

RESIDUI D'ANTIBIOTICI NELL'ACQUA: RIPERCUSSIONI BATTERIOLOGICHE

A. Demarta, A-R. Corvaglia, R. Peduzzi

Facoltà di scienze, Università di Ginevra, 1211 Ginevra 4

Prendendo lo spunto da una tesi effettuata presso l'Istituto cantonale di microbiologia e sostenuta all'Università di Ginevra (Corvaglia, 2006; Corvaglia et al., 2008), in questo contributo viene esaminato il ruolo dei residui d'antibiotici presenti nell'ambiente idrico nell'emergenza e la persistenza di batteri resistenti. Il lavoro di dottorato di ricerca è stato svolto nel quadro del Programma nazionale di ricerca PNR-49: "La résistance aux antibiotiques", finanziato dal Fondo Nazionale Svizzero per la Ricerca Scientifica (Fondo Nazionale, 2007).

Introduzione

Recentemente, non solo le riviste specializzate ma anche i quotidiani hanno messo in evidenza il problema dell'inquinamento dell'acqua da medicinali e gli effetti della presenza di residui farmaceutici nell'ecosistema idrico. Ad esempio, un articolo di sintesi apparso su *Le Monde* (Le Hir, 2009) evidenzia come nelle acque inquinate vengano rinvenute tracce di antibiotici, di anticancerogeni, d'analgesci, di antidepressivi, di anti-infiammatori, di anti-reumatici, di ormoni, di sostanze chimiche utilizzate contro il colesterolo e contro l'ipertensione che poi si trovano nelle acque superficiali (nei corsi d'acqua e nelle acque sotterranee) dove queste molecole, pur subendo una diluizione, non scompaiono e persistono per tempi più o meno lunghi. Attualmente è difficile trovare acque di superficie esenti da antibiotici al di fuori delle acque sorgive o dei ruscelli di montagna prima che questi scorrano attraverso zone urbanizzate o agricole (Zhang et al., 2009).

Frequentemente nelle acque inquinate siamo in presenza di un miscuglio di prodotti farmaceutici, a volte anche a delle concentrazioni elevate, ed i trattamenti che le acque reflue subiscono nelle stazioni di depurazione non si rilevano sempre efficaci per ottenerne la loro eliminazione: di conseguenza, queste sostanze possono raggiungere le acque di superficie e le acque sotterranee, due fonti fondamentali per l'approvvigionamento diretto o indiretto di acqua potabile per il consumo umano e animale (Ternes, 1998).

Questi inquinamenti non sono solo dovuti al rilascio da parte dell'industria chimica e farmaceutica o da allevamenti industriali di animali o da

piscicoltura (importanti consumatori di antibiotici e di ormoni di crescita), ma paradossalmente anche dal rilascio nei corpi idrici di acque reflue degli ospedali.

Le ripercussioni biologiche dei residui farmaceutici, in particolare degli antibiotici, sulla flora e la fauna degli ecosistemi idrici sono poco conosciute. E' però noto che la maggior parte degli antibiotici riversati nell'ambiente non subiscono modificazioni e l'impatto potenziale che questi residui possono avere sugli ecosistemi acquatici comincia a creare preoccupazioni (Zhang et al., 2009).

Oltre agli antibiotici, microrganismi patogeni e potenzialmente patogeni di origine umana e animale sono costantemente immessi nell'ambiente idrico attraverso le acque reflue (Ternes, 1998). Molti di questi batteri possiedono geni di resistenza agli antibiotici, magari anche inseriti in elementi genici trasferibili come plasmidi, trasposoni ed integroni, capaci di diffondersi tra le comunità microbiche acquatiche. L'acqua costituisce perciò non solo una via di disseminazione di microrganismi resistenti agli antibiotici, ma anche il mezzo con cui i geni di resistenza vengono introdotti negli ecosistemi batterici; in questi ambienti, i batteri non patogeni possono servire da serbatoio di geni e di strutture di resistenza (Baquero et al., 2008).

Nella maggior parte dei casi, i geni di resistenza agli antibiotici presenti nei batteri hanno avuto origine nel microbiota ambientale. Infatti, molti studi indicano che un determinante genico che contribuisce alla resistenza agli antibiotici in un batterio patogeno potrebbe essere coinvolto in un processo metabolico essenziale per batteri ambientali nel loro ecosistema naturale (resistenza intrinseca). In altre parole, la funzione primaria negli ecosistemi naturali di alcuni geni di resistenza (ad esempio enzimi metabolici o pompe ad efflusso) potrebbe non essere quella di impedire l'attività dell'antibiotico. Indipendentemente dalla loro funzione nell'ambiente, è chiaro che molti geni di resistenza agli antibiotici hanno avuto origine negli ecosistemi naturali e che cambiamenti in questi ecosistemi possono avere un impatto sulla resistenza globale agli antibiotici ed in definitiva sulla salute pubblica (Martinez, 2009).

