

6. PRESENZA E DISTRIBUZIONE DI BATTERI ANTIBIOTICO-RESISTENTI NELLE ACQUE DEL LAGO MAGGIORE

Gianluca Corno, Andrea Di Cesare, Ester Eckert, Mario Contesini, Roberto Berton

La presenza in ambiente di batteri non-patogeni resistenti agli antibiotici è un problema sanitario di primaria importanza. Questi batteri, non pericolosi per l'uomo, possono essere tramite di geni specifici, e quindi indurre resistenza agli antibiotici, in batteri patogeni di origine alloctona che sono presenti nelle acque in ambienti antropizzati come il Lago Maggiore, risultando in un potenziale grave rischio per la salute umana e per l'utilizzo dell'acqua.

Un batterio assume la possibilità di sopravvivere in presenza di antibiotici attraverso l'acquisizione e l'attivazione di geni e di pathways molecolari specifici che possono essere prodotti da stress ambientali (per esempio l'impatto dei raggi ultravioletti che provocano mutazioni casuali che si risolvono nello sviluppo di geni funzionanti), dalla presenza di organismi che producono antimicrobici (come nel caso delle resistenze ad antibiotici naturali, molto diffuse nei popolamenti batterici ambientali) e per via dell'esposizione all'antibiotico dei batteri che vivono nei pressi di scarichi urbani, agricoli e industriali (ed è questo il caso più grave perché le resistenze sviluppate sono ad antibiotici sintetici o semisintetici, utilizzati in ambito medico, ospedaliero e veterinario).

La nostra attività si concentra su questo ultimo e più pericoloso gruppo, quantificando i geni di resistenza ai principali gruppi di antibiotici di uso comune (medico e veterinario) nei popolamenti batterici del Lago Maggiore. Un'attività comparabile è portata avanti dall'EAWAG sul Lago di Ginevra (Progetto "Antibiotic resistance as an emerging environmental contaminant", Czekalski et al. 2012, 2014) e analisi sulla presenza di batteri antibiotico resistenti nei tributari del Lago di Costanza sono alla base del progetto "SchussenAktivplus" dell'Università di Tübingen (Triebskorn and Hetzenauer 2012, Triebskorn et al. 2013): entrambi questi studi stanno evidenziando la presenza e la potenziale pericolosità di importanti popolamenti di batteri antibiotico-resistenti nelle acque dei due laghi oggetto di studio.

Le acque di scarico civili agricole ed industriali della Val d'Ossola, del Canton Ticino e della zona del Basso Verbano confluiscono nel Lago Maggiore e seppur trattate in modo corretto la loro introduzione è causa diretta o indiretta della formazione di antibiotico-resistenze, in quanto ad oggi non esistono trattamenti specifici per la rimozione di antibiotici dai reflui, come confermato dagli studi sugli efflussi del Depuratore di Losanna nel Lago di Ginevra (Czekalski et al. 2014).

Sebbene i dati sull'utilizzo, ancora oggi massivo (nell'ordine di 10^5 tonnellate per anno nella sola Svizzera, fonte FEDESA) di antibiotici confermino un costante calo nell'ultimo decennio in Canton Ticino e una situazione di consumi grossomodo stabili per Regione Piemonte e Regione Lombardia (AIFA, 2009), sia nel settore medico che in quello veterinario, dati contrastanti arrivano da specifiche analisi sulle vendite (che negli ultimi anni sono caratterizzate anche da un mercato diretto, generalmente elettronico, in gran parte illegale) e da studi sulla presenza di batteri antibiotico resistenti negli ospedali così come nei prodotti agricoli e zootecnici (per esempio la presenza di stafilococchi aurei meticillino-resistenti nei suini da macello ha registrato in Svizzera nel 2012 un aumento dal 5,6 al 18% a fronte di una

diminuzione delle vendite di antibiotici nel settore zootecnico di circa l'1% e di oltre l'8% nel settore medico, ARCH-Vet. 2012). Un rapporto tra antibiotici utilizzati in veterinaria e antibiotici utilizzati in cure mediche è molto difficile da ottenere, proprio per la poca affidabilità dei dati a disposizione. Inoltre, quantificare la presenza diretta di antibiotici nelle acque del lago è quasi impossibile, data la grande varietà di differenti antibiotici prodotti e date le loro bassissime concentrazioni in acqua, è però possibile quantificarne l'impatto sulla comunità batterica, in termini di sviluppo di batteri resistenti, che sono poi anche la fonte di potenziale rischio.

