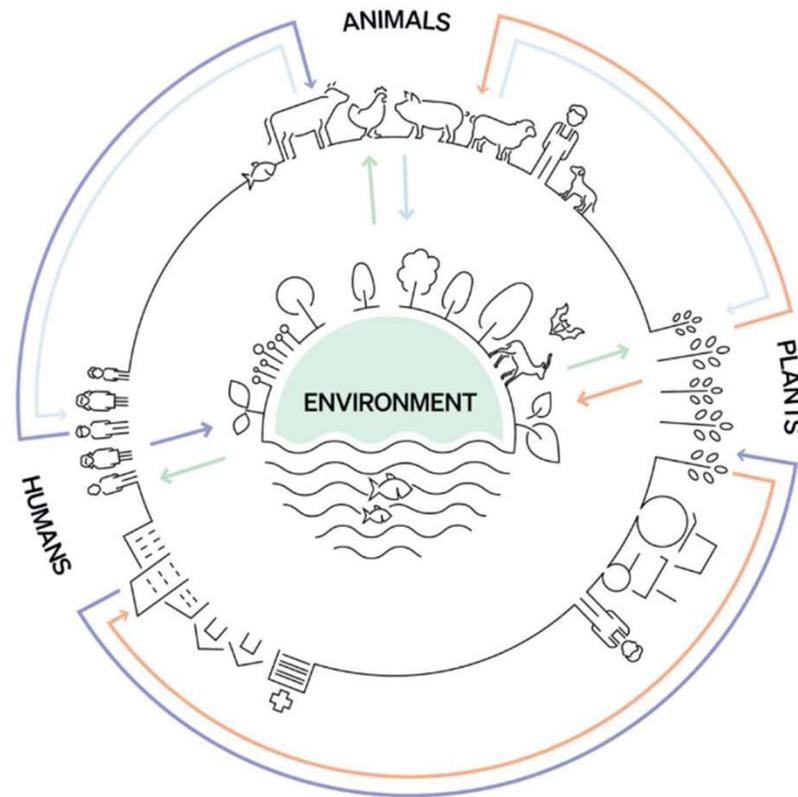


An aerial photograph of a wastewater treatment plant. Two large, circular clarifiers are visible, each with a central rotating mechanism. The water in the tanks is dark grey. The surrounding area includes paved roads, green grass, and some industrial buildings in the background.

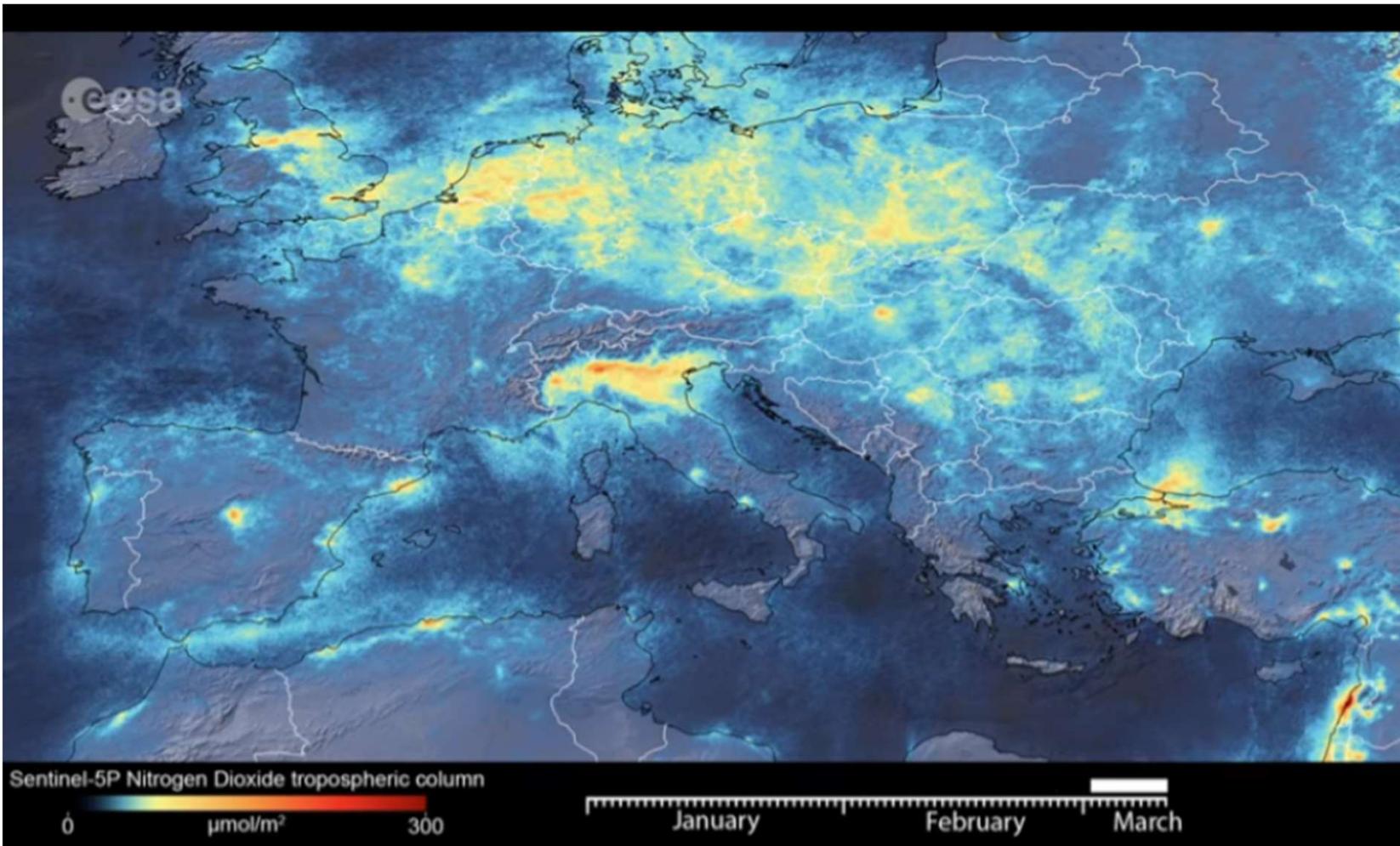
La resistenza antimicrobica e l'ambiente: i nuovi approcci alla sorveglianza dell'AMR previsti dal PNCAR 2022-2025

Fabrizio Agnoletti – IZSve

Concetto di One Health - Planetary Health



<https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>



Oltre 50.000 morti/anno in Italia causate dall'inquinamento atmosferico

AMR e ambiente

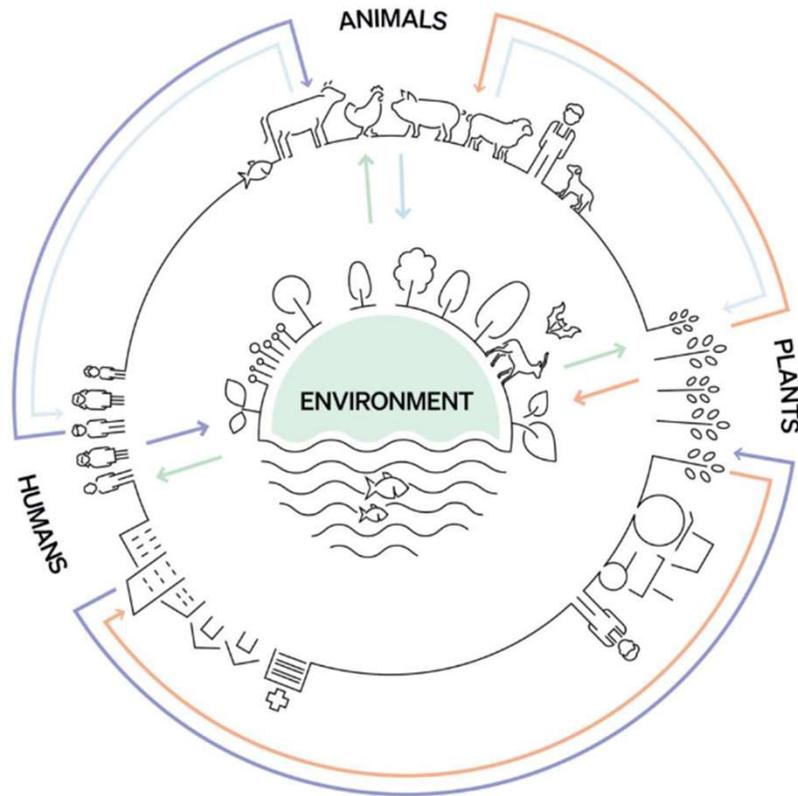
UN 
environment
programme

Bracing for Superbugs

Strengthening environmental action
in the One Health response to
antimicrobial resistance



