

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

Gianluca Corno, Andrea Di Cesare, Ester Eckert, Mario Contesini, Roberto Bertonì.

6.1. Geni di ABR e Lago Maggiore

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 (Triebkorn and Hetzenauer 2012; Triebkorn *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. Dal 2016 anche il Lago di Lugano è monitorato per la presenza di geni di antibiotico resistenza dalla SUPSI nel quadro del monitoraggio predisposto dal nuovo piano CIPAI 2016-18.

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) e di quelli dei depuratori di Verbania e Cannobio nel Lago Maggiore (Di Cesare *et al.*, 2016).

Sebbene i dati sull'utilizzo, ancora oggi massivo (nell'ordine di 105 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.

6.1.1 Valutazione della presenza di geni di antibiotico-resistenza (ABR) nell'anno 2015

L'attività periodica di campionamento nei Punti di Ghiffa e Pallanza si è svolta a partire da gennaio 2015 con cadenza mensile, mentre i punti di Arona ed Ascona sono stati campionati 4 volte durante il 2015, 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, i 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 su filtri 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 2015 (terzo 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, tetracicline, aminoglicosidi e dal 2015 anche macrolidi (Tab. 6.1).

In totale è stata valutata la presenza di 12 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).

Tabella 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 M</i> <i>tet B</i>
Sulfamidici	1.31	Bovini, suini, pollame, acquacoltura.	<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> <i>qnr A</i>
Aminoglicosidi	2.85	Vario	<i>str B</i>
Macrolidi	15.72	Ospedaliero, cure di base.	<i>ermB</i>
---	---	---	<i>int 1</i>

I risultati relativi alle analisi per il 2015 dimostrano la presenza di un numero significativo di geni di 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 e nel 2014, 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 2015, ABR ad antibiotici beta-lattamici (i più utilizzati in ambito umano) sono stati riscontrati in campioni singoli nei 4 siti di riferimento (gene *blaCTX-M*) principalmente durante la prima parte dell'anno (Fig. 6.1) o sono risultati assenti nei popolamenti batterici del Lago (geni *blaTEM* e *blaSHV*). La presenza del gene *blaCTX-M* non sembra legata a particolari eventi climatici o di generale impatto sul Lago, anche se una sorta di stagionalità sembra comparire specialmente per il sito pelagico di Ghiffa. Per questa ragione analisi più dettagliate ed una serie temporale più lunga permetteranno una valutazione più completa dei dati, in ogni caso è da notare un incremento di gene *blaCTX-M* rispetto agli anni scorsi, dato di per se preoccupante in quanto questo gene è indicatore di impatto da parte delle attività umane.

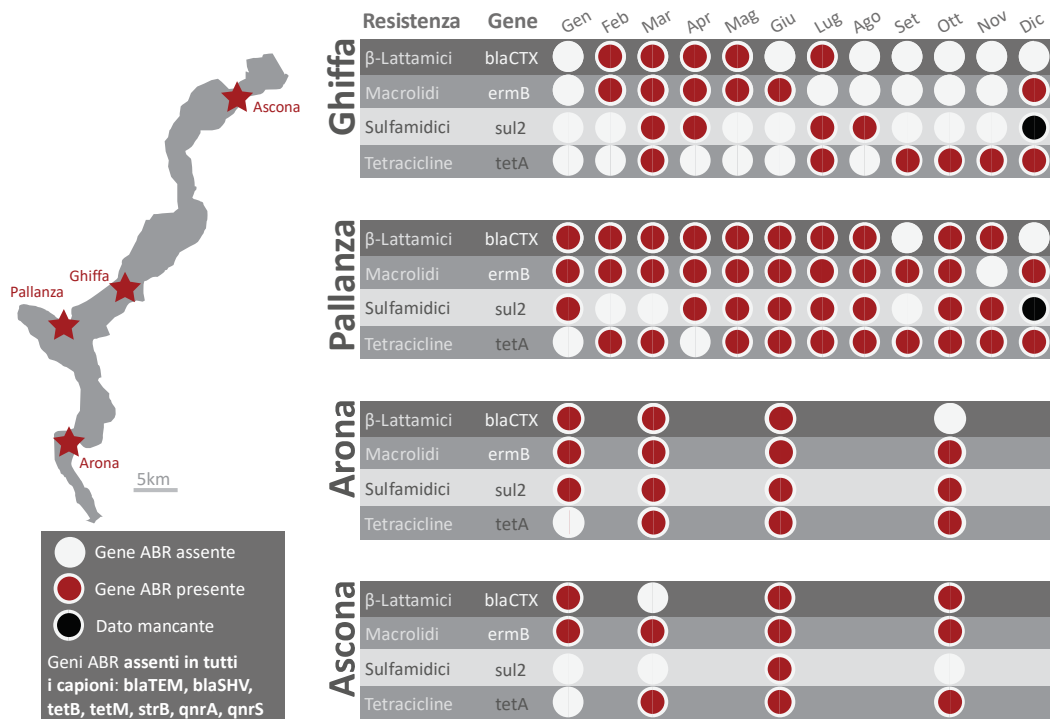


Fig. 6.1. Presenza di geni di ABR nei vari siti campionati nell'anno 2015.