A partire dal 2013, il CNR-ISE monitora la presenza di geni di antibiotico-resistenza per gli antibiotici di uso più comune nella comunità batterica acquatica, in 4 stazioni, due pelagiche (Ghiffa, punto di massima profondità del Lago e Pallanza, Bacino Borromeo), e due litorali (Ascona ed Arona). Le stazioni sono caratterizzate da diverso impatto antropico: Ghiffa subisce indirettamente (attraverso correnti, navigazione, venti e trasporto attraverso organismi più grandi) l'effetto delle attività umane a riva, e quindi dell'inquinamento da antibiotici, mentre le altre tre stazioni sono caratterizzate da un impatto diffuso e costante, con punte di utilizzo nella stagione estiva quando le rive in prossimità dei punti di campionamento sono ampiamente utilizzate per scopi ricreativi.

6.1 Valutazione della presenza di geni di antibiotico-resistenza (ABR) nell'anno 2014

L'attività periodica di campionamento nei Punti di Ghiffa e Pallanza si è svolta mensilmente durante tutto l'anno 2014, mentre i punti di Arona ed Ascona sono stati campionati 4 volte durante il 2014, con cadenza stagionale.

I campioni sono stati raccolti come campione integrato degli strati d'acqua compresi tra 0 e 20 metri (ponendo particolare cura nell'evitare di contaminare il campione con frazioni di sedimento e quindi, quando necessario, limitandosi alla frazione 0-1 metro sopra al fondo). Una volta prelevati campioni sono stati quindi posti a 4°C e trasportati nei laboratori dell'ISE dove sono stati prefiltrati su retino da 10 µm per eliminare organismi di taglia superiore, ed i batteri concentrati sul filtro Nucleopore da 0.22 µm. Per ogni filtro, in dipendenza della stagione e quindi della biomassa microbica, è stato possibile concentrare tra 500 e 1500 ml di campione. Dai filtri è stato poi estratto il DNA batterico totale, poi mantenuto a -20°C.

Attraverso l'amplificazione tramite polimerase chain reaction (PCR) di frammenti di DNA unici nella loro composizione e specifici di singoli geni di ABR è stato possibile valutare la presenza degli stessi nei vari campionamenti.

I protocolli di PCR utilizzati sono quelli standard per ciascun gene ed il risultato è stato valutato qualitativamente dopo aver migrato elettroforeticamente il frammento in gel, averlo evidenziato in fluorescenza (SybrGreen, Biorad). L'amplicone è stato quindi visualizzato in gel attraverso un sistema GelDoc (Biorad). Solo i campioni nei quali la corsa dell'amplicone è risultata priva di segnale di fondo, e l'unica banda presente era relativa alla dimensione attesa sono stati considerati come positivi.

I geni analizzati durante il 2014 (secondo anno di monitoraggio intensivo) coprono le famiglie di antibiotici di uso più comune nell'ultimo decennio in Italia ed in Svizzera: beta-lattamici, fluorochinoloni, sulfamidici e tetracicline (Tabella 6.1): si è deciso di testare gli stessi geni già testati nel 2013, al fine di valutarne sia i trend

pluriennali (nel caso fossero già presenti), sia l'eventuale comparsa (nel caso non fossero stati trovati nel 2013).

In totale è stata valutata la presenza di 9 geni, includendo il gene *Int1* che per quanto non specifico per una particolare ABR è associato ad un elemento, l'integrone 1, spesso associato a sviluppo di ABR a diversi agenti antimicrobici (Hall & Stokes 1993). Nella seconda parte dell'anno il gene *tet(B)* di resistenza alle tetracicline, sempre assente fino ad allora, non è più stato testato, ed abbiamo iniziato a testare il gene *erm(B)* di resistenza all'eritromicina (gruppo degli antibiotici macrolidi). Inizialmente si era deciso di non testare i macrolidi che hanno un consumo (limitato al settore umano) relativamente ridotto il Piemonte e Lombardia.

Tab. 6.1. Antibiotico resistenze testate nel Lago Maggiore, molecole correlate, e dati sul consumo in Italia (Rapporto EFSA e ECDC, 2011).