Concetto di One Health/Planetary Health e AMR



necessità di chiarire se
e come l'agricoltura
contribuisce alla
problematica AMR

<https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>

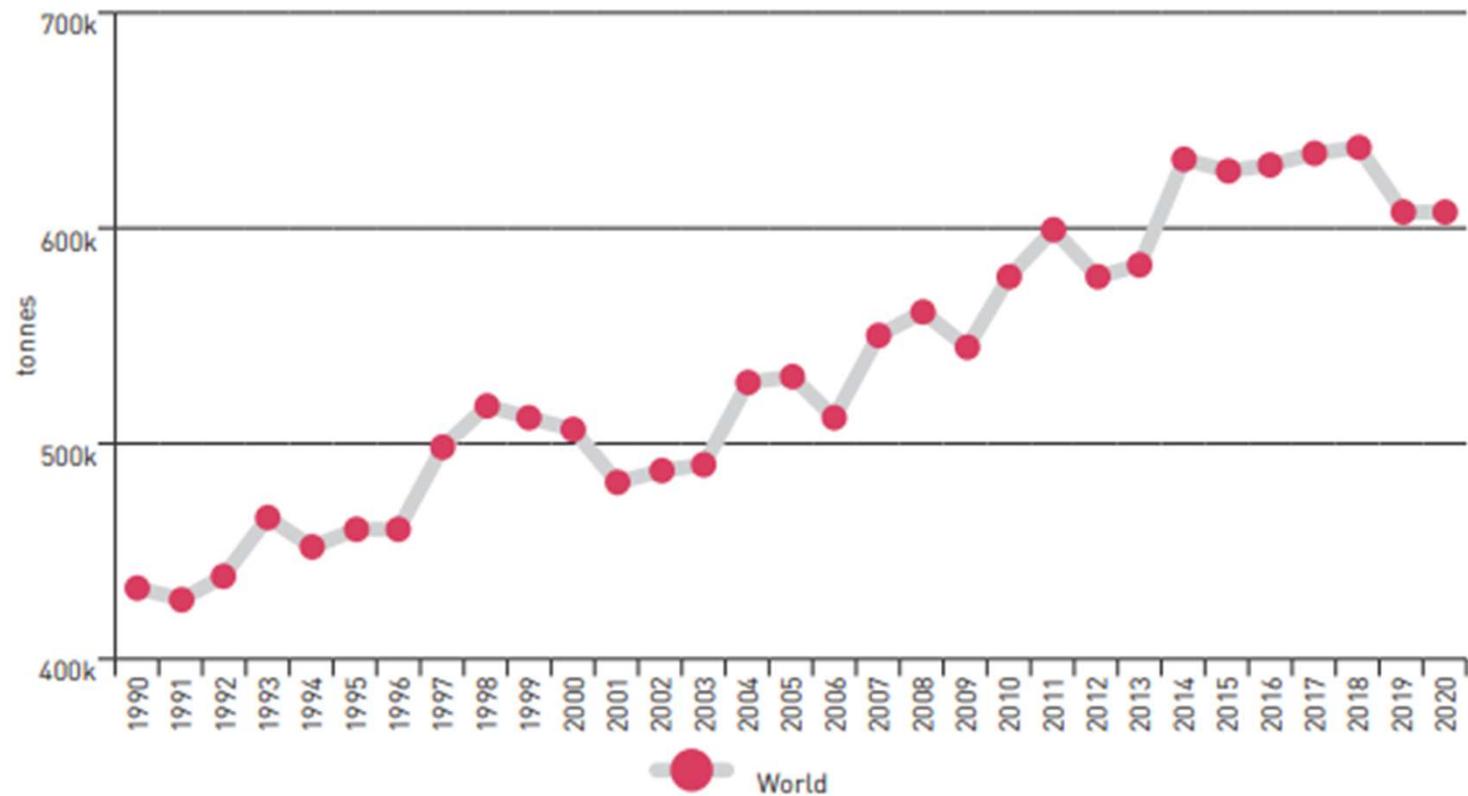
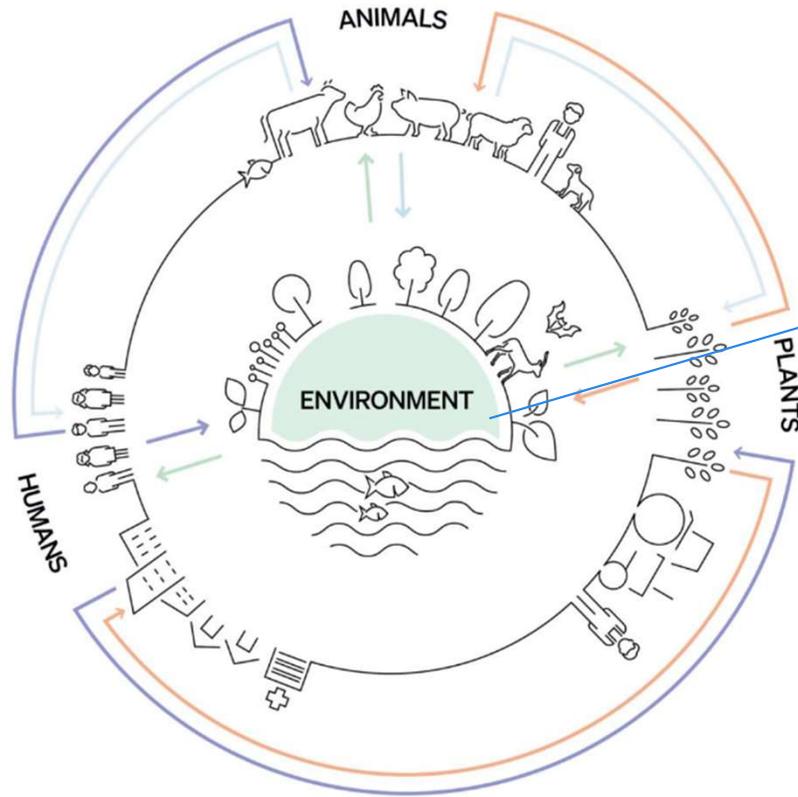


Figure 16

Trend in fungicide and bactericide use in agriculture (FAO 2022a)

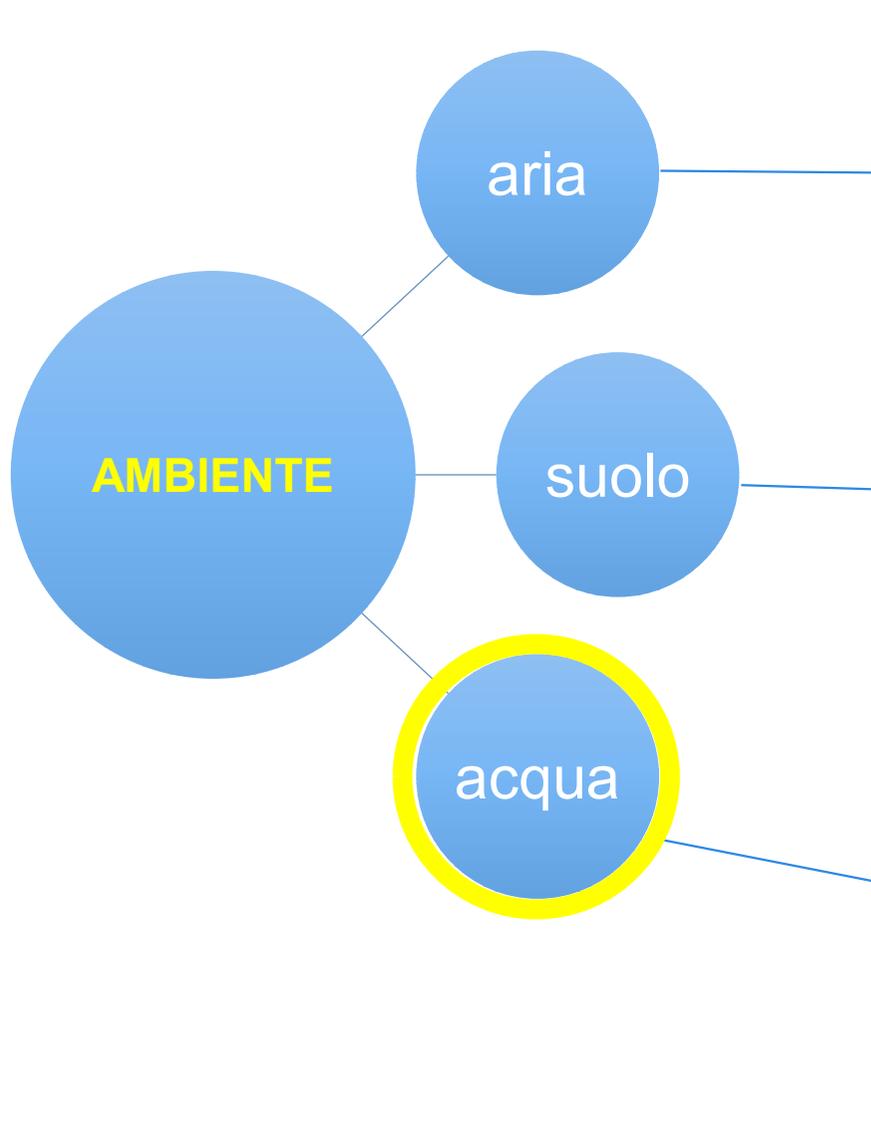
Bracing for superbugs, UN 2023

Concetto di One Health/Planetary Health e AMR



definire e
contestualizzare il
concetto di ambiente

<https://www.woah.org/en/what-we-do/global-initiatives/one-health/>



MRSA: contaminazione aria indoor negli allevamenti suini; contaminazione aerogena dei terreni circostanti i capannoni; aria impianti depurazione ...

discariche urbane (hot spot AMR); contaminazione dei terreni agricoli mediante fertirrigazione e utilizzo agronomico dei fanghi di depurazione..

contaminazione corpi idrici superficiali mediante acque reflue urbane; contaminazione acque ad opera allevamenti ittici; contaminazione acque ad opera del dilavamento dei terreni agricoli concimati..