Contrariamente alla resistenza intrinseca, sviluppatasi nelle popolazioni batteriche già prima dell'uso clinico degli antimicrobici, le resistenze agli antibiotici acquisite sono un evento recente nell'evoluzione dei microrganismi patogeni umani per il quale l'uso degli antibiotici rappresenta la principale forza selettiva. I batteri commensali possono avere la funzione di vettori nella trasmissione di geni di resistenza tra microrganismi ambientali e patogeni (Martinez, 2009).

Le acque superficiali non solo sono il ricettacolo di inquinanti d'origine farmaceutica, ma rappresentano contemporaneamente un ambiente dove viene esercitata una pressione selettiva sui ceppi batterici riguardo alla resistenza agli antibiotici.

Nel lavoro di tesi precedentemente citato erano stati studiati batteri appartenenti ai generi *Aeromonas*, *Acinetobacter* e *Legionella*. In questo contributo abbiamo voluto concentrarci sui generi *Aeromonas* e *Acinetobacter*, scelti per la loro larga diffusione nell'ambiente idrico, per il loro potere potenzialmente patogeno così come per il loro ciclo di trasmissione molto simile. Infatti i batteri del genere *Aeromonas* sono microrganismi di origine idrica che possono però sviluppare un certo grado di patogenicità per l'essere umano e per gli animali. Questi batteri sono stati associati prevalentemente ad infezioni intestinali e spesso vengono isolati nei laboratori di microbiologia clinica o veterinaria in associazione a batteri il cui potere patogeno è ben più riconosciuto come *Salmonella* e *Campylobacter*. A causa della loro ecologia, gli *Aeromonas* possono essere considerati sia come batteri patogeni che come patogeni opportunisti o commensali e possono venir isolati in diverse matrici (cliniche, alimentari, ambientali ed in particolare idriche). Anche gli *Acinetobacter* sono molto diffusi nell'ambiente e possono far parte della flora normale di individui sani. Alcune specie possono, però, causare delle gravi infezioni e presentare una resistenza ad un largo spettro di antibiotici, compresi beta-lattamici, aminoglicosidi e chinoloni (Peduzzi e Dolina, 2006).

Il ruolo che questo tipo di microrganismi potrebbe giocare come serbatoio di geni di resistenza sta diventando un importante oggetto di studio e di interesse (Allen et al., 2010).

Materiali e metodi

Campionamenti e messa in evidenza dei ceppi batterici

Per effettuare i prelievi sono state scelte 2 regioni con consumi diversi d'antibiotici: la città di Zurigo e il Canton Ticino (Filippini et al., 2006). I punti di campionamento sono stati selezionati in modo da poter ricostituire il circuito idrico dei residui d'antibiotico e dei batteri veicolati dall'acqua: acque reflue d'ospedale, acque reflue urbane in entrata e depurate in uscita delle stazioni di depurazione, fanghi attivi (fase biologica della depurazione) e acque di superficie come corsi d'acqua e laghi.

Per la ricerca e l'isolamento degli *Aeromonas*, i campioni d'acqua sono stati filtrati su membrane di 0.45 micron di porosità successivamente poste sul terreno selettivo m-*Aeromonas* Agar (Biolife). Le colonie tipiche appaiono dopo 18-24 ore d'incubazione a 30°C.

Gli *Acinetobacter* sono stati isolati dal terreno di coltura Herellea Agar (Jawad et al., 1994) dopo insemminazione diretta dei campioni o dopo filtrazione su membrana posta successivamente sul terreno selettivo. L'identificazione delle colonie con il fenotipo atteso dopo 18-24 ore d'incubazione a 30 °C è stata confermata con una galleria biochimica API 20

NE (bioMérieux) oppure tramite ibridazione *in situ* mediante una sonda specifica per il genere tassonomico.

Determinazione dei profili fenotipici di resistenza

La determinazione del profilo fenotipico di resistenza ai diversi antibiotici è stata effettuata su di un totale di 807 *Aeromonas* e 466 *Acinetobacter*.

Gli antibiogrammi sono stati effettuati secondo le norme del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009) e comprendevano gli antibiotici seguenti: ampicillina, imipenem, cefazolina, cefuroxina, ceftriaxone, cefepim, acido nalidixico, ciprofloxacina, norfloxacina, eritromicina e claritromicina (Figura 1).