*dati percentuale sul totale utilizzato (valori riferiti al consumo totale che include sia il settore ospedaliero che le cure mediche di base).

Famiglia di antibiotici	Utilizzo medico in Italia nel 2011*	Utilizzi più comuni	Gene testato per CIP AIS
Tetracicline	1.74	Pollame, ovini e suini. Cure mediche di base.	<i>tet A</i> <i>tet B</i>
Sulfamidici	1.31	Bovini, suini, pollame, acquacoltura.	<i>sul I</i> <i>sul II</i>
Beta-lattamici	63.25	Ospedaliero, cure di base. Bovini e suini.	<i>bla CTX</i> <i>bla SHV</i> <i>bla TEM</i>
Fluorochinoloni	12.78	Ospedaliero. Pollame	<i>qnr S</i>
Macrolidi	15.72	Ospedaliero, cure di base.	<i>erm B</i>
---	---	---	<i>int 1</i>

I risultati relativi alle analisi per il 2014 dimostrano la presenza di un numero significativo di batteri ABR nelle acque del Lago Maggiore (Fig. 6.1). Questo dato è coerente con i dati a disposizione per i grandi laghi subalpini e con quanto già osservato nel Lago Maggiore nel 2013, ma pone una necessità di analisi e di comprensione del rischio fino ad oggi mai presa in considerazione nella gestione della risorsa idrica.

Nel dettaglio, durante l'arco del 2014, ABR ad antibiotici beta-lattamici (i più utilizzati in ambito umano) sono stati riscontrati in campioni singoli nei 4 siti di riferimento (gene *bla_{CTXM}*) durante la prima parte dell'anno (Fig. 6.1) o sono risultati assenti nei popolamenti batterici del Lago (geni *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}*). La loro presenza sporadica non sembra legata a particolari eventi climatici o di generale impatto sul Lago, anche se una sorta di stagionalità sembra comparire. Per questa ragione analisi più dettagliate ed una serie temporale più lunga permetteranno una valutazione più completa dei dati.

Il gene di resistenza ai solfamidici (*sulII*) è invece stato riscontrato sia nei siti di monitoraggio mensile di Ghiffa (pelagico) e di Pallanza che in quelli a campionamento stagionale di Arona e Ascona in ogni stagione. La presenza costante

e massiva di geni di ABR ai solfamidici è comune ad altri laghi (e.g. Ginevra) e non è correlata all'utilizzo di questa famiglia di antibiotici sull'uomo, in quanto i solfamidici, largamente utilizzati fino agli anni '60, sono oggi utilizzati in casi molto particolari ed hanno un utilizzo molto limitato. L'impiego di solfamidici in zootecnia è invece massivo, specialmente nel trattamento di bovini e altri grandi mammiferi ed in acquacoltura.

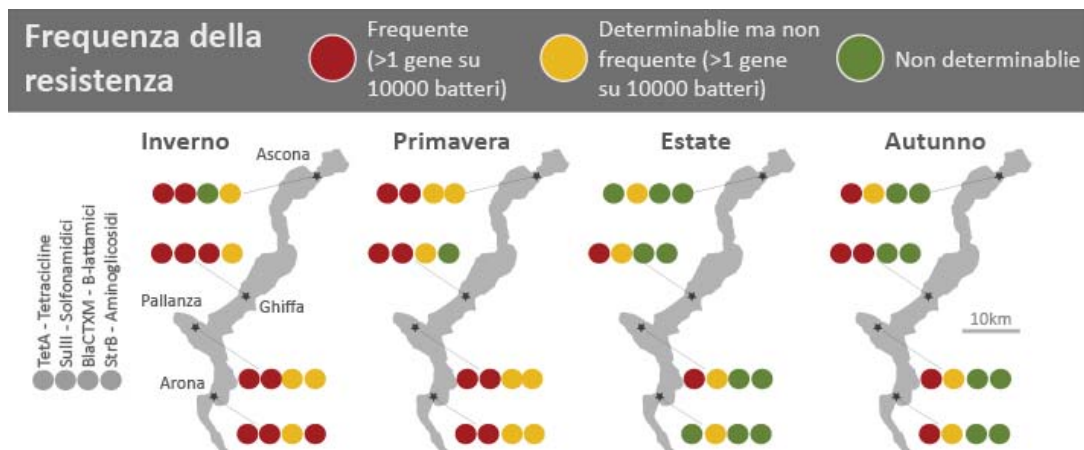


Fig. 6.1. Frequenza dei geni di ABR risultati positivi nei vari siti campionati nell'anno 2014. Per ogni campionamento e per ogni sito almeno una specifica ABR è stata trovata durante l'anno 2014, indipendentemente dalla resistenza testata. Il colore rosso indica una situazione di almeno un campionamento durante la stagione nel quale lo specifico gene di resistenza è quantificabile, il giallo, che in almeno un caso abbiamo avuto una presenza non quantificabile (e mai più elevata durante la stagione), mentre il verde indica l'assenza del gene specifico.