PER UN USO CONSAPEVOLE
**ANTIBIOTICI
EFFICACI**

Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025



Piano Nazionale di Contrasto all'Antibiotico-Resistenza (PNCAR) 2022-2025

Sommario

Acronimi	pag. 3
Glossario	pag. 6
Riassunto	pag. 8
Executive summary	pag. 10
Introduzione	pag. 12
Strategia nazionale di contrasto all'antibiotico-resistenza 2022-2025	pag. 14
Obiettivi strategici	pag. 14
Struttura	pag. 15
Soggetti	pag. 20
Piano Nazionale di contrasto all'antibiotico-resistenza 2022-2025	pag. 22
Governo della strategia nazionale di contrasto all'antibiotico-resistenza	pag. 22
Sorveglianza e monitoraggio	pag. 25
La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza in ambito umano e veterinario	pag. 25
La sorveglianza del consumo degli antibiotici	pag. 36
La sorveglianza delle infezioni correlate all'assistenza	pag. 43
Il monitoraggio ambientale degli antibiotici e dell'antibiotico-resistenza	pag. 49
Prevenzione e controllo delle infezioni	pag. 53
Prevenzione e controllo delle infezioni e delle infezioni correlate all'assistenza in ambito umano	pag. 53
Prevenzione delle zoonosi	pag. 59
Uso prudente degli antibiotici	pag. 63
Uso prudente degli antibiotici in ambito umano	pag. 63
Uso prudente degli antibiotici in ambito veterinario	pag. 67
Corretta gestione e smaltimento degli antibiotici e dei materiali contaminati	pag. 71
Formazione	pag. 76
Informazione, Comunicazione e Trasparenza	pag. 79
Ricerca e innovazione	pag. 85
Aspetti etici dell'antibiotico-resistenza	pag. 91
Cooperazione nazionale e internazionale	pag. 94
Appendice	pag. 98
Funghi, virus e parassiti	pag. 98
Gruppo di lavoro per il coordinamento della strategia nazionale di contrasto dell'antimicrobico-resistenza (GTC-AMR)	pag. 108
Ringraziamenti	pag. 111

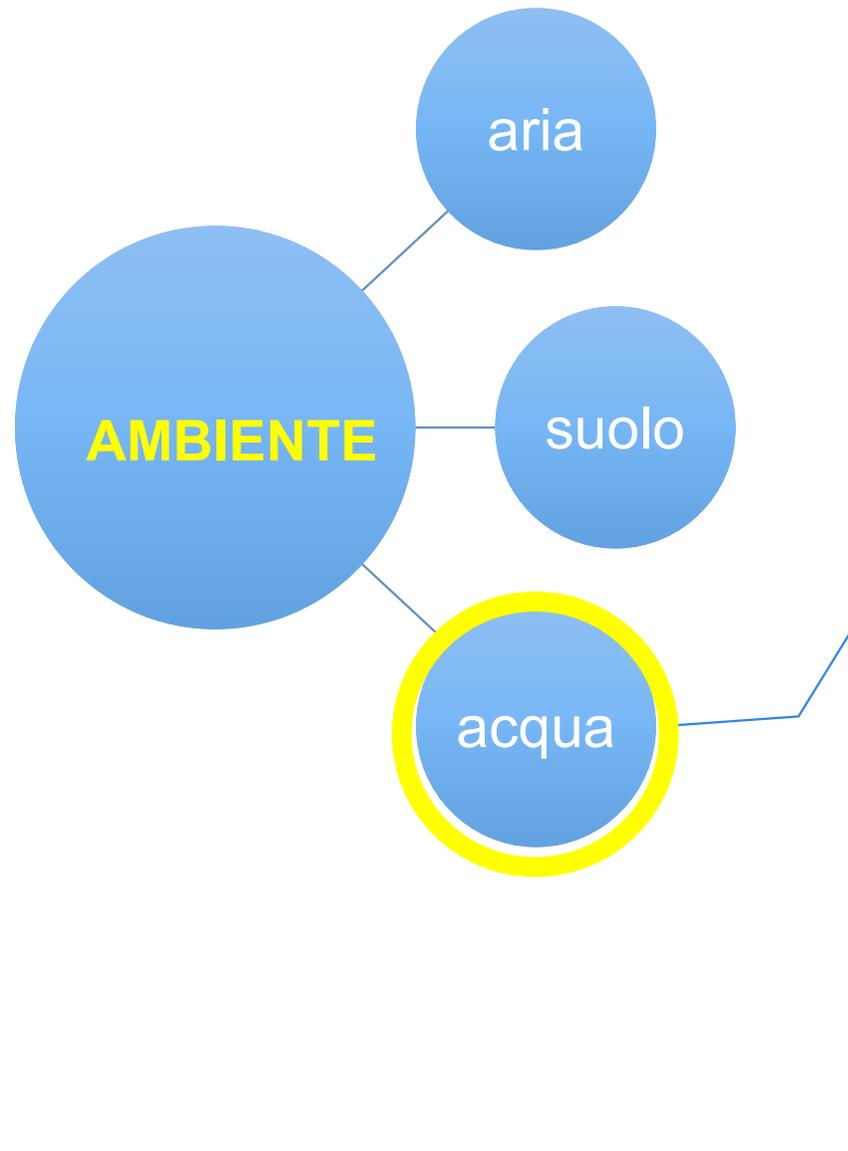
Obiettivi	Azioni	Attori	Periodo stimato di completamento	Indicatori/Indicatori SPiNCAR (ove disponibili riportare il codice numerico)
1. Potenziamento e integrazione della rete nazionale di monitoraggio (a partire dalla Watch List della Direttiva Quadro sulle Acque)	1.1 Creare e sviluppare progressivamente una rete di monitoraggio ambientale delle sostanze antibiotiche (in particolare antibiotici per batteri resistenti) e dei geni della resistenza nell'ambiente) maggiormente rilevanti nel contesto italiano	MdS, MASE, SNPA, ISPRA, ISS	Implementazione progressiva e completamento della rete entro 2025	NAZIONALE Disponibilità di un documento contenente l'elenco prioritario di sostanze da ricercare e il relativo programma di campionamento e analisi
	1.2 Istituzione di un tavolo per organizzare la rete a partire dai laboratori SNPA, in stretto coordinamento con il Progetto "SALUTE AMBIENTE BIODIVERSITÀ E CLIMA" del Piano Complementare PNRR, Decreto-legge 6 maggio 2021, n. 59 "Misure urgenti relative al Fondo complementare al Piano nazionale di ripresa e resilienza e altre misure urgenti per gli investimenti" ⁴³⁵	MdS, MASE, SNPA, ISPRA, ISS	Entro il primo semestre 2023	NAZIONALE Disponibilità di un tavolo dedicato al potenziamento della rete nazionale di monitoraggio ambientale e nomina dei relativi partecipanti
	1.3 Redazione di rapporti annuali del monitoraggio	MdS, MASE, SNPA, ISPRA, ISS	Entro il secondo semestre 2025	NAZIONALE Disponibilità di un rapporto annuale contenente i risultati del monitoraggio annuale svolto

