

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

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

La presenza nell'ambiente di batteri non patogeni resistenti agli antibiotici è un problema sanitario di primaria importanza. Questi batteri, non pericolosi per l'uomo, possono essere vettori di geni specifici per l'antibiotico resistenza e, quindi, possono indurre resistenza agli antibiotici in batteri patogeni alloctoni presenti nelle acque di 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. Questo il caso più grave perché vengono sviluppate resistenze ad antibiotici sintetici o semisintetici, utilizzati in ambito medico, ospedaliero e veterinario.

La nostra attività si è concentrata 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'EA Wag sul Lago di Ginevra (Progetto "Antibiotic resistance as an emerging environmental contaminant", Czekalski *et al.* 2012, 2014) e le 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 degli antibiotici dai reflui, come confermato dagli studi sugli efflussi del Depuratore di Losanna nel Lago di Ginevra (Czekalski *et al.* 2014).

I dati sull'utilizzo degli antibiotici, ancora oggi massivo (nell'ordine di 10^5 tonnellate per anno nella sola Svizzera, fonte FEDESA), confermano un costante calo nell'ultimo decennio in Canton Ticino e una situazione di consumi approssimativamente stabili nelle Regioni Piemonte e Lombardia (AIFA, 2009), sia nel settore medico che in quello veterinario. Tuttavia dati contrastanti arrivano da specifiche analisi sulle vendite, (negli ultimi anni effettuate anche attraverso il mercato elettronico spesso illegale) e da studi sulla presenza di batteri antibiotico resistenti negli ospedali così come nei prodotti agricoli e zootecnici. Per esempio la

presenza di *Staphylococcus aureus* 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). E' difficile conoscere il rapporto tra le quantità di antibiotici usati in medicina veterinaria ed umana a causa della scarsa affidabilità e coerenza 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. E' 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 mediato da organismi) 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 pressione antropica nella stagione estiva quando le rive in prossimità dei punti di campionamento delle acque sono ampiamente utilizzate per scopi ricreativi.

6.1 Valutazione della presenza di geni di antibiotico-resistenza (ABR)

L'attività periodica di campionamento nelle stazioni di Ghiffa e Pallanza si è svolta a partire da gennaio 2013 con cadenza mensile, mentre le stazioni di Arona ed Ascona sono state campionate 4 volte durante il 2013, 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 sedimento e quindi, quando necessario, campionando fino ad 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 rete da 10 µm per eliminare organismi di taglia superiore e successivamente i batteri sono stati concentrati su filtri Nucleopore con pori da 0.22 µm. Su 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 di tali geni nei vari campionamenti.

I protocolli di PCR utilizzati sono quelli standard per ciascun gene ed il risultato è stato valutato qualitativamente dopo aver fatto migrare elettroforeticamente il frammento in gel ed averlo evidenziato in fluorescenza (SybrGreen, Life Technologies). L'amplicone, ossia il frammento di DNA amplificato, è stato quindi visualizzato in gel attraverso un sistema GelDoc (Biorad). Soltanto 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 in questo primo 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). 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).

Tabella 6.1. Antibiotico resistenze testate nel Lago Maggiore, molecole correlate, e dati sul consumo in Italia (Rapporto EFSA e ECDC, 2011). *: percentuale sul totale utilizzato (valori riferiti al consumo totale che include il settore ospedaliero e 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 1</i> <i>sul 2</i> <i>bla CTX</i>
Beta-lattamici	63.25	Ospedaliero, cure di base. Bovini e suini.	<i>bla SHV</i> <i>bla TEM</i>
Fluorochinoloni	12.78	Ospedaliero. Pollame	<i>qnr S</i> <i>int 1</i>
---	---	---	---