Anche i geni di resistenza alle tetracicline, antibiotici ampiamente utilizzati in zootecnia e anche, seppur con minor preponderanza, nelle cure di base e ospedaliere per esseri umani, sono presenti in misura consistente nei campioni analizzati: il gene *tetA* è stato stagionalmente riscontrato in tutti i campioni, con una certa riduzione nel periodo estivo, specialmente ad Arona ed Ascona. Il gene *tetB* è risultato non presente in tutti i campioni, anche in questo caso in accordo con i dati prodotti dai programmi di analisi effettuati su altri grandi laghi europei, per questa ragione a partire da luglio 2014 non è stato più monitorato.

Tutti i campioni analizzati sono inoltre risultati negativi rispetto alla presenza di fluorochinoloni (*qnrS*) dei macrolidi (nuovo gruppo di antibiotici, testato attraverso il gene *ermB* a partire dal 2014) e dell'interferone 1.

I risultati ottenuti, oltre a porre l'attenzione su un tema a lungo sconosciuto ed oggi di rilevanza preminente, ci hanno portato a ricercare un dato più preciso riguardo all'effettiva consistenza del numero di geni presenti, e quindi dell'importanza della contaminazione. Per questa ragione, nel 2014, abbiamo applicato analisi di qPCR (PCR quantitativa) ai geni *tetA* di resistenza alle tetracicline e *sulII* (solfamidici) presenti nella gran parte dei campioni analizzati, ma anche per i geni *bla_{CTXM}* (betalattamici) e *strB* (aminoglicosidi) presenti solo in alcuni campioni, ma di maggiore interesse in quanto più direttamente correlabili a contaminazioni da parte dell'uomo.

6.2 Quantificazione dei geni di resistenza

La quantificazione dei geni *tetA*, *sulIII*, *bla_{CTXM}* e *strB* è stata effettuata attraverso analisi in PCR quantitativa (qPCR). Il DNA estratto da ogni campione è stato purificato e quantificato. Il protocollo di qPCR utilizzato prevede l'uso di home-made standard per la definizione di un limite soglia per la quantificazione del segnale (Bustin et al. 2009). Per le analisi è stato utilizzato un termociclature Biorad CTX Connect, con chimica SSO Advanced (Biorad) in SybrGreen. I valori di amplificazione dei diversi geni sono stati poi rapportati ai valori di amplificazione del gene 16S rRNA, gene conservativo delle cellule procariotiche che può essere considerato un proxy del numero totale di cellule batteriche, ma anche indicato come numero assoluto di copie di ogni singolo gene per millilitro, in modo da evitare errori legati alla variabilità del numero di copie di 16S rRNA nei diversi batteri.

I risultati ottenuti dimostrano la presenza, in termini significativi del gene *tetA* nei popolamenti batterici del Lago Maggiore, senza pattern spaziali significativi, con concentrazioni che possono raggiungere i 500000 geni presenti per milione di cellule batteriche, equivalente in alcuni casi a circa 1000000 di geni per millilitro (Fig. 6.2). Questo valore, riscontrato per *tetA* nelle sue massime concentrazioni è indicativo di un elevato impatto antropico, dal punto di vista di rilascio di antibiotici in ambiente, ed è in qualche modo paragonabile ai valori per il gene *sulIII* (Fig. 6.2) che, seppur non raggiunga abbondanze elevate quanto *tetA*, in molti casi (come a Pallanza per i primi 6 mesi del 2014) è il gene di resistenza più abbondante in assoluto.

I geni di resistenza a betalattamici e aminoglicosidi (*bla_{CTXM}* e *strB*) sono presenti nel Lago Maggiore unicamente nella prima parte del 2014, e solo in due casi in gennaio 2014 risultano quantificabili (Fig. 6.2).