**CAPITOLO AMBIENTE
OBIETTIVO 1**

Obiettivi	Azioni	Attori	Periodo stimato di completamento	Indicatori/Indicatori SPiNCAR (ove disponibili riportare il codice numerico)
2. Integrazione sorveglianza sistematica del SARS-CoV-2	2.1 Realizzazione del protocollo per l'integrazione della sorveglianza nella rete di monitoraggio esistente	MdS, MASE, Regioni/PPAA, ISS, SNPA, IZS	Entro il primo semestre 2025	NAZIONALE Disponibilità di un protocollo contenente gli enti e i laboratori coinvolti nella sorveglianza e il programma di campionamento e analisi
	2.2 Integrazione della ricerca di antibiotici, batteri resistenti e geni di resistenza nelle campagne di monitoraggio	MdS, MASE, Regioni/PPAA, ISS, SNPA, IZS	Entro il secondo semestre 2025	NAZIONALE Disponibilità di un nuovo protocollo per la campagna di monitoraggio
	2.3 Redazione di rapporti annuali del monitoraggio	MdS, MASE, Regioni/PPAA, ISS, SNPA, IZS	Entro il secondo semestre 2023	NAZIONALE Disponibilità di un rapporto annuale contenente i risultati del monitoraggio annuale svolto
3. Definizione e attuazione campagne di monitoraggio degli scarichi più significativi derivanti da aziende produttrici di sostanze antimicrobiche	3.1 Realizzazione di un accordo con le industrie interessate (in particolare quelle farmaceutiche)	MdS, MASE, SNPA, ISPRA, ISS	Entro il secondo semestre 2023	NAZIONALE Disponibilità di un protocollo d'intesa con le industrie interessate che definisce modalità, frequenza e tipologia delle molecole antibiotiche da ricercare
	3.2 Determinazione dell'elenco di sostanze da monitorare	MdS, MASE, SNPA, ISPRA, ISS	Entro il secondo semestre 2023	Disponibilità di un elenco di sostanze da monitorare
	3.3 Redazione di rapporti di monitoraggio	MdS, MASE, SNPA, ISPRA, ISS	Entro il secondo semestre 2024	Disponibilità di un rapporto annuale contenente i risultati del monitoraggio annuale svolto

CAPITOLO AMBIENTE OBIETTIVO 2

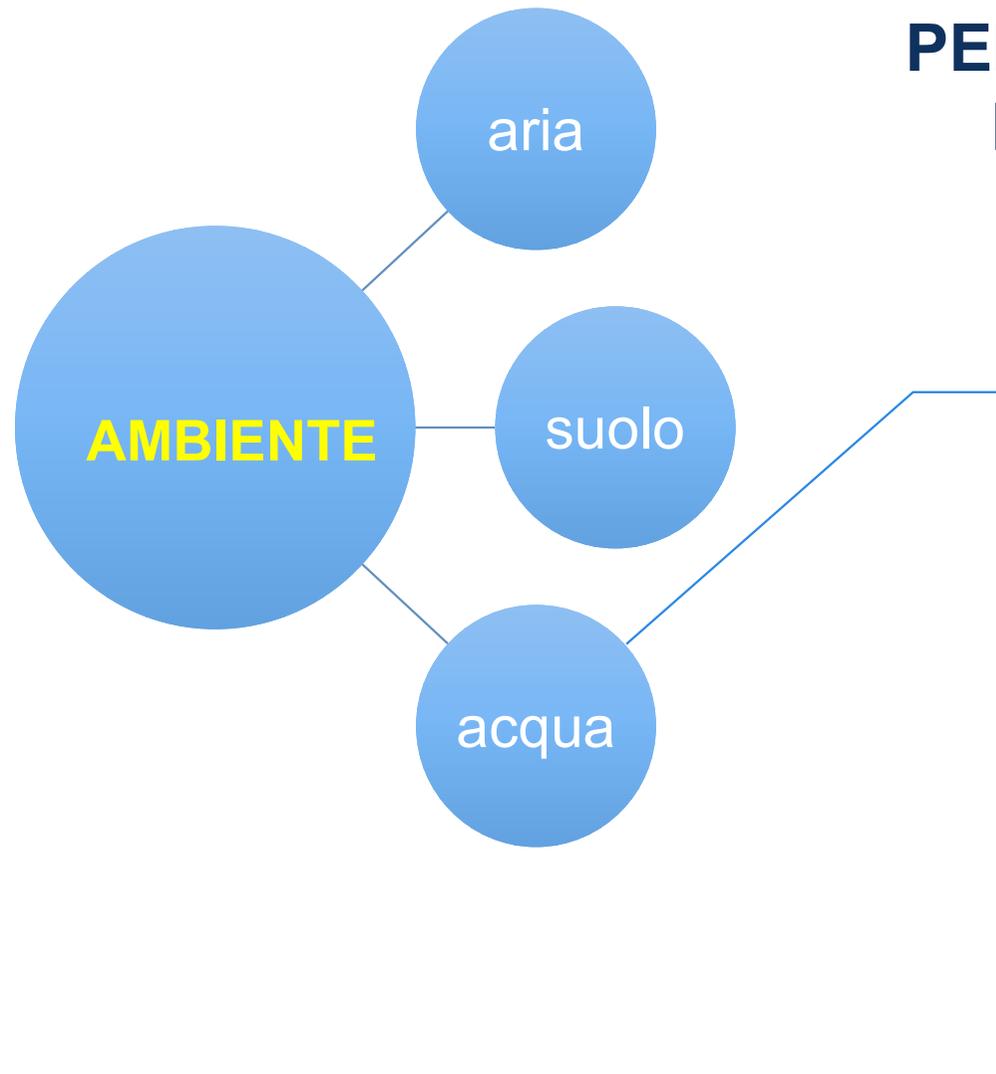
AZIONI PREVISTE DAL PNCAR 2022-2025 PER IL MONITORAGGIO AMBIENTALE DEGLI ANTIBIOTICI E DELL'AMR



FOCUS SULL'AMBIENTE ACQUATICO

- Ricerca di AMR e di antibiotici in reflui urbani e in acque superficiali
- *Monitoraggio scarichi ad elevato contenuto ARGs, antibiotici e patogeni mediante accordi con i produttori (azione centrale)*

AZIONI PREVISTE DAL PNCAR 2022-2025 PER IL MONITORAGGIO AMBIENTALE DEGLI ANTIBIOTICI E DELL'AMR



Perché considerare l'acqua?

- Entità dell'immissione in acque superficiali di ARGs, MDRO e antibiotici
- Pervasività dell'acqua
- Facilità di contatto con la popolazione (ad es. pesca, balneazione, acqua per uso domestico ...)
- **Sinergie rispetto ad attività di monitoraggio già esistenti**

Le sinergie del PNCAR 2022-202

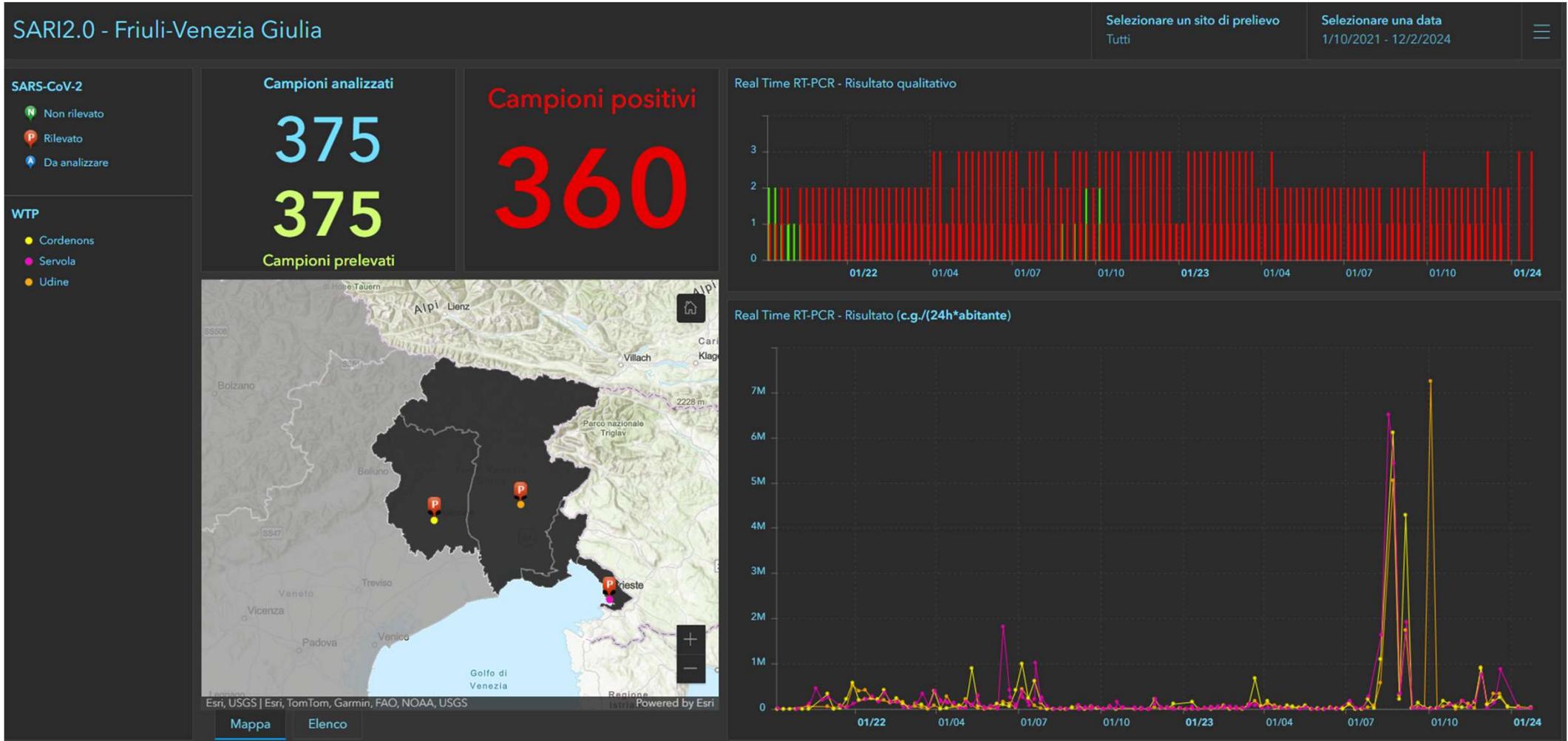
- **in Acque superficiali**

- sfruttando la rete del SNPA già esistente per il monitoraggio degli antibiotici inseriti nella Watch List
- integrando la lista di antibiotici inseriti nella WL con altri di interesse per la salute umana o animale, con coordinamento della cabina di regia