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

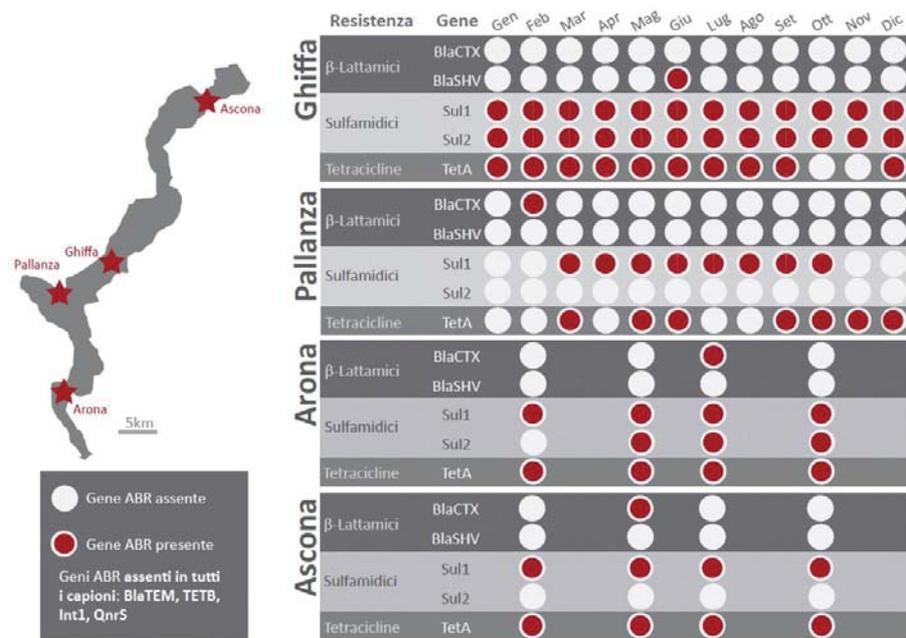


Figura 6.1. Presenza di geni di ABR nei vari siti campionati nell'anno 2013.

Per ogni campionamento e per ogni sito è stata trovata almeno una specifica ABR, indipendentemente dalla resistenza testata. Nel sito pelagico ad alta frequenza di campionamento di Ghiffa il 58.3% delle analisi ha riportato un risultato positivo per la ABR, percentuale che scende al 26,7% a Pallanza, per risalire al 45% ad Ascona ed al 60% ad Arona (siti litorali a bassa frequenza di campionamento ed elevato impatto antropico).

Nel dettaglio, ABR ad antibiotici beta-lattamici (i più utilizzati in ambito umano) sono stati riscontrati in campioni singoli nei 4 siti di riferimento (geni *bla*CTX e *bla*SHV) o sono risultati assenti nei popolamenti batterici del Lago (gene *bla*TEM). La loro presenza sporadica non sembra legata né a stagionalità né a particolari eventi climatici o di generale impatto sul Lago. Per questa ragione per il prossimo biennio si è pianificata una serie di analisi più dettagliata, inclusa una loro quantificazione.

I geni di resistenza ai sulfamidici sono invece stati riscontrati sia nei siti di monitoraggio mensile di Ghiffa (pelagico, presenti sia *sul1* che *sul2*) e di Pallanza (*sul1*, durante primavera, estate ed autunno) che in quelli a campionamento stagionale di Arona (sia *sul1* che *sul2*) e Ascona (solamente *sul1*). 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 utilizzati in casi molto particolari ed hanno un utilizzo molto limitato. L'impiego di sulfamidici in zootecnia è invece massivo, specialmente nel trattamento di bovini e altri grandi mammiferi ed in acquacoltura.

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 riscontrato in tutti i campioni prelevati a Arona ed Ascona, in 10 (su 12) campioni a Ghiffa ed in 7 campioni (su 12) a Pallanza, dove peraltro non è stato possibile determinare alcuna stagionalità. 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.

Tutti i campioni analizzati sono inoltre risultati negativi rispetto alla presenza di fluorochinoloni (*qnrS*) 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 abbiamo applicato analisi di qPCR (PCR quantitativa) al gene *tetA* di resistenza alle tetracicline, presente nella gran parte dei campioni analizzati.

6.2 Quantificazione dei geni di resistenza alle tetracicline

La quantificazione del gene *tetA* 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.*

