (Tabella 6).

	Antibiotici	gene Abr	Feb	Mag	Ago	Nov
Gandria 0-20mt	Integrone	<i>intl</i>				

	Antibiotici	gene Abr	Feb	Mag	Ago	Nov
Melide 0-20mt	Integrone	<i>intl</i>				

	Antibiotici	gene Abr	Feb	Mag	Ago	Nov
Ponte Tresa 0-20mt	Fluorochinoloni	<i>qnrS</i>				
	Integrone	<i>intl</i>				

	Antibiotici	gene Abr	Feb	Mag	Ago	Nov
Lugano 40mt	β-lattamici	<i>bla</i> (TEM)				
	Sulfamidici	<i>sullI</i>				
	Integrone	<i>intl</i>				

	Antibiotici	gene Abr	Feb	Mag	Ago	Nov
Riva San vitale 33mt	Integrone	<i>intl</i>				

2.3.2. Quantificazione dei geni di resistenza agli antibiotici

I risultati mostrano che i geni *sullI*, *qnrS* e *tetA*, che sono i più diffusi, risultano anche essere quelli significativamente più abbondanti ($10^4 - 10^2$ copie/ml), sia nei fiumi situati a valle di un impianto di depurazione sia nella Magliasina. In quest'ultimo corso d'acqua i geni citati sono presenti con minore frequenza ma non con minore abbondanza. Mediamente la concentrazione di questi tre geni è di solo 1-3 log inferiore alla concentrazione del gene 16S rRNA (Figure 2 e 3). Il gene *bla*_{TEM} è meno abbondante (10^1 copie/ml) ed è presente in quantità molto inferiore rispetto al totale della popolazione: da 3 a 5 log in meno del 16S (Figura 2). Nella Magliasina questo gene è risultato al di sotto del limite di quantificazione. Anche i geni *tetM* e *bla*_{SHV}, pur essendo presenti nei campioni, sono risultati non quantificabili poiché al di sotto del limite di detezione, che per questi geni è più alto (vedi anche capitolo 2.2.2). I valori numerici dei ritrovamenti sono disponibili in allegato al presente rapporto (Tabella 7).

Non si notano delle rilevanti differenze di concentrazione nei campionamenti in funzione del tempo, anche se si può evidenziare un incremento della quantità del gene *sullI* nei mesi di novembre e dicembre (Figure 2 e 3).