- **in Reflui urbani**

- sfruttando la rete già costruita per il monitoraggio di SARS Cov-2 (progetto SARI)
- estendendo il monitoraggio a rete fognaria ed impianti di depurazione a servizio degli agglomerati urbani più significativi

Progetto SARI: progetto nazionale di sorveglianza di SARS Cov-2 nei reflui urbani coordinato da ISS



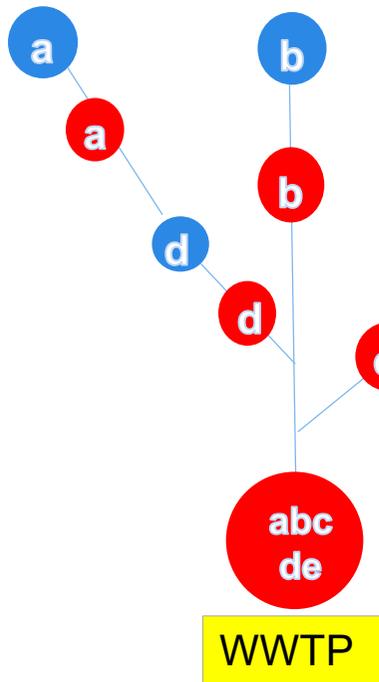
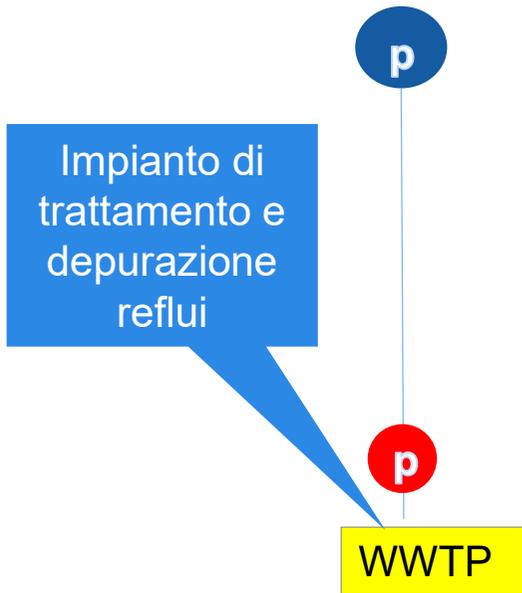
Wastewater Epidemiology e wastewater-based surveillance

Wastewater Epidemiology: l'analisi dei reflui urbani può fornire **indicazioni sullo stato di salute della popolazione di riferimento** in modo semplice, veloce ed economico

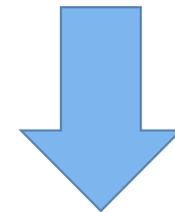
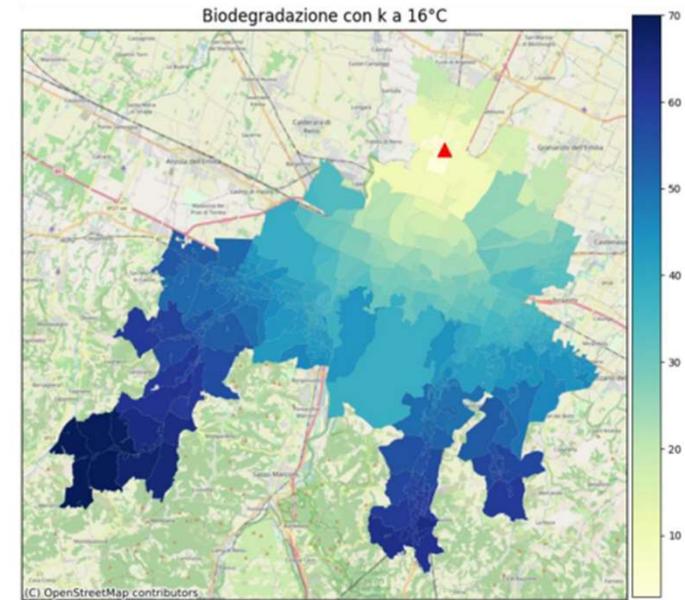
Le esperienze di monitoraggio della pandemia SARS Cov-2 condotte a livello internazionale e nazionale (progetto SARI di ISS) hanno sancito **l'utilità per la Sanità Pubblica della Wastewater-based Surveillance**

(in US creazione del *National Wastewater Surveillance System* - NWSS)

Necessità di conoscere l'organizzazione dei sistemi fognari



- punto prelievo rete fognaria
- popolazione di riferimento



Modellistica idraulica e biologica rete fognaria

Wastewater-based surveillance

non solo SARS-Cov 2 ma anche

- enterovirus
- IAV e IBV
- RSV
- ...
- MDRO
- ARGs

Figure 1

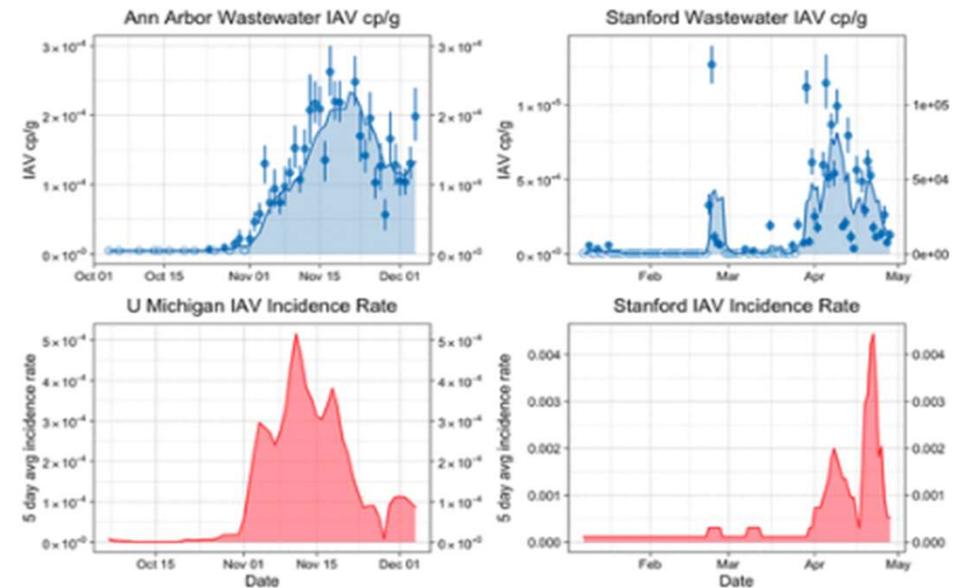
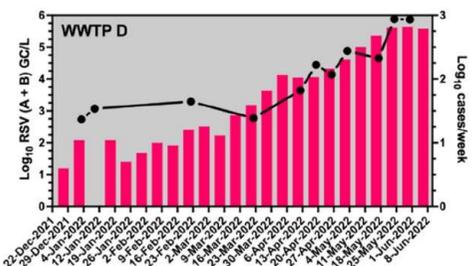
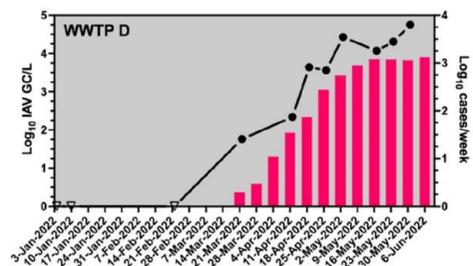
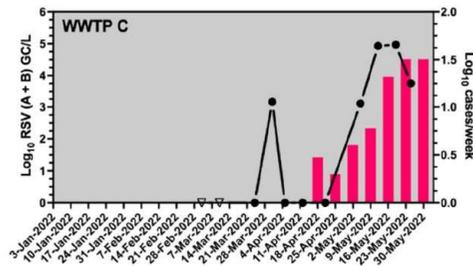
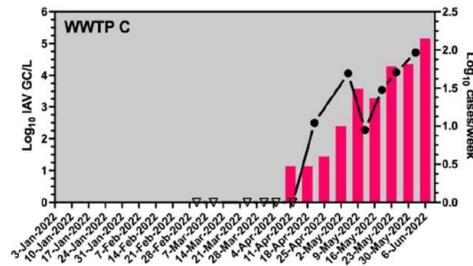
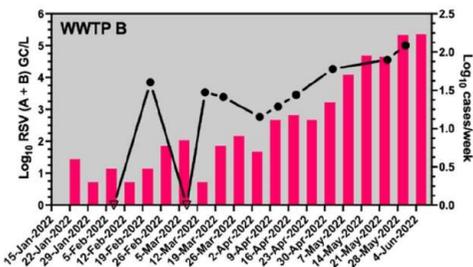
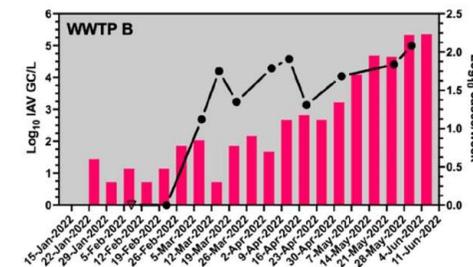
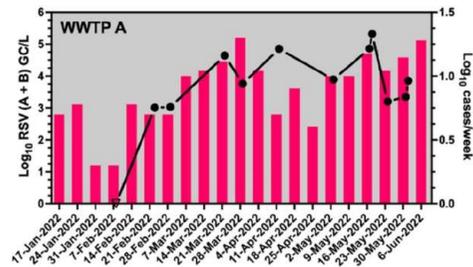
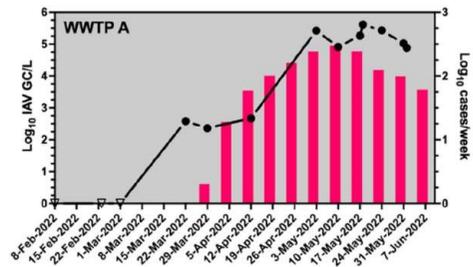