I valori delle concentrazioni minime inibitrici (CMI) sono stati ottenuti tramite E-test (bioMérieux).

Figura 1: Lettura dell'antibiogramma



Ibridazione *in situ*

La tecnica dell'ibridazione *in situ* (Amann et al., 1990), è stata utilizzata per confermare l'identificazione a livello di genere delle colonie sospette di *Acinetobacter* e per effettuare il conteggio totale delle cellule di *Aeromonas* e *Acinetobacter* presenti nei diversi ambienti idrici presi in considerazione.

Dopo filtrazione e fissazione dei campioni, delle sonde oligonucleotidiche specifiche per i 2 generi batterici considerati marcate con un fluorocromo (Cy3) vengono fatte ibridare alle sequenze nucleotidiche complementari presenti nelle cellule batteriche adese ad un vetrino porta oggetti.

Grazie alla complementarità tra la sonda e la sequenza bersaglio presente sul 16S rRNA del batterio, sono messi in evidenza, tramite il microscopio a fluorescenza, solo i batteri che reagiscono con la sonda specifica.

Messa in evidenza di integroni della classe I in *Aeromonas*

Il DNA totale è stato estratto dopo lisi delle cellule batteriche (100°C per 10 min.). Il lisato è poi stato utilizzato per delle reazioni PCR dove sono stati amplificati i geni per l'integrasi e la regione variabile inserita negli integroni di classe I (Recchia e Hall, 1997).

Risultati e discussione

Il profilo fenotipico di resistenza nei diversi ambienti idrici

L'analisi del profilo di resistenza agli antibiotici dei ceppi di *Aeromonas* ha mostrato una percentuale elevata di stipti resistenti soprattutto nei campionamenti effettuati nelle acque reflue ospedaliere e nella fase biologica (fanghi attivati) delle stazioni di depurazione. Al contrario, i ceppi isolati da pazienti risultano essere particolarmente sensibili a tutti gli antibiotici testati ad eccezione dell'ampicillina, verso cui gli *Aeromonas* mostrano una resistenza costante intrinseca. Le acque depurate in uscita dalle stazioni di depurazione contengono ancora *Aeromonas* resistenti in percentuale maggiore a quella che ha potuto essere messa in evidenza in laghi e fiumi (Grafici 1 e 2). Per quanto concerne questi microrganismi è stato possibile osservare che la percentuale di ceppi resistenti presenti nei campioni è correlabile alla qualità dell'acqua ed in particolare al suo contenuto in sostanza organica. Le acque reflue d'ospedale contribuiscono alla disseminazione di ceppi fenotipicamente più resistenti che, convogliati alle stazioni di depurazione, raggiungono poi le acque di superficie dove, per effetto di diluizione, la percentuale di stipti resistenti diminuisce.

Grafico 1: Percentuale di ceppi di *Aeromonas* isolati da ambienti idrici e da materiali clinici resistenti, intermedi o sensibili alla Cefuroxima, una cefalosporina di seconda generazione