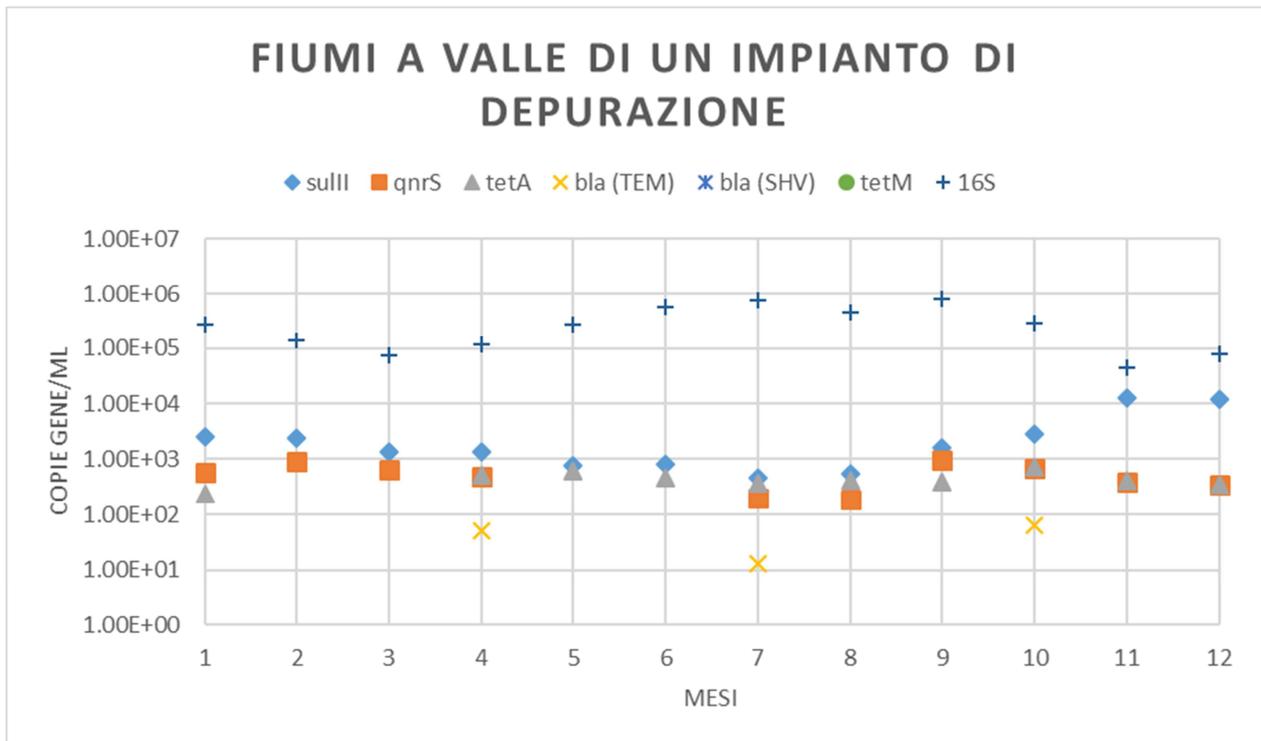


Figura 2: Risultati della quantificazione dei geni ABR (qPCR) espressi in scala logaritmica come copie di geni di resistenza per ml di acqua filtrati. Nel grafico sono riportate le medie dei valori ottenuti dall'analisi quantitativa dei campioni di DNA isolati dai fiumi Cassarate, Veduggio e Laveggio. La concentrazione del gene 16S rRNA è ugualmente espressa come log copie/ml per permettere un confronto immediato. In allegato le tabelle con i valori riferiti ad ogni singolo fiume (Allegato 3)