Figure 1. Time series of the UM and Stanford University outbreaks, as shown in wastewater IAV concentrations and confirmed influenza A incidence rates. In the top row, points show daily IAV M1 RNA concentrations in copies per gram of dry weight of wastewater solids with error bars representing standard deviations of replicates as total errors from the ddPCR instrument software. Empty circles indicate nondetect measurements. The area under the line represents the 5-day smoothed average copies per gram of IAV M1 RNA in wastewater. In the bottom row, the red area represents the 5-day smoothed number of reported cases.



**A dx IAV
A sx RSV**

**Linea tratteggiata:
concentrazioni virali nei reflui**

**Istogrammi: casi umani
settimanali di influenza A e di
RSV**

Occurrence of multiple respiratory viruses in wastewater in Queensland, Australia: Potential for community disease surveillance

Warish Ahmed^a, Aaron Bivins^b, Mikayla Stephens^c, Suzanne Metcalfe^a, Wendy J.M. Smith^a, Kwanrwee Sirikanchana^c, Masaaki Kitajima^d, Stuart L. Simpson^e

Show more

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.161023>

Get rights and content

Alcune premesse e considerazioni sul significato dei campionamenti a livello di impianti di depurazione/rete fognaria e a livello ambientale

Per quanto riguarda gli impianti di depurazione e la rete fognaria i campionamenti possono essere effettuati:

- nei reflui a monte degli impianti
- negli impianti stessi
- nelle acque depurate a valle degli impianti

Le informazioni raccolte nei diversi ambienti hanno un significato diverso e funzionale a diversi ambiti di attività/studio

PRELIEVO DELLE ACQUE REFLUE IN ENTRATA NEGLI IMPIANTI DI TRATTAMENTO

BACINO
URBANO

Pe

WWTP

L'analisi delle acque reflue in entrata nei WWTP fornisce indicazioni sullo stato di salute della popolazione di riferimento (tanto più dettagliate quanto più numerosi i siti di prelievo)

- circolazione di patogeni multiresistenti (MDRO)
- circolazione di geni di resistenza (ARGs)
- concentrazione di residui di antibiotici
- circolazione di altri patogeni virali
- utilizzo di sostanze vietate, ad es. droghe
- utilizzo di farmaci attraverso canali non ufficiali

**sorveglianza,
prevenzione,
early warning**

➤ **Necessaria per valutare l'efficacia dei sistemi di depurazione**

Pe: prelievo reflui in entrata nel WWTP



Science of The Total Environment

Volume 868, 10 April 2023, 161419



Understanding the distribution of antibiotic resistance genes in an urban community using wastewater-based epidemiological approach

[Yamini Javvadi](#)^{a, b}, [S. Venkata Mohan](#)^{a, b}  



Water Research

Volume 186, 1 November 2020, 116404



Making waves: Wastewater-based epidemiology for COVID-19 – approaches and challenges for surveillance and prediction

[David Polo](#)^a  , [Marcos Quintela-Baluja](#)^b, [Alexander Corbishley](#)^c, [Davey L. Jones](#)^{d, e}, [Andrew C. Singer](#)^f, [David W. Graham](#)^b, [Jesús L. Romalde](#)^a  



Environmental Pollution

Volume 333, 15 September 2023, 122020



Antimicrobials and antimicrobial resistance genes in a one-year city metabolism longitudinal study using wastewater-based epidemiology ☆

[Natalie Sims](#)^{a, b}, [Andrew Kannan](#)^a, [Elizabeth Holton](#)^a, [Kishore Jagadeesan](#)^a, [Leonardos Mageiros](#)^e, [Richard Standerwick](#)^c, [Tim Craft](#)^d, [Ruth Barden](#)^c, [Edward J. Feil](#)^e, [Barbara Kasprzyk-Hordern](#)^{a, b}  



Journal of Environmental Chemical Engineering

Volume 10, Issue 3, June 2022, 107596



Profiling of emerging pathogens, antibiotic resistance genes and mobile genetic elements in different biological wastewater treatment plants

[Thobela Conco](#)^a, [Sheena Kumari](#)^a  , [Oluoyemi Olatunji Awolusi](#)^a, [Mushal Allam](#)^{b, c}, [Arshad Ismail](#)^b, [Thor A. Stenström](#)^a, [Faizal Bux](#)^a

PRELIEVO DELLE ACQUE REFLUE IN USCITA DAGLI IMPIANTI DI TRATTAMENTO

WWTP

Pu

*Pu:
prelievo
reflui in
uscita dal
WWTP*

L'analisi delle acque in uscita dal WWTP fornisce indicazioni sull'efficacia dei sistemi di depurazione in uso e sullo sversamento ambientale di antibiotici, MDRO e ARGs. Sappiamo che l'efficacia dei sistemi di depurazione in uso è variabile nei confronti di **MDRO, antibiotici e ARGs**

**Valutazione delle
tecnologie di
depurazione**

AMBIENTE

Nei WWTP ci sono le **condizioni ideali**, in termini di concentrazioni subinibitorie di antibiotici, di metalli pesanti, di batteri patogeni e ambientali, nonché di nutrienti necessari per la crescita batterica, per la **selezione di nuove resistenze** e per il passaggio di ARGs da una specie batterica all'altra tramite HGT

Hotspot

Research Article |  Full Access

Treatment of hospital wastewater: emphasis on ecotoxicity and antibiotic resistance genes

Andreas Kaliakatsos, Iosifina Gounaki, Spyros Dokianakis, Emmanouela Maragkaki, Athanasios S Stasinakis, Stylianos Gyparakis, Nikos Katsarakis, Thrassyvoulos Manios ... [See all authors](#) ▾

First published: 26 January 2023 | <https://doi.org/10.1002/jctb.7329> | Citations: 1

Open Access Article

Inactivation of Antibiotic-Resistant Bacteria in Wastewater by Ozone-Based Advanced Water Treatment Processes

by  Takashi Azuma ^{1,*} ,  Masaru Usui ²  and  Tetsuya Hayashi ^{1,3} 

¹ Department of Pharmacy, Osaka Medical and Pharmaceutical University, Takatsuki 569-1094, Japan

² Food Microbiology and Food Safety, Department of Health and Environmental Sciences, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu 069-8501, Japan

³ Department of Food and Nutrition Management Studies, Faculty of Human Development, Soai University, Suminoe-ku, Osaka 559-0033, Japan

* Author to whom correspondence should be addressed.