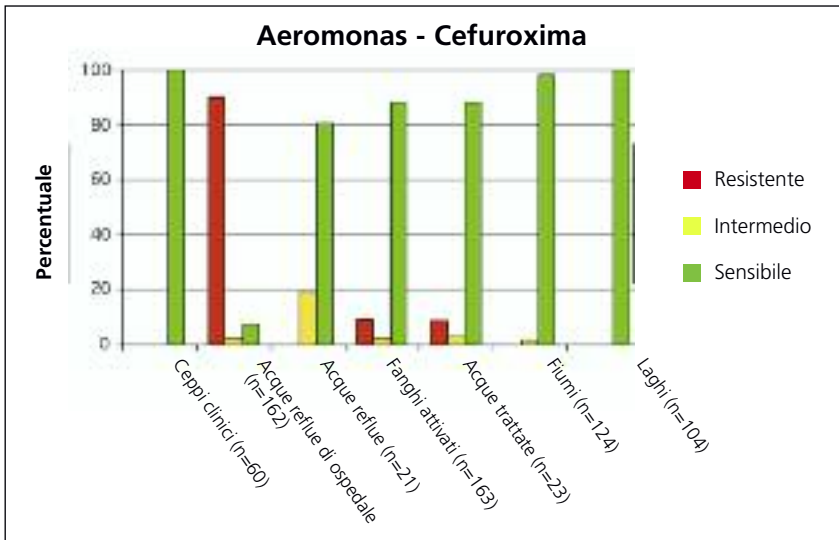
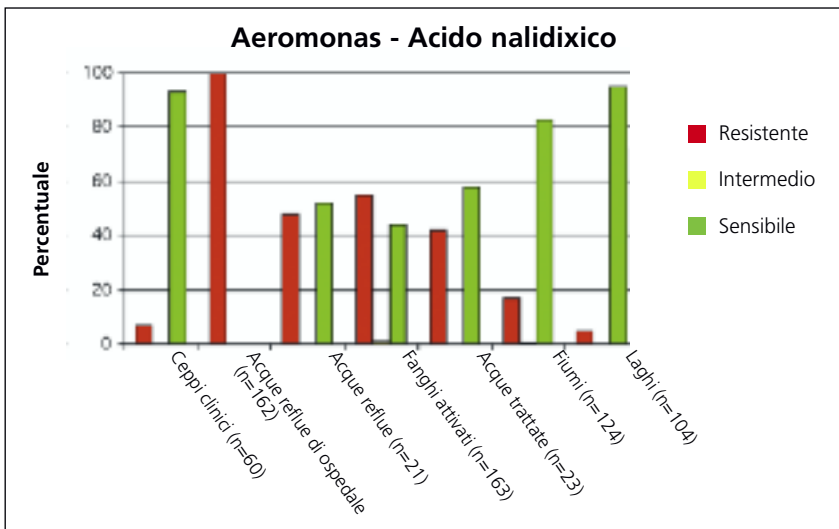
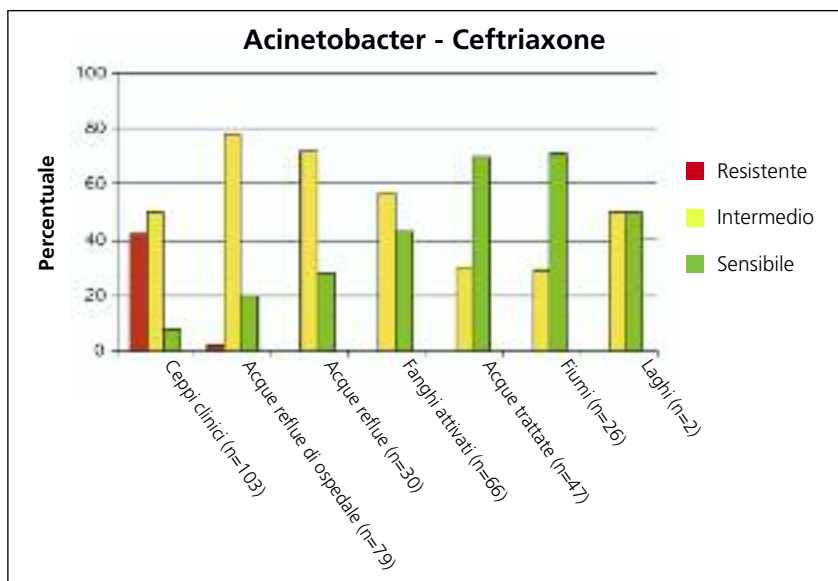


Grafico 2: Percentuale di ceppi di *Aeromonas* isolati da ambienti idrici e da materiali clinici resistenti, intermedi o sensibili all'Acido nalidixico, agente antimicrobico capostipite della classe dei chinoloni.



Contrariamente alle osservazioni fatte per gli *Aeromonas*, i batteri del genere *Acinetobacter* presentano dei tassi di resistenza agli antibiotici meno elevati negli stipti di origine acquatica in confronto a ceppi clinici, isolati da materiali patologici (Grafico 3). In questi batteri, la percentuale maggiore di stipti resistenti o a resistenza intermedia agli antibiotici è stata osservata nei campioni clinici seguiti dai campioni di acque reflue ospedaliere. La proporzione di stipti sensibili aumenta parallelamente alla diminuzione del carico organico presente nelle acque analizzate. Come per gli *Aeromonas*, anche per questo genere batterico le acque reflue ospedaliere e le stazioni di depurazioni rappresentano la via d'ingresso di stipti resistenti nelle acque di superficie.