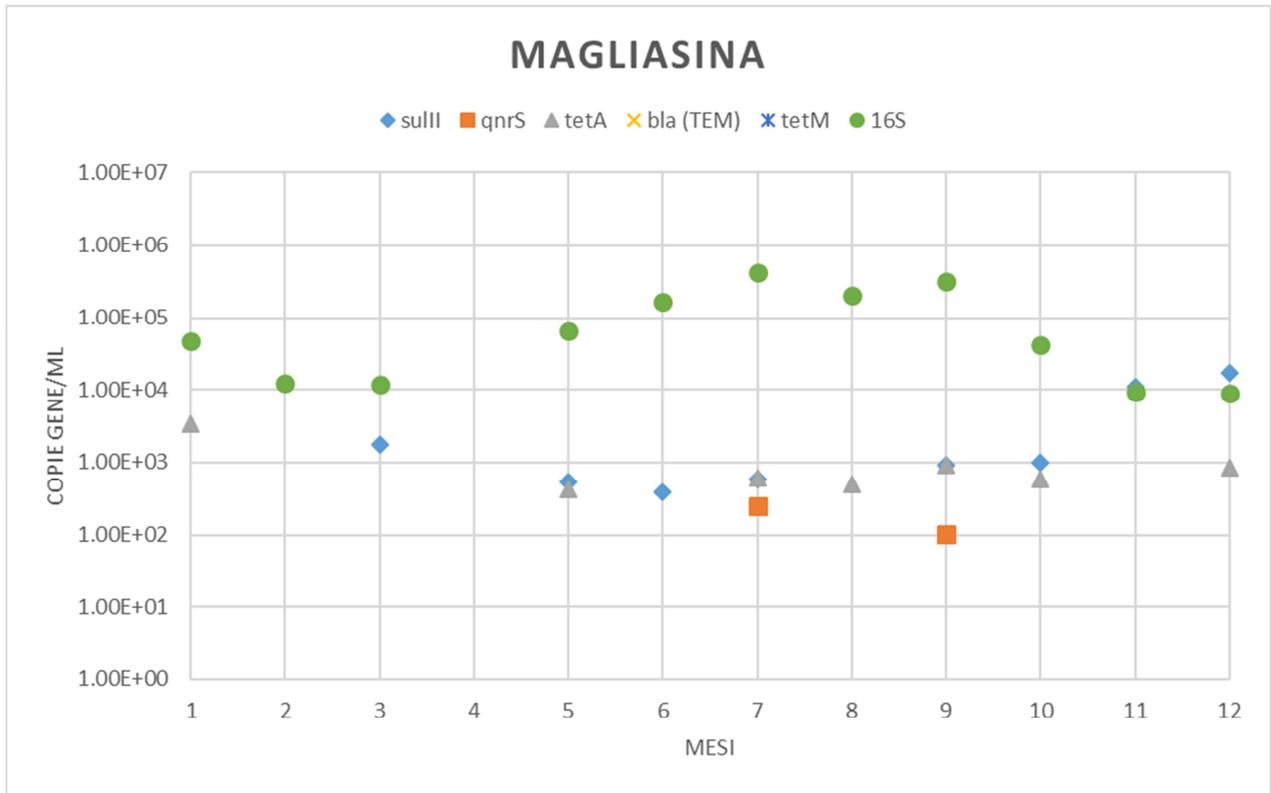


Figura 3: Risultati della quantificazione dei geni ABR (qPCR) espressi in scala logaritmica come copie di geni di resistenza per ml di acqua filtrati presenti nella Magliasina. La concentrazione del gene 16S rRNA è ugualmente espressa come log copie/ml per permettere un confronto immediato. Il dato per il campionamento di aprile (punto 4) è stato omesso a causa di un errore di manipolazione.

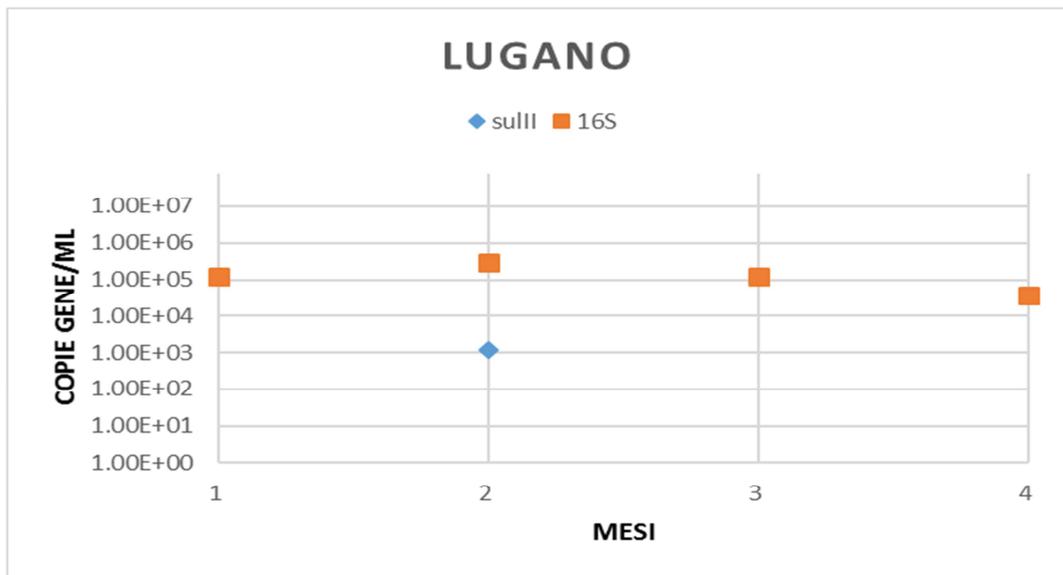


Figura 4: Risultati della quantificazione dei geni ABR (qPCR) espressi in scala logaritmica come copie di geni di resistenza per ml di acqua filtrati presenti nelle acque del lago Ceresio nei pressi dell'impianto per la captazione dell'acqua potabile di Lugano. La concentrazione del gene 16S rRNA è ugualmente espressa come log copie/ml per permettere un confronto immediato. L'unico valore del gene *sullI* ammonta a $1,17 \cdot 10^3$ copie/ml.