Antibiotics **2022**, *11*(2), 210; <https://doi.org/10.3390/antibiotics11020210>

Received: 7 January 2022 / Revised: 27 January 2022 / Accepted: 5 February 2022 /

Front. Microbiol., 16 January 2023
Sec. Infectious Agents and Disease
Volume 13 - 2022 | <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1100102>

This article is part of the Research Topic
Emerging pathogens and contaminants in water matrices: human
health risks, exposure pathways and epidemiological outcomes
[View all 6 Articles >](#)

Inactivation of antibiotic-resistant bacteria and antibiotic-resistance genes in wastewater streams: Current challenges and future perspectives

 Thabang B. M. Mosaka¹  John O. Unuofin¹  Michael O. Daramola¹  Chedly Tizaoui²
 Samuel A. Iwarere^{1*}

¹ Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineering, Built Environment and Information Technology, University of Pretoria, Pretoria, South Africa

² Water and Resources Recovery Research Lab, Department of Chemical Engineering, Faculty of Science and Engineering, Swansea University, Swansea, United Kingdom

Journal of Water Process Engineering 46 (2022) 102539



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Water Process Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jwpe



Wastewater treatment plants as reservoirs and sources for antibiotic resistance genes: A review on occurrence, transmission and removal

Yu-Xi Gao, Xing Li^{*}, Xiao-Yan Fan, Jun-Ru Zhao, Zhong-Xing Zhang

Faculty of Architecture, Civil and Transportation Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, PR China

WWTP



Pa

AMBIENTE

*Pa:
prelievo
acque di
superficie*

PRELIEVO A LIVELLO AMBIENTALE (priorità alle acque di superficie)

L'analisi delle acque di superficie, o di altri campioni ambientali, fornisce indicazioni sulle concentrazioni di antibiotici, ARGs e MDRO, ed è funzionale a:

Ricerca

- studi di ecotossicità (ERA)
 - valutazione dell'alterazione del microbioma e del resistoma ambientale
 - valutazione del trasferimento al microbioma umano di ARGs presenti nelle acque superficiali
 - valutazione del rischio di passaggio all'uomo di MDRO
- **Limitate evidenze scientifiche sul possibile passaggio all'uomo di resistenze presenti in ambiente e sul danno di salute determinato da questo passaggio (MDRO e ARGs)**



Natural recreational waters and the risk that exposure to antibiotic resistant bacteria poses to human health

[Anne FC Leonard](#)¹ , [Dearbháile Morris](#)², [Heike Schmitt](#)³, [William H Gaze](#)¹ 

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.10.004> 

[Get rights and content](#) 



Acquisition of antibiotic resistance genes on human skin after swimming in the ocean

[Marisa C. Nielsen](#)^a , , [Nan Wang](#)^b, [Sunny C. Jiang](#)^{a, b}

Show more 

+ Add to Mendeley  Share  Cite

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.110978> 

[Get rights and content](#) 



Elevated levels of antibiotic resistance in groundwater during treated wastewater irrigation associated with infiltration and accumulation of antibiotic residues

[Ioannis D. Kampouris](#)^a , , [Nikiforos Alygizakis](#)^{b, c}, [Uli Klümper](#)^a, [Shelesh Agrawal](#)^d, [Susanne Lackner](#)^d, [Damiano Cacace](#)^a, [Steffen Kunze](#)^a, [Nikolaos S. Thomaidis](#)^c, [Jaroslav Slobdonik](#)^b, [Thomas U. Berendonk](#)^a , 



Potential reservoirs of antimicrobial resistance in livestock waste and treated wastewater that can be disseminated to agricultural land

[Abasiofiok M. Ibekwe](#)^a , , [Ananda S. Bhattacharjee](#)^{a, b}, [Duc Phan](#)^{a, c}, [Daniel Ashworth](#)^a, [Michael P. Schmidt](#)^a, [Shelton E. Murinda](#)^d, [Amarachukwu Obayiuwana](#)^e, [Marcia A. Murry](#)^f, [Gregory Schwartz](#)^g, [Tryg Lundquist](#)^h, [Jincai Ma](#)ⁱ, [H. Karathia](#)^j, [B. Fanelli](#)^j, [Nur.A. Hasan](#)^{k, l}, [Ching-Hong Yang](#)^m

Matrici ambientali previste dal PNCAR 2022-2025: reflui urbani e acque di superficie

TARGET PNCAR	MATRICE	METODO	STATO DELL'ARTE
microrganismi patogeni multiresistenti	<ul style="list-style-type: none"> reflui urbani 	metodi batteriologici (basati su filtrazione e utilizzo di terreni selettivi cromogeni)	<p>molti metodi disponibili ma mancano protocolli nazionali ufficiali</p> <p>Disponibile il <i>Tricycle protocol</i> di WHO</p>
geni di resistenza	<ul style="list-style-type: none"> reflui urbani acque superficiali 	metodi molecolari	molti metodi disponibili (real time PCR, digital PCR, NGS, targeted NGS) ma mancano protocolli nazionali ufficiali
<u>antibiotici di interesse per la salute umana</u>	<ul style="list-style-type: none"> reflui urbani acque superficiali 	metodi chimici targeted o non targeted	alcuni metodi disponibili altri in fase di sviluppo

Progetto pilota per la sorveglianza delle resistenze batteriche agli antibiotici nelle acque reflue e superficiali delle regioni Friuli Venezia Giulia ed Emilia Romagna

Strumenti normativi e di pianificazione di riferimento

- Piano Regionale di Prevenzione 2021-2025 (PP9 e PP10)
- Sistema Regionale Prevenzione Salute dai rischi ambientali e climatici (SRPS)
- Piano nazionale di contrasto all'antibiotico-resistenza 2022-2025 (PNCAR 2022-2025)

Il monitoraggio ambientale degli antibiotici e dell'antibiotico-resistenza

- **Obiettivo 1:** *Potenziamento e integrazione della rete nazionale di monitoraggio (a partire dalla WL)*
- **Obiettivo 2:** *Integrazione sorveglianza sistematica del SARS Cov-2*

Progetto pilota per la sorveglianza delle resistenze batteriche agli antibiotici nelle acque reflue e superficiali delle regioni Friuli Venezia Giulia ed Emilia Romagna

FINALITA'

- mettere a punto le reti collaborative necessarie per la raccolta e l'analisi campioni, sfruttando sinergicamente le competenze disponibili a livello regionale
- **creare il network regionale necessario per l'analisi/elaborazione delle informazioni raccolte**
- **in generale, maturare esperienze e conoscenze nel settore del monitoraggio ambientale delle resistenze antimicrobiche**
- valutare le tecniche di laboratorio proposte nel progetto pilota (batteriologiche e chimiche) per evidenziare la loro reale idoneità, anche in termini di costo-beneficio, rispetto agli obiettivi del PNCAR

Progetto pilota per la sorveglianza delle resistenze batteriche agli antibiotici nelle acque reflue e superficiali delle regioni Friuli Venezia Giulia ed Emilia Romagna

OUTPUT ATTESI

- monitorare nel tempo le concentrazioni di **MDRO** nei reflui dei principali distretti urbani del Friuli V.G. e dell'Emilia-Romagna (**trend temporali ed eventualmente spaziali**)
- (monitorare nel tempo le concentrazioni di **antibiotici** di interesse per la salute pubblica nelle acque superficiali del Friuli V.G. e dell'Emilia-Romagna)
- **raggiungere un adeguato livello di *preparedness* culturale ed organizzativa in vista dell'entrata in vigore della nuova direttiva EU sulle acque reflue urbane in un'ottica di collaborazione interdisciplinare**
- valutare l'adeguatezza e la convenienza dell'utilizzo di metodi analitici rispetto agli obiettivi del PNCAR 2022-2025

DIAMO PRIORITA' ALL'ORGANIZZAZIONE!





WHO integrated global surveillance on ESBL-producing *E. coli* using a “One Health” approach: Implementation and opportunities



**Protocollo da
adattare alle
nostre esigenze**

**Dalla proposta
di progetto
pilota FVG_ER
scaturirà
probabilmente
una proposta di
sorveglianza
nazionale**

Perchè questa scelta?