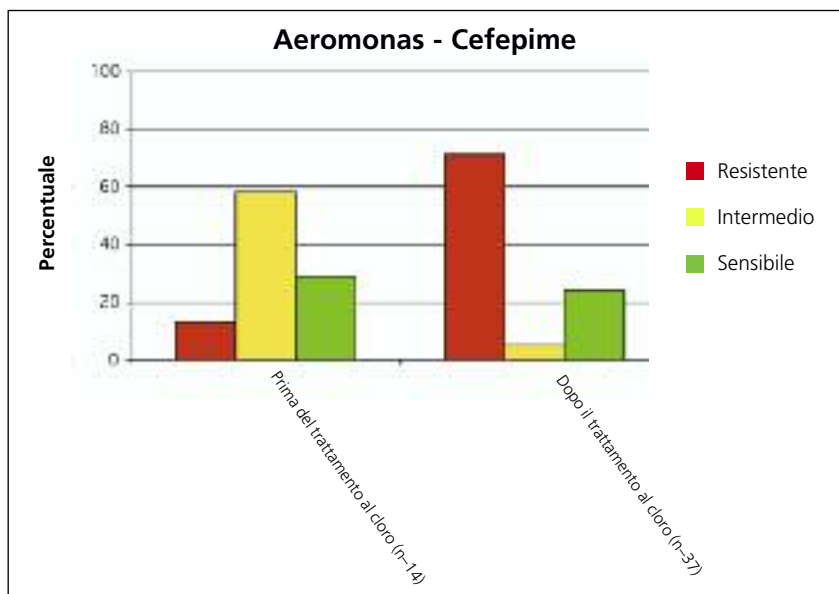
Grafico 3: Percentuale di ceppi di *Acinetobacter* isolati da ambienti idrici e da materiali clinici resistenti, intermedi o sensibili al Ceftriaxone, una cefalosporina di terza generazione



La disinfezione delle acque reflue è una misura atta a ridurre la carica microbica. In uno degli ospedali considerati nello studio, le acque reflue ospedaliere sono disinfettate al cloro prima di essere immesse nella rete fognaria. Tramite ibridazione "in situ" con sonde specifiche per il genere *Aeromonas* è stato possibile verificare che il trattamento subito permetteva di dimezzare il numero di cellule di *Aeromonas* (da $1 \cdot 10^4$ cellule/ml a $6 \cdot 10^3$ cellule/ml). D'altra parte, il profilo fenotipico di resistenza agli antibiotici di questi ceppi mostrava un aumento di resistenti agli anti-

biotici a seguito di questo trattamento (Grafico 4). In un lavoro del 1984 (Murray et al. 1984) era già stato segnalato l'aumento della resistenza ad alcuni beta-lattamici osservabile nelle popolazioni batteriche presenti nelle acque delle stazioni di depurazione che subivano un trattamento al cloro.

Grafico 4: Percentuali di ceppi di *Aeromonas* resistenti, intermedi e sensibili al Cefepime, una cefalosporina di 4° generazione, in campioni di acque reflue ospedaliere prima e dopo trattamento di disinfezione al cloro.



In alcuni campioni delle acque che sono state analizzate, è stato possibile determinare la concentrazione di ciprofloxacina e norfloxacina (antibiotici della classe dei fluorochinoloni) grazie alle analisi effettuate all'EAWAG (acronimo tedesco di: Istituto Federale per l'approvvigionamento, la depurazione e la protezione delle acque. Scuole Politecniche Federali, Dübendorf-Zurigo, Svizzera) dal gruppo del Prof. Dr. Giger. Il profilo di resistenza di *Aeromonas* e *Acinetobacter* isolati dagli stessi campioni ha potuto perciò essere messo in relazione ai valori di concentrazione di ciprofloxacina e norfloxacina. E' stato dunque possibile osservare che più la concentrazione di antibiotico nell'acqua era elevata, minore era la sensibilità fenotipica allo stesso antibiotico osservata nei ceppi di *Acinetobacter* e di *Aeromonas*. I residui antibiotici che si trova-

no nelle acque reflue non raggiungono mai concentrazioni elevate paragonabili a quelle necessarie per ottenere una inibizione della crescita batterica. Ad esempio, la concentrazione massima di ciprofloxacina rilevata nelle acque reflue di un ospedale di Zurigo è stata di 13 µg/L mentre la concentrazione minima inibitrice (CMI) per un batterio Gram negativo in vitro è circa 80 volte più elevata. Nelle acque ambientali quindi, malgrado gli antibiotici raggiungano solo concentrazioni molto basse e sub-inibitrici, è stato possibile osservare una variazione del profilo fenotipico verso la resistenza sia negli *Acinetobacter*, batteri che hanno l'identica origine ospedaliera degli antibiotici reperibili nelle acque reflue, che negli *Aeromonas*, batteri ubiquitari nell'ambiente idrico e con un potere patogeno per l'uomo che solo raramente necessita un'ospedalizzazione.