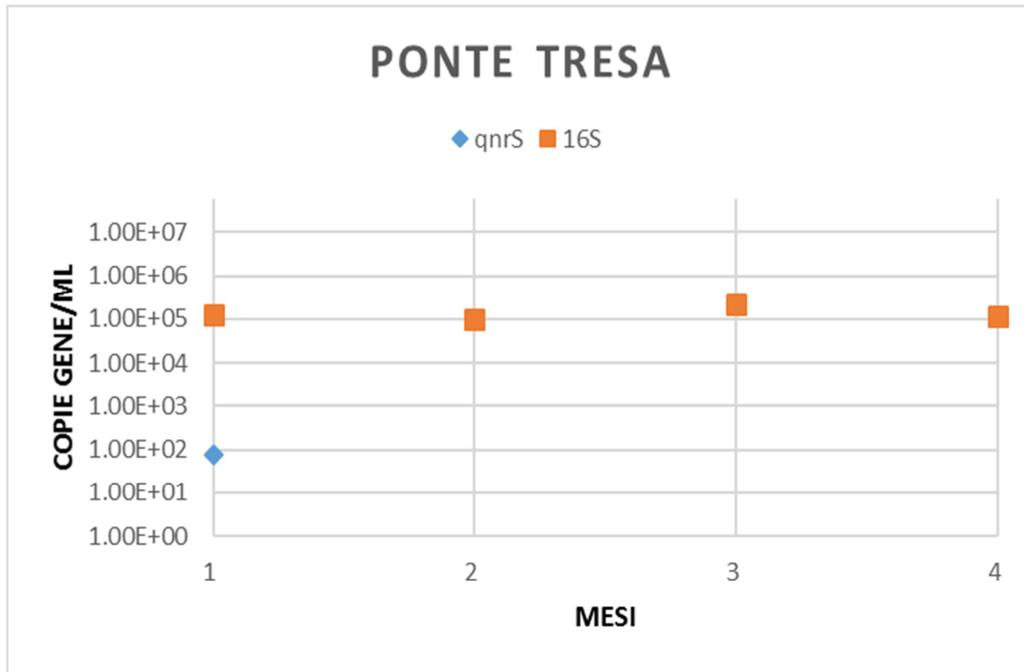


Figura 5: Risultati della quantificazione dei geni ABR (qPCR) espressi in scala logaritmica come copie di geni di resistenza per ml di acqua filtrati presenti nelle acque del lago Ceresio vicino a Ponte Tresa. La concentrazione del gene 16S rRNA è ugualmente espressa come log copie/ml per permettere un confronto immediato. L'unico valore del gene *qnrS* ammonta a $7,83 \cdot 10^1$ copie / ml.

Anche i geni *sullI* e *qnrS* ritrovati nel Lago Ceresio rispettivamente nei campionamenti di Lugano e Ponte Tresa sono significativamente abbondanti ($10^1 - 10^3$ copie/ml con -2 e -3 log di differenza per rapporto al gene 16S) (Figure 4 e 5), mentre il gene *bla_{TEM}* identificato nel Lago Ceresio a Lugano in prossimità dell'impianto di captazione dell'acqua potabile è al di sotto del limite di quantificazione.

2.4. Conclusioni

Il lago Ceresio ed in particolare i quattro fiumi immissari indagati possono essere considerati serbatoi ambientali di geni di resistenza agli antibiotici. I dati ottenuti confermano il ruolo degli impianti di depurazione come fonte di provenienza significativa di questi geni, parallelamente a una presenza maggiore di microinquinanti (tra cui i residui di antibiotici) nelle acque superficiali a valle dei rispettivi IDA. Non sorprende quindi che in questi fiumi siano presenti con maggiore frequenza dei geni di resistenza agli antibiotici. I geni di resistenza misurati nella Magliasina, situata in un ambiente antropizzato ma non direttamente influenzata dallo scarico di un impianto di depurazione delle acque, potrebbero essere presenti naturalmente nei batteri eterotrofi che popolano l'acqua (Pei et al., 2006), ma anche essere favoriti da altre fonti che possono fungere da serbatoio per lo sviluppo di geni di resistenza agli antibiotici (per esempio gli scaricatori di piena o le acque provenienti dal settore dell'agricoltura).