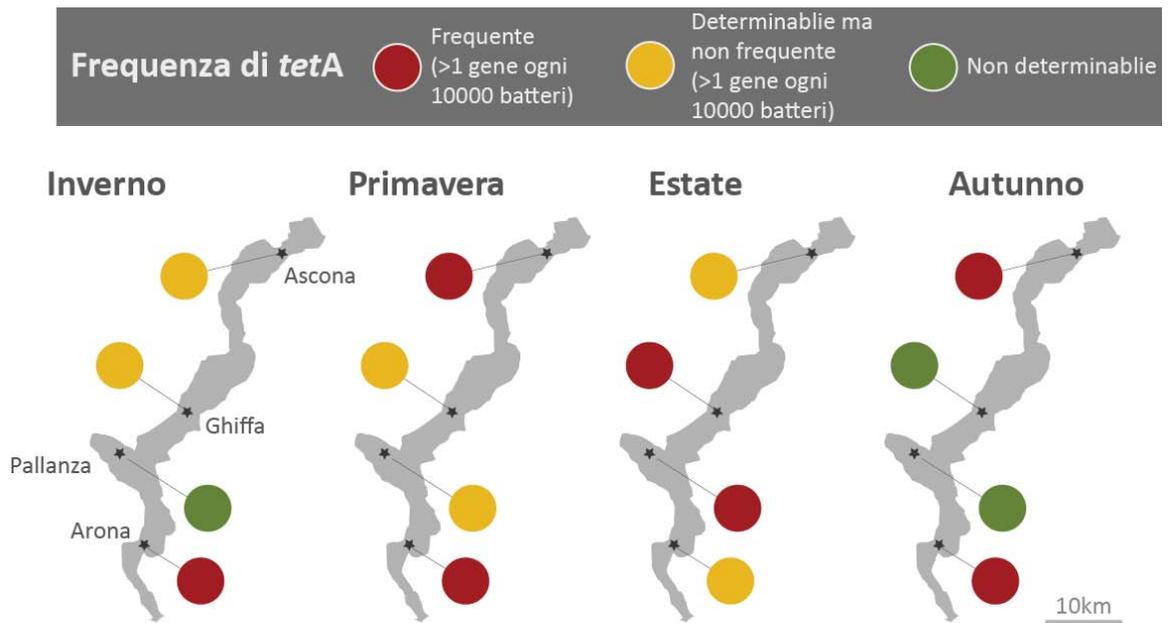
2009). Per le analisi è stato utilizzato un termociclatore Biorad CTX Connect, con chimica SSO Advanced (Biorad) in SybrGreen. I valori di amplificazione del gene *TetA* sono stati poi rapportati ai valori di amplificazione del gene 16S rRNA, gene conservativo delle cellule procariotiche che può essere considerato un proxy del numero totale di cellule batteriche.

I risultati ottenuti dimostrano la presenza in abbondanza significativa del gene *tetA* nei popolamenti batterici del Lago Maggiore, con concentrazioni che possono raggiungere i 10000 geni presenti per milione di cellule batteriche, che rapportato alle abbondanze batteriche medie nel Lago Maggiore si può grossolanamente tradurre in 10000 geni per millilitro. 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.

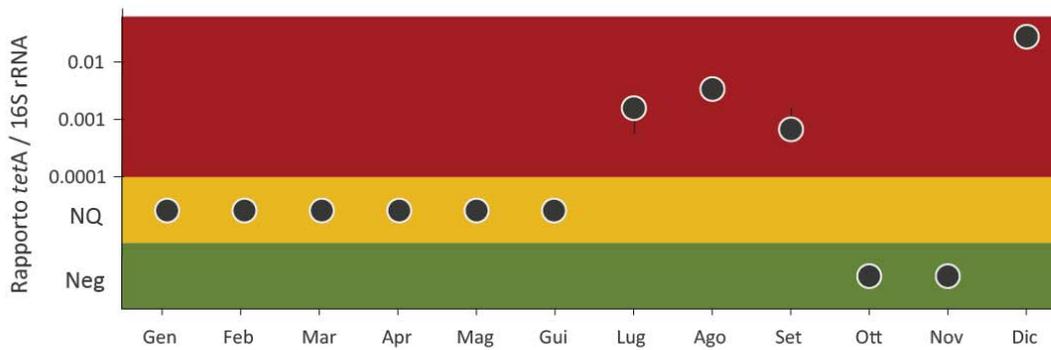
Il gene *tetA*, indicatore di resistenza alle tetracicline (Figura 6.2) è presente in tutti i siti monitorati, e la sua abbondanza è tale da renderlo quantificabile in poco meno della metà dei campioni. La situazione di Ghiffa è caratteristica con un picco estivo ben caratterizzato ed uno a dicembre 2013, con abbondanze relative molto importanti (30000 copie per milione di cellule). La situazione di Pallanza è più complessa, con differenze significative tra mese e mese ma senza una stagionalità statisticamente significativa. Il valore massimo rilevato al sito di Pallanza è di circa 11000 copie per milione.