Il tempo di esposizione a concentrazioni sub-inibitrici di antibiotico riveste pure un ruolo rilevante. Nello studio, stipiti sensibili di *Acinetobacter* e di *Aeromonas* sono stati esposti a concentrazioni sub-inibitrici di antibiotici e per tempi crescenti ottenendo varianti batteriche più resistenti a queste basse concentrazioni. I fenotipi ottenuti erano stabili *in vitro* facendo quindi pensare che il costo energetico indotto da questo stress fosse tollerabile per i batteri che mantenevano quindi le nuove caratteristiche acquisite.

I meccanismi che portano allo sviluppo ed alla trasmissione di resistenze agli antibiotici dovuti all'esposizione dei batteri a concentrazioni sub-inibitrici di antibiotici non sono ancora del tutto chiari, ma indagini recenti indicano che l'esposizione di microrganismi a concentrazioni inferiori alla CMI (concentrazione minima inibitrice) di diversi antibiotici cambia l'espressione di molte proteine, in particolare quelle in relazione alla risposta SOS, ed aumenta sia la frequenza di mutazione che di trasformazione facilitando perciò l'insorgenza delle resistenze (Wang et al., 2010). Nell'ambiente idrico, ed in particolare dove esiste una grande e numerosa biodiversità microbica, lo scambio di determinanti genetici di resistenza tra ceppi batterici potrebbe inoltre essere favorito (Szczepanowski et al. 2004; De Gelder et al. 2005).

I residui di antibiotici presenti nell'ambiente idrico potrebbero perciò contribuire fortemente al mantenimento, all'emergenza ed alla disseminazione di popolazioni batteriche che pur presentando un debole livello di resistenza, sono pronte ad evolvere verso una resistenza successiva e maggiore.

Profilo genotipico di resistenza nei diversi ambienti idrici

I geni di resistenza agli antibiotici possono essere presenti nei batteri resistenti in diverse strutture quali sequenze di inserzione, trasposoni, plasmidi coniugativi e integroni. Questi ultimi elementi hanno la capacità di riconoscere, integrare ed esprimere geni di origine esogena. Si conoscono attualmente almeno 5 classi di integroni mobili; gli integroni della

classe I sono i più frequenti, giocano un ruolo principale nella disseminazione dei geni di resistenza agli antibiotici nei batteri Gram negativi (Poirel e Nordmann, 2002; Mazel, 2006) e sono la maggioranza degli integroni trovati nei ceppi di origine clinica (Rosser e Young, 1999).

Gli integroni della classe I sono stati indagati tramite PCR in 493 stipiti di *Aeromonas* isolati dai diversi ambienti considerati nello studio. Il 40.8 % del totale dei ceppi possedeva strutture compatibili con la presenza di integroni della classe I. In dettaglio, queste strutture sono state individuate nel 55.4 % dei ceppi isolati dalle acque reflue degli ospedali (n = 143), nel 35 % dei ceppi isolati dalle acque reflue urbane (n = 21), nel 60 % di quelli isolati dai fanghi attivati di stazioni di depurazione (n = 136), nel 52 % degli stipiti isolati da acque trattate (n = 23), nel 20 % dei ceppi isolati da acque di fiume (n = 102) e nel 11.5 % degli stipiti provenienti da acque di lago (n = 68). Nel complesso, circa il 30 % di tutti gli integroni messi in evidenza conteneva almeno un gene di resistenza agli antibiotici.

In uno studio più recente, alcuni stipiti sono stati indagati in modo più approfondito con l'intento di caratterizzare i geni di resistenza presenti negli integroni individuati (Tigano, 2007). In un campione di 53 ceppi di *Aeromonas*, i geni di resistenza più frequentemente identificati sono stati quelli che conferiscono resistenza agli aminoglicosidi, al trimethoprim ed ai beta-lattamici. In questo campione, è stato possibile identificare insieme di cassette geniche diverse con combinazioni di geni non ancora descritte in letteratura e insieme di cassette geniche già conosciute e presenti in batteri quali *E. coli*, *Salmonella typhimurium* e *Citrobacter sp.*. Gli *Aeromonas* potrebbero quindi rappresentare un modello di batteri commensali capaci di agire da vettori per la trasmissione di geni di resistenza tra microrganismi ambientali e microrganismi patogeni.

Conclusioni

La problematica delle resistenze agli antibiotici, in particolare nei microrganismi patogeni, è da tempo una preoccupazione del microbiologo e del medico infettivologo. Il nostro servizio batteriologia medica si è regolarmente occupato di questo tema dando riscontro all'utenza clinica (Peduzzi, 1980; Peduzzi et al., 1983; Gaia et al., 1998, Dolina e Peduzzi, 1999) (Figura 1).