La scarsa ricorrenza di geni di resistenza trovati nel Lago potrebbe essere dovuta alla maggiore lontananza dagli scarichi e soprattutto alla maggiore diluizione di acque contaminate. La presenza di geni di resistenza agli antibiotici nei pressi dell'impianto di captazione dell'acqua potabile

richiederebbe ulteriori indagini per valutare il potenziale rischio del passaggio di questi geni alla rete idrica urbana. Nonostante presso Ponte Tresa, dove le concentrazioni di microinquinanti organici nel lago sono superiori, sia stato rilevato puntualmente l'unico gene ABR nelle acque pelagiche del lago, la scarsità di dati non permette di trarre conclusioni più generali.

Non sono state rilevate delle differenze significative di concentrazioni dei geni ABR nei diversi punti di prelievo. L'abbondanza dei geni di resistenza agli antibiotici nell'ambiente acquatico diminuisce mediamente nell'ordine: *sullI* > *qnrS* ~ *tetA* > *bla*_{TEM}. I geni *bla*_{SHV} e *tetM*, benché rilevati sporadicamente, non sono mai risultati in concentrazioni utili a una possibile quantificazione, presumibilmente anche in ragione di una minore sensibilità per questi geni nell'analisi quantitativa. Infine, i geni *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-48}, *tetB*, *sullII* e *qnrA* non sono mai stati rinvenuti.

I risultati del monitoraggio del Lago Ceresio sono comparabili a quelli ottenuti dall'analisi di altri laghi come il Lago di Ginevra in Svizzera (Czekalski et al., 2012; Czekalski et al., 2015) e il Lago Maggiore in Italia (C.N.R. - I.S.E., 2016); i geni *sul* e *tet* sono i più diffusi e probabilmente derivano dall'uso massiccio che si è fatto in passato di sulfamidici e tetracicline e in alcuni casi sono diventati parte integrante del genoma delle popolazioni batteriche presenti in ambiente (Czekalski et al., 2012; Berglund, 2015). La diffusione del gene *qnr* per i fluorochinoloni sembrerebbe invece più direttamente correlata all'attività antropica; infatti questo gene 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). È possibile evidenziare che non è la prima volta che il gene *qnr* è stato trovato nel Lago Ceresio: infatti nel 2005 è stato isolato un ceppo di *Aeromonas allosaccharophila* positivo per il gene *qnrS* (Picão et al., 2008). Da uno studio pubblicato nel 2011 sul consumo degli antibiotici a livello ospedaliero è emerso infine come nella Svizzera italiana il consumo di fluorochinoloni sia superiore rispetto al resto della Svizzera (Plüss-Suard et al., 2011), portando ad ipotizzare che la presenza del gene *qnr*, che non è stato trovato in altri laghi svizzeri (Czekalski et al., 2012; Czekalski et al., 2015), sia strettamente legata al maggiore utilizzo di questi antibiotici. Per contro in nessun campione del Ceresio è stato rinvenuto il gene *bla*_{CTX-M}, in contrapposizione a una presenza diffusa riscontrata in campioni prelevati dal lago Maggiore.