In generale possiamo osservare una situazione in cui la prima parte dell'anno è caratterizzata da una elevata quantità di geni di resistenza nel popolamento batterico, in tutte le stazioni. La seconda parte del 2014 invece vede un calo drastico delle abbondanze ed in alcuni casi (*bla_{CTXM}* e *strB*) la scomparsa quasi assoluta del gene.

La comparazione tra il primo anno di monitoraggio (il 2013) ed il 2014, ci conferma la complessità dell'analisi. Limitandoci ai due geni per i quali abbiamo valori quantitativi per entrambi gli anni del biennio, *sulIII* e *tetA* (Fig. 6.3) si può notare come le due annate siano state caratterizzate da trend difficilmente comparabili sia per la stazione pelagica di Ghiffa che per quella litorale di Pallanza. La stazione di Ghiffa vedeva nel 2013 per il gene *tetA* un picco estivo ben caratterizzato ed uno a dicembre 2013, con abbondanze relative comprese tra 20 e 100 geni per millilitro. Allo stesso tempo il gene *sulIII* oltre ad un piccolo picco ad inizio primavera incrementava significativamente in estate (5-10 copie per millilitro). Nel 2014 (Fig. 6.3) la situazione ha visto un forte incremento di abbondanze per entrambi i geni nella prima parte dell'anno (*tetA* circa 1 milione di copie millilitro a gennaio e aprile, *sulIII* 50-100000 copie per millilitro da febbraio a maggio) mentre da luglio a dicembre la situazione si è riportata su valori paragonabili al 2013.