Questo studio esamina i batteri patogeni e potenzialmente patogeni di origine umana ed animale immessi tramite le acque reflue nell'ambiente acquatico. Molti di questi organismi possiedono dei geni di resistenza agli antibiotici, che possono anche essere inseriti su strutture geniche mobili capaci di diffondersi nella comunità batterica dell'acqua e del suolo. In questi ecosistemi, i batteri non patogeni servono da serbatoio

per geni di resistenza e per strutture geniche mobili; l'ambiente è quindi da considerare come un enorme serbatoio di microrganismi resistenti e di geni di resistenza chiamato "resistoma" (Wright, 2007). L'immissione ed il progressivo accumulo di inquinanti nell'acqua contribuisce all'evolversi ed alla diffusione di organismi resistenti poiché il "resistoma" è in grado di rispondere molto rapidamente agli influssi esterni (Baquero et al., 2008). Lo studio della resistenza agli antibiotici negli organismi di origine idrica è quindi importante perché è un ulteriore segnale del grado di alterazione dell'ecosistema idrico dovuto alle attività umane (Baquero et al. 2008).

L'ambiente idrico come ad esempio le acque reflue degli ospedali, le acque inquinate all'entrata delle stazioni di depurazione o i fanghi attivi della fase biologica delle stazioni di depurazione possono contenere e concentrare un numero importante di sostanze chimiche e tossiche (residui di antibiotici, residui d'altre sostanze farmaceutiche, metalli pesanti, ecc.). L'insieme di queste sostanze esercitano sui microrganismi una serie di influssi per lo più avversi. Le pressioni di selezione multiple che esistono in questi ambienti possono però anche favorire l'insorgenza, lo sviluppo e la disseminazione di popolazioni batteriche fenotipicamente e/o genotipicamente meno sensibili agli antibiotici o pronti a sviluppare resistenze. Contrariamente alla resistenza intrinseca delle popolazioni batteriche, che è stata sviluppata evolutivamente ben prima dell'uso degli antibiotici, la resistenza acquisita agli antibiotici è un evento recente nella storia evolutiva dei microrganismi patogeni umani e l'uso degli antibiotici rappresenta la principale forza di selezione della resistenza (Martinez, 2009).

L'incremento nelle popolazioni batteriche ambientali di strutture genetiche che contengono geni di resistenza agli antibiotici come conseguenza dell'uso (recente in termini evolutivi) degli antibiotici in diversi ambiti (clinico, veterinario e agricolo) sta accelerando l'evolversi e la diffusione delle resistenze tra le popolazioni microbiche, incluse quelle dei patogeni. Benché sia ancora ignoto se queste alterazioni possano persistere nel tempo, è chiaro che gli antibiotici ed altri farmaci sono degradati nell'ambiente in tempi più o meno lunghi mentre le strutture genetiche che contengono geni di resistenza sono generalmente elementi auto-replicanti che possono inoltre essere stabili (Martinez, 2009).

Un trattamento adeguato delle acque inquinate rilasciate dagli ospedali che permetta da una parte l'inattivazione chimica dei residui di antibiotici attivi e di altre sostanze farmaceutiche e d'altra parte l'eliminazione di un grande numero di batteri presenti in questi ambienti, potrebbe rappresentare una misura utile e preventiva non solo per contenere gli insuccessi terapeutici dovuti alla resistenza, ma anche per contenere i costi della salute preservando il nostro ambiente acquatico.

Parole chiave

residui di antibiotici, ambienti acquatici, batteri resistenti, *Aeromonas*, *Acinetobacter*

Bibliografia

Allen H., Donato J., Wang H., Cloud-Hansen K., Davies J., Handelsmann J. – Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*. 8 (4): 251-259, 2010.

Amann R., Krumholz L., Stahl D. – Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *Journal of Bacteriology*. 172 (2): 762-770, 1990.

Baquero F., JL Martinez, R. Canton – Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Current Opinion in Biotechnology*. 19 (3): 260-265, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute - M02-A10: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Tenth Edition. 26 (1), Wayne, PA 19087 (USA), 2009.

Corvaglia A.R. – Rôle des résidus d'antibiotiques dans l'environnement hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*. Thèse n. 3796. Faculté des Sciences, Université de Genève, 2006.

Corvaglia A.R., A. Demarta, V. Gaia, R. Peduzzi – Rôle des résidus d'antibiotiques dans l'environnement hydrique sur la sélection et la diffusion de bactéries résistantes des genres *Aeromonas*, *Acinetobacter* et *Legionella*. *Archives des Sciences*, 61 :89-100, 2008.