I risultati forniscono un'istantanea della situazione attuale ma suggeriscono anche molti spunti per sviluppi futuri sullo studio e la prevenzione dell'antibiotico resistenza. Per esempio, dato che la stazione di depurazione sul fiume Cassarate è prossima alla dismissione, sarebbe auspicabile un monitoraggio a medio-lungo termine delle acque del fiume per verificare l'impatto ed i tempi di recupero del Cassarate riguardo l'antibiotico resistenza dopo la cessazione dell'immissione puntiforme dell'IDA. Attraverso il monitoraggio delle acque reflue degli impianti di depurazione si potrebbe valutare l'efficacia della quarta fase di trattamento che verrà aggiunta ad alcuni grossi impianti. Poiché alcune specie batteriche naturalmente presenti in ambiente acquatico possono fungere da serbatoi naturali di geni di resistenza, l'isolamento e l'identificazione di batteri resistenti agli antibiotici permetterebbe di analizzare in dettaglio il loro contributo nella diffusione delle resistenze. Questi studi consentirebbero di capire meglio il ruolo dell'ambiente nella diffusione di geni e batteri resistenti nell'ottica di una visione "One-Health".

3. Bibliografia

Abegglen C. e Siegrist, H. Mikroverunreinigungen aus kommunalem Abwasser. Verfahren zur weitergehenden Elimination auf Kläranlagen. Bundeasamt für Umwelt, Umwelt-Wissen 2012, nr. 1214: 1-210.

Berglund, B. Environmental dissemination of antibiotic resistance genes and correlation to anthropogenic contamination with antibiotics. *Infect. Ecol. Epidemiol.* 5 (2015).

Chaudhary, A.S. A review of global initiatives to fight antibiotic resistance and recent antibiotics' discovery. *Acta Pharm. Sin. B* 6 (2016), 552–556.

CIP AIS. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago di Lugano. 2014. Rapporto annuale 2013.

CIP AIS. Indagini su DDT e sostanze pericolose nell'ecosistema del Lago di Lugano. 2015. Rapporto annuale 2014.

C.N.R.- I.S.E. Sede di Verbania. Ricerche sull'evoluzione del Lago Maggiore. Aspetti limnologici. Programma triennale 2013-2015. Campagna 2015 e Rapporto triennale 2013-2015. Commissione Internazionale per la protezione delle acque italo-svizzere. 2016.

Czekalski, N., Berthold, T., Caucci, S., Egli, A., Bürgmann, H. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after wastewater treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Front. Microbiol.* 3 (2012), 1–18.

Czekalski, N., Gascón Díez, E., Bürgmann, H. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME J.* 8 (2014), 1381–1390.

Czekalski, N., Sigdel, R., Birtel, J., Matthews, B., Bürgmann, H. Does human activity impact the natural antibiotic resistance background? Abundance of antibiotic resistance genes in 21 Swiss lakes. *Environ. Int.* 81 (2015), 45–55.

Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., et al. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 14 (2015), 45.

Di Cesare, A., Luna, G.M., Vignaroli, C., Pasquaroli, S., et al. Aquaculture Can Promote the Presence and Spread of Antibiotic-Resistant Enterococci in Marine Sediments. *PLoS One* 8 (2013), e62838.

Di Cesare, A., Eckert, E.M., Teruggi, A., Fontaneto, D., et al. Constitutive presence of antibiotic resistance genes within the bacterial community of a large subalpine lake. *Mol. Ecol.* 24 (2015), 3888–3900.

Di Cesare, A., Eckert, E.M., D'Urso, S., Bertoni, R., et al. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Res.* 94 (2016), 208–214.

Götz C.W., Kase R. e Hollender, J. Mikroverunreinigungen - Beurteilungskonzept für organische Spurenstoffe aus kommunalem Abwasser. Studie im Auftrag des BAFU. 2010, Eawag, Dübendorf.

Kehrenberg, C., Schwarz, S. Occurrence and linkage of genes coding for resistance to sulfonamides, streptomycin and chloramphenicol in bacteria of the genera *Pasteurella* and *Mannheimia*. *FEMS Microbiol. Lett.* 205 (2001), 283–290.

Lee, C.-R., Lee, J.H., Park, K.S., Kim, Y.B., et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. *Front. Microbiol.* 7 (2016), 895.