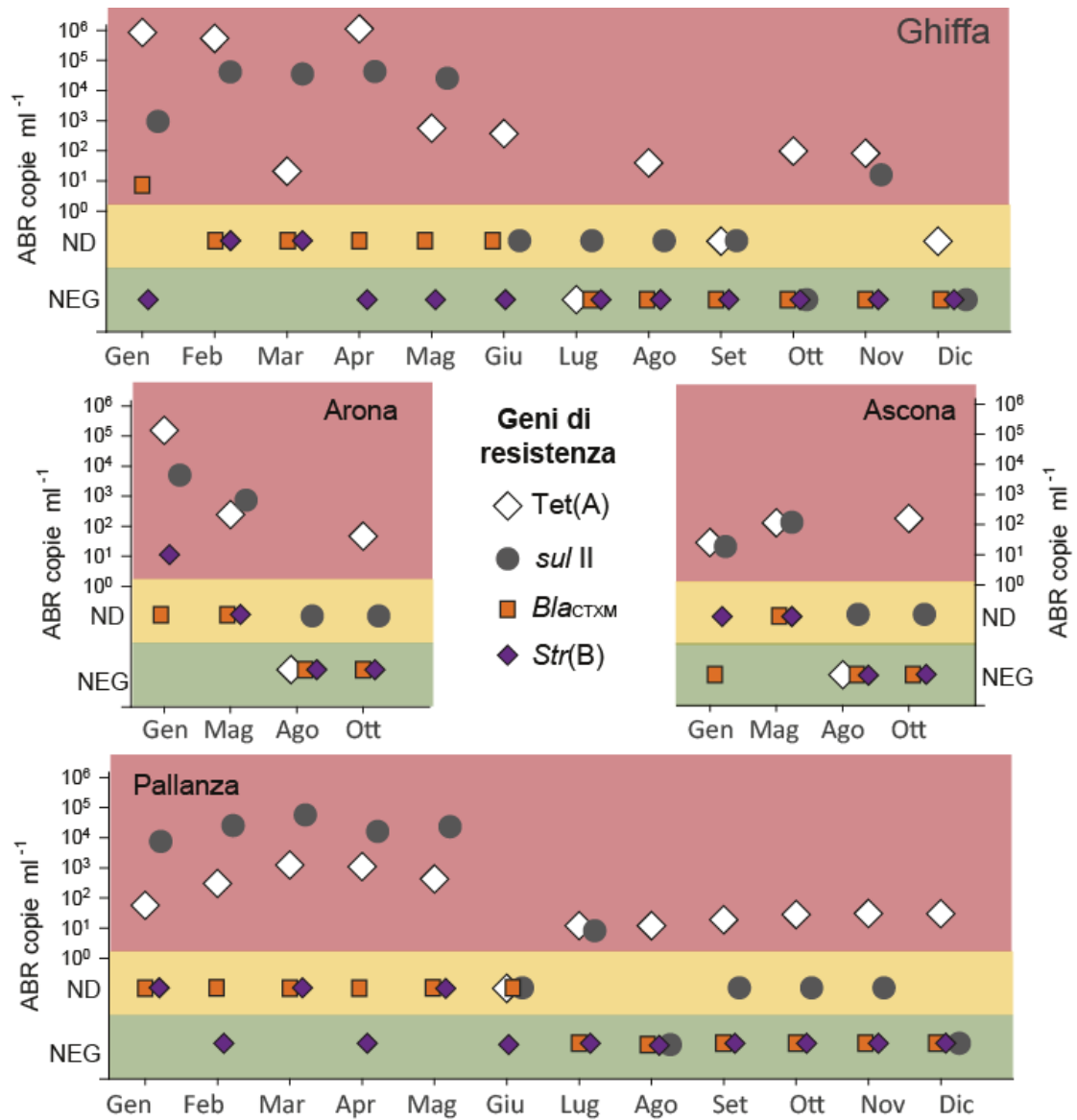


Fig. 6.2. Misura dell'incidenza dei diversi geni di resistenza quantificabili attraverso tecniche di RT-PCR nei popolamenti microbici del Lago Maggiore nel 2014.

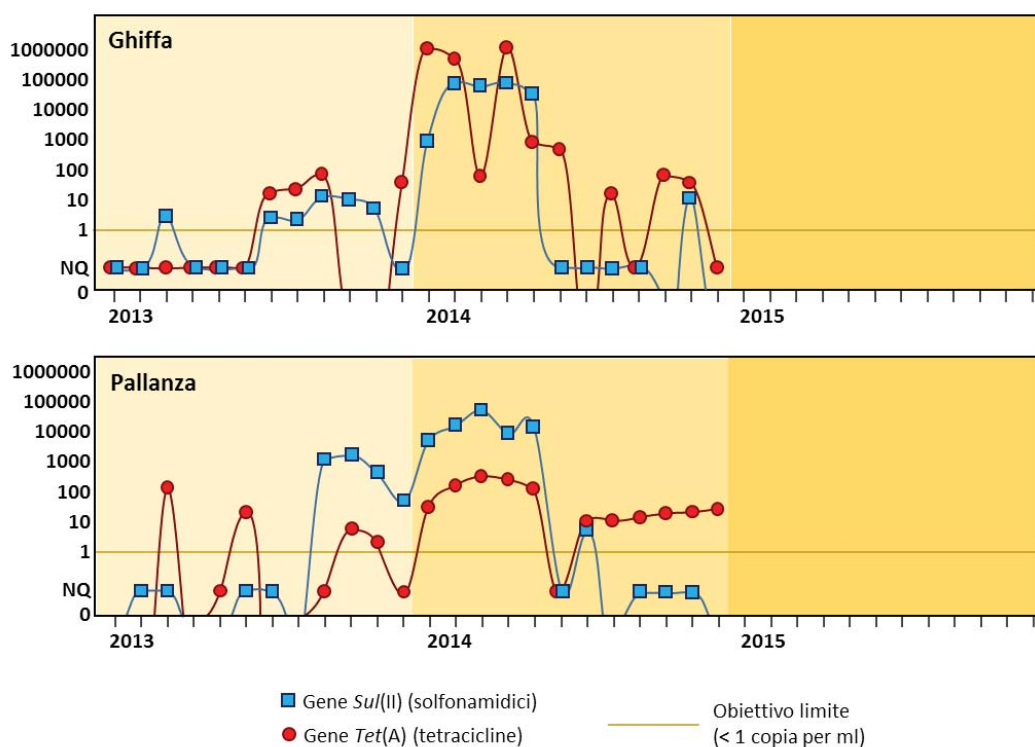


Fig. 6.3: Numero di copie per millilitro di geni di resistenza alle tetraciline (*tetA*) ed ai solfonamidici (*suII*) nelle stazioni di Ghiffa (pelagica) e Pallanza (litorale), campionate con cadenza mensile.