De Gelder L., F. Bandecasteele, C. Brown, L. Forney, E. Top – Plasmid donor affects host range of promiscuous incP-1beta plasmid pB10 in an activated-sludge microbial community. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 5309-5317, 2005.

Dolina M., R. Peduzzi – Resistenza agli antibiotici di ceppi batterici d'origine ospedaliera in Ticino. *Tribuna Medica Ticinese*, 64 (12), 709-711, 1999.

Filippini M., G. Masiero, K. Moschetti – Socioeconomic determinants of regional differences in outpatient antibiotic consumption: evidence from

Switzerland. Health Policy. 78 (1): 77-92, 2006.

Fondo Nazionale Svizzero per la ricerca scientifica – PNR 49 Résistance aux antibiotiques, Rapport final, Berne, 2007.

Gaia V., F. Baggi, R. Peduzzi – Studio della diffusione in Ticino di cloni di *Staphylococcus aureus* meticillino-resistenti (MRSA) mediante “ribotyping”. Tribuna Medica Ticinese, 63 (1), 30-32, 1998.

Jawad A., P. Hawkey, J. Heritage, A. Snelling – Description of Leeds *Acinetobacter* Medium, a new selective and differential medium for isolation of clinically important *Acinetobacter spp.*, and comparison with Herellea agar and Holton’s agar. Journal of Clinical Microbiology. 32:2353-2358, 1994.

Le Hir P. – L’alarmante pollution de l’eau par les médicaments. Le Monde, 3 février 2009.

Martinez JL. – The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. Proceeding. Biological Sciences. 276 (1667): 2521-2530, 2009.

Mazel D. – Integrons: agents of bacterial evolution. Nature Reviews Microbiology. 4: 608-620, 2006.

Murray GE., RS. Tobin, B. Junkins, DJ. Kushner – Effect of chlorination on antibiotics resistance profiles of sewage-related bacteria. Applied and Environmental Microbiology. 48: 73-77, 1984.

Peduzzi R. – Rassegna delle principali tematiche connesse con il problema della resistenza batterica agli antibiotici. Rivista medica della Svizzera Italiana. 278-291, 1980.

Peduzzi R., P. Boscolo, J.C. Piffaretti – Sensibilité aux céphalosporines de 1300 souches bactériennes provenant de dix hôpitaux tessinois. Tribuna Medica Ticinese. 48 (6), 259-262, 1983.

Peduzzi R., M. Dolina – Patologie microbiche d’origine idrica il caso del genere batterico *Acinetobacter*. Tribuna Medica Ticinese. 71 (10), 291-293, 2006.

Poirel L., Nordmann P. – Acquired carbapenem-hydrolysing beta-lactamases and their genetic support. Current Pharmaceutical Biotechnology. 3: 117-127, 2002.

Recchia G.D., R.M. Hall – Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. *Trends Microbiology Review*. 5: 389-394, 1997.

Rosser S.J., Young H.K. – Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from aquatic environment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 44: 11-18, 1999.

Szczepanowski R., I. Krahn, B. Linke, A. Goesmann, A. Puhler, A. Schuler – Antibiotic multiresistance plasmid pRSB101 isolated from a wastewater treatment plant is related to plasmids residing in phytopathogenic bacteria and carries eight different resistance determinants including a multidrug transport system. *Microbiology*. 150 (11): 3613-3630, 2004.

Ternes T.A. – Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research*. 32 : 3245-3600, 1998.

Tigano M. – Integroni di classe 1 e resistenze ad antibiotici in stipiti di *Aeromonas sp.*. Tesi di laurea, Università degli studi di Parma – Facoltà di scienze matematiche, fisiche e naturali – Corso di laurea in biotecnologie. 2007.

Wang P., Zhang X.X., Wang L., Zhen Z., Tang M., Li J. Subinhibitory concentrations of ciprofloxacin induce SOS response and mutations of antibiotic resistance in bacteria. *Annals of Microbiology*. 60:511-517, 2010.

Wright G.D. – The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*. 5 (3): 175-186, 2007.

Zhang X.X., T. Zhang, H.H. Fang – Antibiotic resistance genes in water environment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 82 (3): 397-414, 2009.

Articolo ripreso da *Tribuna Medica Ticinese*, aprile 2011

Lugano, aprile 2011

Prof. Dr. Raffaele Peduzzi
FAMH in Microbiologia medica
Vice presidente Lega Polmonare
Via alla Campagna 9, 6900 Lugano