Pei, R., Kim, S.C., Carlson, K.H., Pruden, A. Effect of River Landscape on the sediment concentrations of antibiotics and corresponding antibiotic resistance genes (ARG). *Water Res.* 40 (2006), 2427–2435.

Picão, R.C., Poirel, L., Demarta, A., Silva, C.S.F., et al.. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Aeromonas allosaccharophila* recovered from a Swiss lake. *J. Antimicrob. Chemother.* 62 (2008), 948–50.

Plüss-Suard, C., Pannatier, A., Kronenberg, A., Mühlemann, K., Zanetti, G. Hospital antibiotic consumption in Switzerland: Comparison of a multicultural country with Europe. *J. Hosp. Infect.* 79 (2011), 166–171.

Zurfluh, K., Nüesch-Inderbinen, M.T., Poirel, L., Nordmann, P., et al. Emergence of *Escherichia coli* producing OXA-48 β -lactamase in the community in Switzerland. *Antimicrob. Resist. Infect. Control* 4 (2015), 9.

Tabella 6: Presenza (rosso) o assenza (bianco) di geni ABR nei cinque punti di prelievo del Lago Ceresio.

Gandria 0-20 mt

Antibiotico	gene ABR	Feb	Mag	Ago	Nov
β-lattamici	<i>bla</i> (TEM)				
	<i>bla</i> (SHV)				
	<i>bla</i> (CTX-M)				
	<i>bla</i> (oxa 48)				
Fluorochinoloni	<i>qnrA</i>				
	<i>qnrS</i>				
Tetracicline	<i>tetA</i>				
	<i>tetM</i>				
	<i>tetB</i>				
Sulfamidici	<i>sullI</i>				
	<i>sullII</i>				
Integrone classe 1	<i>intl</i>				

Ponte Tresa 0-20 mt

Antibiotico	gene ABR	Feb	Mag	Ago	Nov
β-lattamici	<i>bla</i> (TEM)				
	<i>bla</i> (SHV)				
	<i>bla</i> (CTX-M)				
	<i>bla</i> (oxa 48)				
Fluorochinoloni	<i>qnrA</i>				
	<i>qnrS</i>				
Tetracicline	<i>tetA</i>				
	<i>tetM</i>				
	<i>tetB</i>				
Sulfamidici	<i>sullI</i>				
	<i>sullII</i>				
Integrone classe 1	<i>intl</i>				

Melide 0-20 mt

Antibiotico	gene ABR	Feb	Mag	Ago	Nov
β-lattamici	<i>bla</i> (TEM)				
	<i>bla</i> (SHV)				
	<i>bla</i> (CTX-M)				
	<i>bla</i> (oxa 48)				
Fluorochinoloni	<i>qnrA</i>				
	<i>qnrS</i>				
Tetracicline	<i>tetA</i>				
	<i>tetM</i>				
	<i>tetB</i>				
Sulfamidici	<i>sullI</i>				
	<i>sullII</i>				
Integrone classe 1	<i>intl</i>				

Lugano 40 mt

Antibiotico	gene ABR	Feb	Mag	Ago	Nov
β-lattamici	<i>bla</i> (TEM)				
	<i>bla</i> (SHV)				
	<i>bla</i> (CTX-M)				
	<i>bla</i> (oxa 48)				
Fluorochinoloni	<i>qnrA</i>				
	<i>qnrS</i>				
Tetracicline	<i>tetA</i>				
	<i>tetM</i>				
	<i>tetB</i>				
Sulfamidici	<i>sullI</i>				
	<i>sullII</i>				
Integrone classe 1	<i>intl</i>				

Riva San Vitale 30 mt

Antibiotico	gene ABR	Feb	Mag	Ago	Nov
β-lattamici	<i>bla</i> (TEM)				
	<i>bla</i> (SHV)				
	<i>bla</i> (CTX-M)				
	<i>bla</i> (oxa 48)				
Fluorochinoloni	<i>qnrA</i>				
	<i>qnrS</i>				
Tetracicline	<i>tetA</i>				
	<i>tetM</i>				
	<i>tetB</i>				
Sulfamidici	<i>sullI</i>				
	<i>sullII</i>				
Integrone classe 1	<i>intl</i>				

Tabella 7: Sono riportati i valori espressi come copie di DNA per ml di acqua filtrati ottenuti dall'analisi quantitativa dei geni di resistenza agli antibiotici e del gene 16S rRNA. Le tabelle si riferiscono ai fiumi Veduggio, Cassarate, Laveggio e Magliasina. NQ: Non Quantificabile (inferiore al LOD).