Benché la situazione di Pallanza sembri più complessa (Fig. 6.3), un netto incremento in termini di abbondanza assoluta può essere facilmente osservato sia per quanto riguarda i geni di resistenza ai solfonamidici (in netto calo nella seconda parte dell'anno) che le tetraciline. Il valore massimo in termini di abbondanza per il sito di Pallanza è più basso per entrambi i geni, che non superano le 70000 cellule millilitro (*tetA*) e le 180 (*suII*).

In conclusione possiamo affermare che dalle analisi di questo secondo anno di monitoring della presenza di antibiotico-resistenze nel Lago Maggiore, il quadro che si ottiene è di un lago fortemente antropizzato dove resistenze specifiche ad antibiotici sintetici sono presenti e diffuse. Questa situazione pur essendo lontana dall'essere ottimale non ci pone per ora in uno stato di emergenza, ma sicuramente di pre-allarme in quanto l'utilizzo delle acque del Lago a fini diversi è già elevato ed andrà ad aumentare nei prossimi anni, mentre un eventuale adeguamento dei sistemi di depurazione non è una soluzione definitiva e l'utilizzo di antibiotici, seppur in calo secondo le fonti ufficiali, è comunque ancora massivo, sia nel settore della salute umana che, soprattutto, in quello agricolo-zootecnico.

Le analisi effettuate in questo secondo anno hanno permesso di confermare alcune criticità apparse già durante il 2013, e di proporre di nuove.

L'andamento in crescita delle abbondanze dei principali geni di resistenza preoccupa e richiede un affinamento delle ricerche, oltre che alla costituzione di una serie temporale tale da permetterci di destagionalizzare i dati e valutarli nella loro consistenza reale.

Al tempo stesso la conferma dell'assenza di geni di resistenza ad un gruppo importante e molto utilizzato come i fluorochinoloni ci fa ben sperare per una diretta risposta ambientale alla contaminazione, ma anche in questo caso solo attraverso analisi più approfondite e serie temporali più ampie sarà possibile proporre una valutazione nel merito.

Così come fatto per il 2014 anche nel 2015 stiamo affinando la ricerca, e definendo nuove famiglie di antibiotici per le quali è necessaria la valutazione dello sviluppo di batteri resistenti. Le analisi quantitative verranno quindi ampliate a più geni, ogniqualvolta verrà considerato necessario, ed includeranno sicuramente tutti i geni a maggior diffusione, per le quali saranno ampliate anche al biennio 2013-14 (come già fatto quest'anno per il gene *suII*), grazie al fatto che il DNA estratto è conservato nei laboratori del CNR-ISE.

Bibliografia

- AIFA. 2009. Rapporto sull'uso dei farmaci antibiotici nelle regioni italiane. Agenzia Italiana del Farmaco. 1:19-35.
- ARCH-Vet. 2012. Rapporto sulla vendita di antibiotici in medicina veterinaria e sul monitoraggio della resistenza agli antibiotici negli animali da reddito in Svizzera. Dipartimento federale dell'interno DFI, Ufficio federale di veterinaria UFV. 4-7.
- Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J. & Wittwer C.T. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry* 55:611–622.
- Czekalski N., Berthold T., Caucci S., Egli A. and Bürgmann H. 2012. Increased levels of multiresistant bacteria and resistance genes after waste water treatment and their dissemination into Lake Geneva, Switzerland. *Frontiers in Microbiology* 3: 106, doi: 10.3389/fmicb.2012.00106.
- Czekalski N., Gascón Díez E. and Bürgmann H. 2014. Wastewater as a point source of antibiotic-resistance genes in the sediment of a freshwater lake. *ISME Journal* advance online publication, March 6, 2014; doi:10.1038/ismej.2014.8
- EFSA & ECDC. 2011. European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2009. *EFSA Journal* 9(7): 2154.
- FEDESA. 1999. Rapporto sull'utilizzo di antibiotici in medicina e veterinaria nell'Unione Europea. Federazione Europea della Salute Animale.
- Hall R.M. & Stokes H.W. 1993. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica* 90: 115-132.
- Triebskorn R. & Hetzenauer H. 2012. Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. *Environmental Sciences Europe*: 24.
- Triebskorn R., Amler K., Blaha L., Gallert C., Giebner S. et al. 2013. SchussenAktivplus: reduction of micropollutants and of potentially pathogenic bacteria for further water quality improvement of the river Schussen, a tributary of Lake Constance, Germany. *Environmental Sciences Europe*: 25.