Ad Ascona il gene *tetA* è stato riscontrato in tutti i campioni ma solo in due casi ha superato il limite soglia di quantificazione, con circa 4-5000 copie per milione. La situazione più grave di inquinamento da *tetA* è stata riscontrata alla stazione litorale di Arona, dove tutti i campioni sono risultati positivi e 3 su 4 quantificabili, con un picco assoluto di circa 100000 copie di *tetA* per milione nel febbraio del 2013.

I risultati presentati per il 2013, anno in cui abbiamo standardizzato i metodi di analisi e iniziato a valutare 9 geni di resistenza ed a quantificare il gene *tetA*, sono la base per lo sviluppo dell'indagine, che nel prossimo anno amplierà sia lo spettro di geni di resistenza testati (includendo nuovi geni di resistenza alle tetracicline: *tetM* e *tetW*, ai beta-lattamici: *blaOXA*; ed ai fluorochinoloni: *qnrA* e *qnrB*). Inoltre amplieremo le famiglie di antibiotici testate includendo gli aminoglicosidi (streptomicine: geni *strA* e *strB*) e macrolidi (eritromicine: gene *ermB*) in modo da definire un profilo delle resistenze indotte al massimo livello di dettaglio. Le analisi quantitative verranno ampliate a più geni quando necessario ed includeranno sicuramente tutti i geni a maggior diffusione; esse saranno estese anche al 2013 utilizzando il DNA estratto in precedenza e conservato nei laboratori del CNR-ISE.



Ghiffa



Pallanza

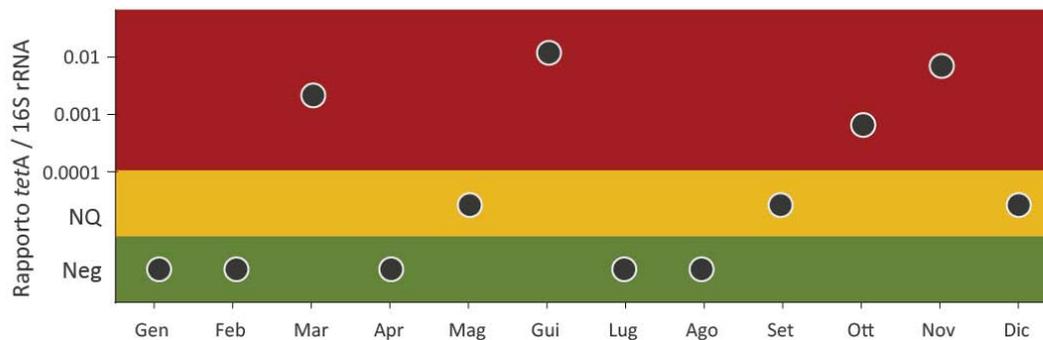


Figura 6.2. Misura dell'incidenza del gene *tetA* nei popolamenti microbici del Lago Maggiore.

In conclusione possiamo affermare che dalle analisi di questo primo anno di monitoraggio della presenza di antibiotico-resistenze nel Lago Maggiore emerge il quadro di un lago fortemente antropizzato, dove resistenze specifiche ad antibiotici sintetici sono presenti e diffuse. Questa situazione pur essendo lontana dall'essere ottimale non è ancora di emergenza ma sicuramente è di preallarme perché l'utilizzo delle acque del lago per fini diversi, dall'alimentare al ricreativo, è già elevato ed è destinato all'incremento nei prossimi anni. Questo avverrà presumibilmente in assenza di un adeguamento dei sistemi di depurazione e in presenza di un utilizzo di antibiotici che, seppur in lieve calo secondo le fonti ufficiali, è comunque ancora massiccio nel settore della salute umana e, soprattutto, in ambito agricolo e zootecnico.

Le criticità emerse in questo primo anno di indagine saranno valutate nel dettaglio nei prossimi anni. Saranno pure effettuate analisi mirate all'individuazione di possibili differenze stagionali e spaziali lungo la colonna d'acqua nella distribuzione di batteri antibiotico-resistenti.

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.
- Triebkorn R. & Hetzenauer H. 2012. Micropollutants in three tributaries of Lake Constance, Argen, Schussen and Seefelder Aach: a literature review. *Environmental Sciences Europe*: 24.
- Triebkorn 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.