Veduggio							
	sullI	qnrS	tetA	bla (TEM)	bla (SHV)	tetM	16S
gen	1.50E+03	1.04E+02					6.83E+05
feb	2.51E+03	7.25E+02					1.66E+05
mar	2.03E+03						1.57E+05
apr	2.29E+03						1.74E+05
mag	5.48E+02		3.44E+02				7.25E+05
giu	6.62E+02		4.56E+02		NQ	NQ	1.45E+06
lug	4.44E+02	2.03E+02	3.47E+02	NQ	NQ	NQ	1.66E+06
ago	NQ	2.26E+02	2.87E+02				1.19E+06
set	2.52E+03	1.77E+03	4.73E+02			NQ	1.81E+06
ott	5.00E+03	1.36E+03	5.54E+02		NQ	NQ	7.51E+05
nov	1.90E+04	NQ	7.15E+02				5.01E+04
dic	2.08E+04						1.40E+05

Cassarate							
	sullI	qnrS	tetA	bla (TEM)	bla (SHV)	tetM	16S
gen	3.48E+03	1.07E+03					1.15E+05
feb		1.10E+03				NQ	5.25E+04
mar	2.12E+03	6.52E+02					4.00E+04
apr	1.13E+03		9.54E+02	4.93E+01			1.28E+05
mag	1.58E+03		1.29E+03				1.21E+03
giu	9.40E+02	NQ			NQ		6.02E+04
lug	3.97E+02	4.22E+01	3.44E+02	1.33E+01	NQ	NQ	2.13E+05
ago	5.60E+02						7.05E+04
set	1.07E+03	1.96E+02	3.48E+02			NQ	5.24E+05
ott	2.59E+03	4.93E+02	1.42E+03	6.36E+01			7.66E+04
nov	6.85E+03	1.15E+02	3.39E+02				5.37E+04
dic	9.50E+03	3.44E+02	3.50E+02		NQ		8.33E+04

Laveggio							
	sullI	qnrS	tetA	bla (TEM)	bla (SHV)	tetM	16S
gen			2.37E+02				2.38E+04
feb							
mar	8.84E+02						2.10E+04
apr	1.28E+02	4.77E+02	9.33E+01				4.23E+04
mag	1.86E+02		1.93E+02				8.68E+04
giu	8.44E+02	NQ		NQ	NQ	NQ	2.14E+05
lug	5.65E+02	3.56E+02	4.04E+02	NQ	NQ	NQ	3.37E+05
ago	NQ	1.55E+02	5.25E+02				1.21E+05
set	1.23E+03	9.23E+02	3.64E+02			NQ	1.21E+05
ott	7.09E+02	1.58E+02					5.38E+04
nov	NQ	6.57E+02	1.67E+02				2.79E+04
dic	6.93E+03						6.26E+03

Magliasina							
	sullI	qnrS	tetA	bla (TEM)	tetM	16S	
gen			3.36E+03			4.67E+04	
feb						1.23E+04	
mar	1.73E+03					1.19E+04	
apr							
mag	5.48E+02		4.32E+02			6.46E+04	
giu	3.90E+02				NQ	1.69E+05	
lug	5.94E+02	2.53E+02	6.24E+02	NQ	NQ	4.18E+05	
ago			5.03E+02			2.03E+05	
set	9.03E+02	1.04E+02	9.04E+02		NQ	3.21E+05	
ott	9.78E+02		5.77E+02			4.26E+04	
nov	1.09E+04					9.14E+03	
dic	1.69E+04		8.34E+02			8.98E+03	