Il gene di resistenza ai sulfamidici (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 sulfamidici è comune ad altri laghi (e.g. Ginevra) e non è correlata all'utilizzo di questa famiglia di antibiotici sull'uomo, in quanto i sulfamidici, largamente utilizzati fino agli anni '60, sono oggi prescritti in casi molto particolari ed hanno un utilizzo limitato. L'impiego di sulfamidici in zootecnia è invece massivo, specialmente nel trattamento di bovini e altri grandi mammiferi ed in acquacoltura. Interessante notare un decremento di sulII nella stazione pelagica di Ghiffa, rispetto agli anni 2013-2014.

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, specialmente nei siti litorali di Pallanza, 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). Si è invece riscontrata la presenza di ermB, gene di resistenza ai macrolidi. Data la sua specificità, e la potenziale forte correlazione con attività umane si è deciso di quantificarlo al posto del gene strB di resistenza agli aminoglicosidi, che negli anni 2013-14 non ha presentato elevati valori ne' importanti oscillazioni. ermB è risultato presente nella gran parte dei campioni analizzati con la sola eccezione di Ghiffa nella prima parte del 2015.

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, anche nel 2015, abbiamo applicato analisi di qPCR (PCR quantitativa) ai geni tetA di resistenza alle tetracicline, sulII (solfamidici), blaCTX-M (betalattamici) e, come detto, ermB (macrolidi) presenti nella gran parte dei campioni, e per gli ultimi due, di elevato interesse in quanto più direttamente correlabili a contaminazioni da parte dell'uomo.

6.1.2 Quantificazione dei geni di resistenza

La quantificazione dei geni tetA, sulII, blaCTX-M ed ermB 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 termociclatore 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 sono stati anche validati 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 dei quattro geni quantificati (Fig. 6.2). Il solo gene ermB non è mai risultato quantificabile con qPCR, pur essendo presente nella grande maggioranza dei campioni analizzati. Il gene tetA è risultato quantificabile, e quindi relativamente abbondante, in almeno due campioni in ogni stazione di campionamento nel 2015, confermandosi costitutivo nei popolamenti batterici del Lago Maggiore, senza pattern spaziali significativi, con concentrazioni che possono raggiungere i 10000 geni presenti per milione di cellule batteriche, equivalente in alcuni casi a circa 40000 di geni per millilitro (Fig. 6.2). Questo valore è paragonabile ai valori per il gene sulII misurati a Pallanza che si conferma la stazione dove questo gene raggiunge le concentrazioni più significative.

Proprio nella stazione di Pallanza si è purtroppo misurata un'elevata concentrazione di geni di resistenza a betalattamici (blaCTX-M) che richiede ulteriori analisi per essere eventualmente confermata nei prossimi anni (Fig. 6.2). Questi valori, in assoluto i più elevati misurati per qualsiasi gene nel 2015, con un picco estivo ben definito possono essere riferiti ad un inquinamento puntuale, ma potrebbero anche essere l'indicazione di un cambiamento del resistoma del Lago maggiore verso resistenze agli antibiotici di più largo consumo e, purtroppo, anche di ultima generazione.

A Ghiffa, nella stazione pelagica, possiamo osservare una situazione in cui la prima parte dell'anno è caratterizzata da una elevata presenza di geni di resistenza nel popolamento batterico, mentre nella seconda parte del 2015 si ha un calo drastico delle abbondanze ed in alcuni casi (blaCTXM e sulII) la scomparsa quasi assoluta del gene.

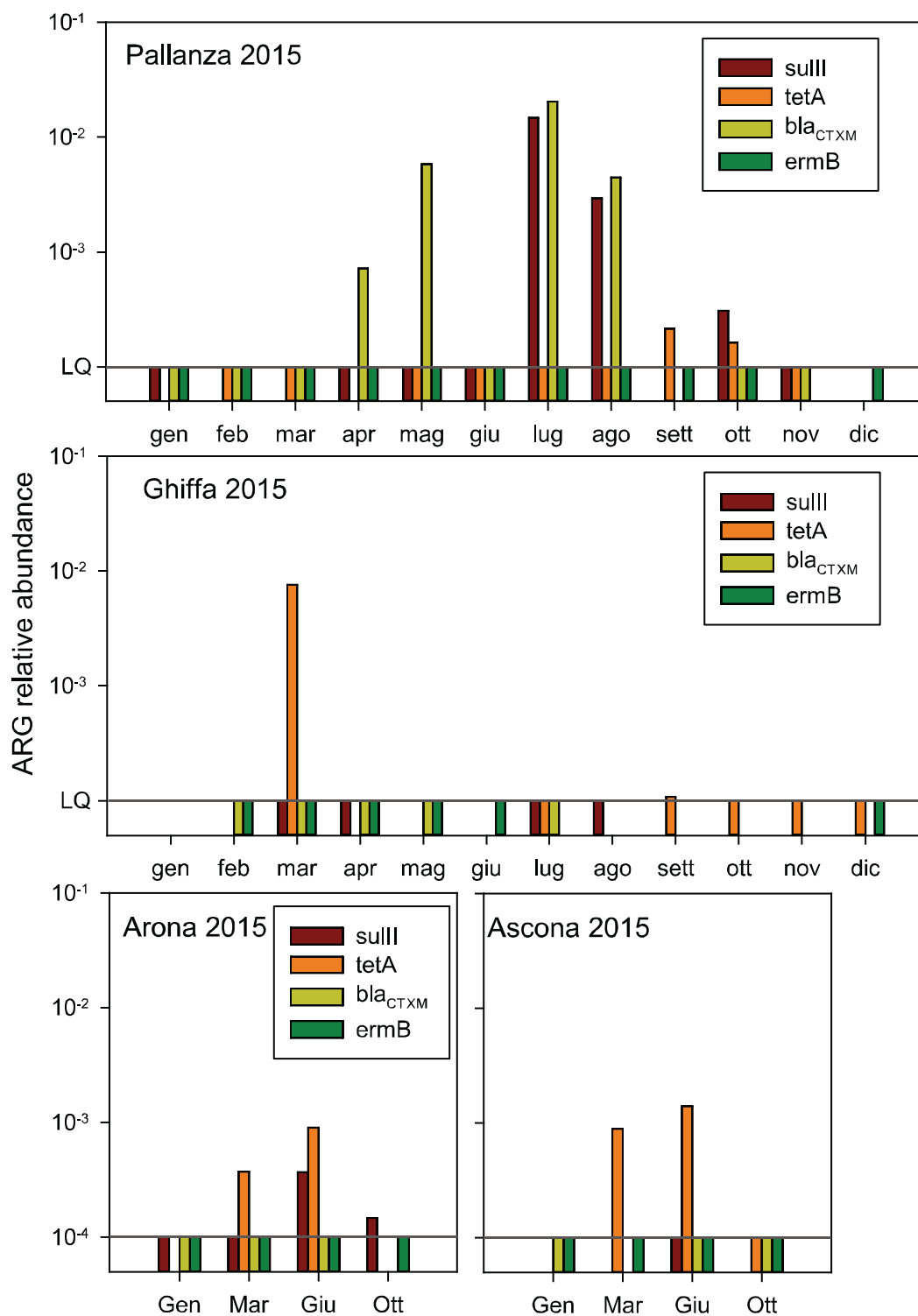


Fig. 6.2. Misura dell'incidenza dei diversi geni di resistenza nei popolamenti microbici del Lago Maggiore durante l'anno 2015.

Il gene ermB, quantificato per la prima volta nel 2015, ed indicatore di resistenza potenziale ai macrolidi, un altro gruppo di antibiotici di uso umano di grande importanza, risulta presente in tutte le stazioni, ma in quantità molto limitate, al di

sotto del limite di quantificazione. Per questo gene prevediamo ulteriori analisi nei prossimi anni.

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., V. Benes, J.A. Garson, J. Hellemans, J. Huggett, M. Kubista, R. Mueller, T. Nolan, M.W. Pfaffl, G.L. Shipley, J. Vandesompele & C.T. Wittwer. 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55:611–622.
- Czekalski N., T. Berthold, S. Caucci, A. Egli and H. Bürgmann. 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., E. Gascón Díez and H. Bürgmann. 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
- Di Cesare A., E.M. Eckert, S. D'Urso, R. Bertoni, D.C. Gillan, R. Wattiez and G. Corno. 2016. Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research*, 94: 208-214.
- 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. & H.W. Stokes. 1993. Integrons: novel DNA elements which capture genes by site-specific recombination. *Genetica*, 90: 115-132.
- Tribskorn R. & H. Hetzenauer. 2012. Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. *Environmental Sciences Europe*: 24.
- Tribskorn R., K. Amler, L. Blaha, C. Gallert, S. Giebner 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.