- questo protocollo è l'unico internazionalmente riconosciuto attualmente disponibile e garantisce la comparabilità dei risultati prodotti in laboratori diversi
- **è immediatamente applicabile in qualunque laboratorio senza necessità di costosi investimenti**
- **è facilmente adattabile ai budget disponibili**, attraverso un aumento o una riduzione dei target batterici scelti come indicatori (*ma sarà necessario garantire livello minimo in tutte le regioni che parteciperanno al progetto*)
- la ricerca di determinanti genetici di resistenza in WW con metodi molecolari è ancora in fase di sviluppo e non esistono al momento protocolli di indagine ufficiali
- in Italia *Escherichia coli* ESBL-produttore rappresenta la principale causa di mortalità fra le infezioni associate alle cure (ICA) imputabili a MDRO
- è già attiva in Italia la sorveglianza di *Escherichia coli* ESBL-produttore in ambito umano e in animali per la produzione alimenti
- c'è un crescente allarme internazionale per la diffusione di infezioni umane sostenute da VRE

Le attività da svolgere

➤ **Analisi batteriologiche su campioni di reflui urbani**

La sorveglianza sarà basata sulla ricerca di microrganismi multiresistenti agli antibiotici (MDRO) con metodi batteriologici, adottando, con alcune modifiche e adattamenti, il Tricycle Protocol di WHO (2021) per la ricerca di *Escherichia coli* ESBL-produttore

Gli MDRO che si propone di indagare in questo progetto sono

- a. *Escherichia coli* ESBL-produttore (ESBL-Ec)
- b. *Escherichia coli* resistente ai carbapenemi (CR-Ec)
- c. *Enterococcus faecium* ed *Enterococcus faecalis* vancomicina-resistenti (VRE)

➤ (Analisi chimiche per la ricerca di residui di antibiotici nelle acque superficiali)

Quali microrganismi multiresistenti cercare nei reflui urbani?

gli ESKAPE

- *ESBL-Escherichia coli*
- *CR-Escherichia coli*
- *MRSA*
- *CR-Klebsiella pneumoniae*
- *CR-Acinetobacter baumannii*
- *CR-Pseudomonas aeruginosa*
- *E. fecium* e *E. faecalis Van-R*

Non sappiamo a priori quali e quanti MDRO troveremo, quindi sarà necessaria FLESSIBILITA'

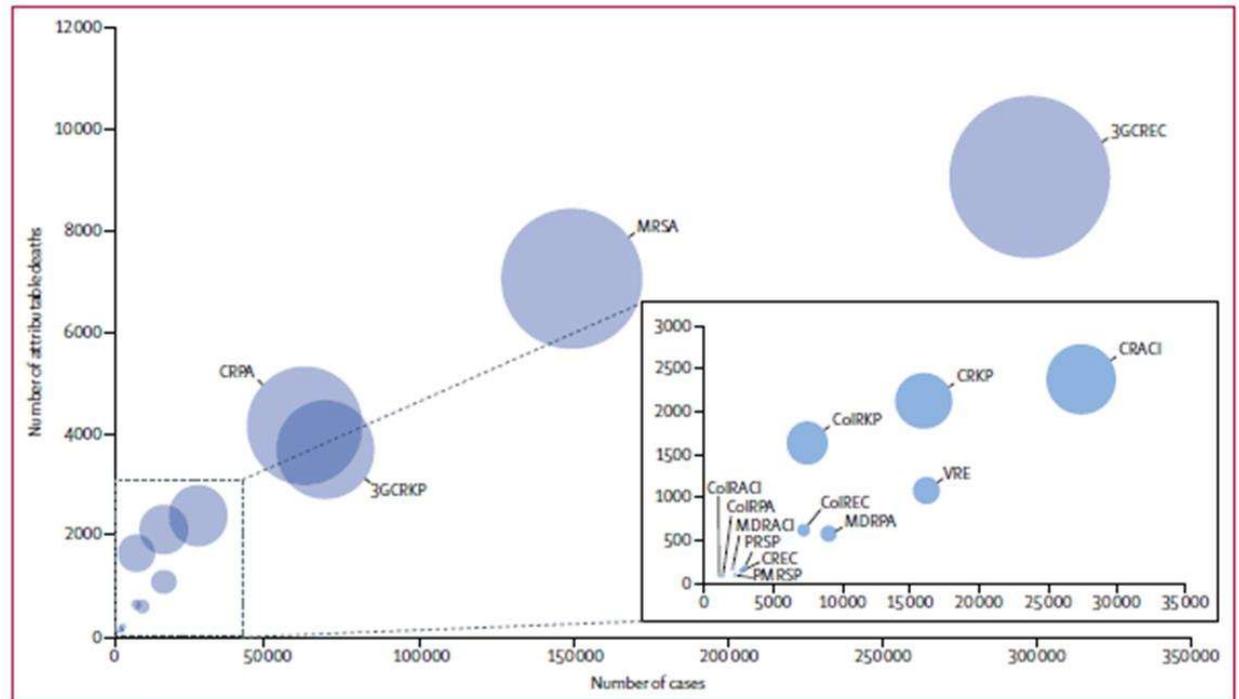


Figure 1: Infections with antibiotic-resistant bacteria, EU and European Economic Area, 2015

Diameter of bubbles represents the number of disability-adjusted life-years. ColRACI—colistin-resistant *Acinetobacter* spp. CRACI—carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. MDRACI—multidrug-resistant *Acinetobacter* spp. VRE—vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*. ColREC—colistin-resistant *Escherichia coli*. CREC—carbapenem-resistant *E. coli*. 3GCREC—third-generation cephalosporin-resistant *E. coli*. ColRKP—colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. CRKP—carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. 3GCRKP—third-generation cephalosporin-resistant *K. pneumoniae*. ColRPA—colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. CRPA—carbapenem-resistant *P. aeruginosa*. MDRPA—multidrug-resistant *P. aeruginosa*. MRSA—methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. PRSP—penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. PMRSP—penicillin-resistant and macrolide-resistant *S. pneumoniae*.

Cassini A. et al., 2019, The Lancet. DOI:[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30605-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30605-4)

Dove prelevare i campioni di acque reflue urbane?

CAMPIONAMENTO REFLUI FOGNARI **IN INGRESSO**

- descrive la produzione antropica di microrganismi multiresistenti (possibili *bias* legati alla proliferazione batterica ambientale)
- *valutazione correlazione fra cariche batteriche e situazione epidemiologica ?*



UTILIZZABILE CAMPIONE SARI

CAMPIONAMENTO ACQUE DEPURATE **IN USCITA**

- descrive lo sversamento di microrganismi multiresistenti in ambiente
- **consente di valutare l'abbattimento delle cariche batteriche con i sistemi di disinfezione adottati nell'impianto**

NECESSARIO CAMPIONE AD HOC

carica MDRO
nei reflui in
ingresso

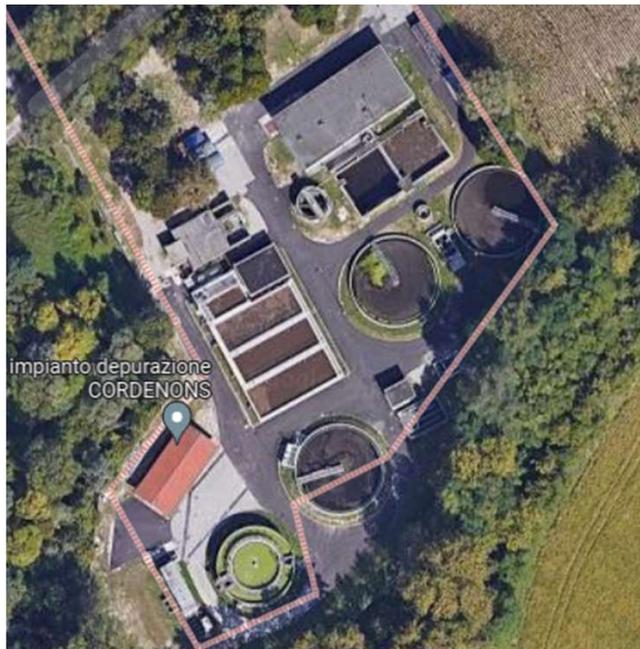


carica MDRO
nei reflui in
uscita

△ **condizionato da:**

- microbiota del depuratore
- presenza di nutrienti
- temperatura dei reflui
- residui di metalli pesanti
- **residui di antibiotici**
- ..

Dai tradizionali depuratori a fanghi attivi all'ipertecnologico depuratore di Trieste





Trattamenti di depurazione acque reflue

PRIMARIO: processo fisico di **sedimentazione** dei solidi sospesi

SECONDARIO: trattamento biologico per la **riduzione della materia organica** biodegradabile

TERZIARIO: trattamento per la **riduzione dell'azoto e/o del fosforo**

QUATERNARIO: trattamento per la **riduzione di microinquinanti**

16/10/2023: Proposta di modifica della Direttiva 91/271/CEE del Parlamento europeo e del Consiglio, concernente il trattamento delle acque reflue urbane

Obiettivo: proteggere l'ambiente dalle ripercussioni negative provocate dagli scarichi di acque reflue urbane non sufficientemente trattate

- Art. 9: **responsabilità estesa del produttore nei confronti dei microinquinanti** (*chi inquina paga*) e **obbligo di trattamento specifico per prodotti farmaceutici e della cosmesi**
- Art 17: **sorveglianza sanitaria** con finalità preventive e di early warning (SARS Cov-2, Poliovirus, IAV e IBV, agenti patogeni emergenti etc..) e **monitoraggio dell'AMR** per accrescere le conoscenze

Variabilità delle matrici

- Diversità dei reflui in ingresso fra depuratori
- Variazioni delle caratteristiche dei reflui legate alla piovosità
- Diversità fra reflui in ingresso e acque depurate in uscita

In generale:



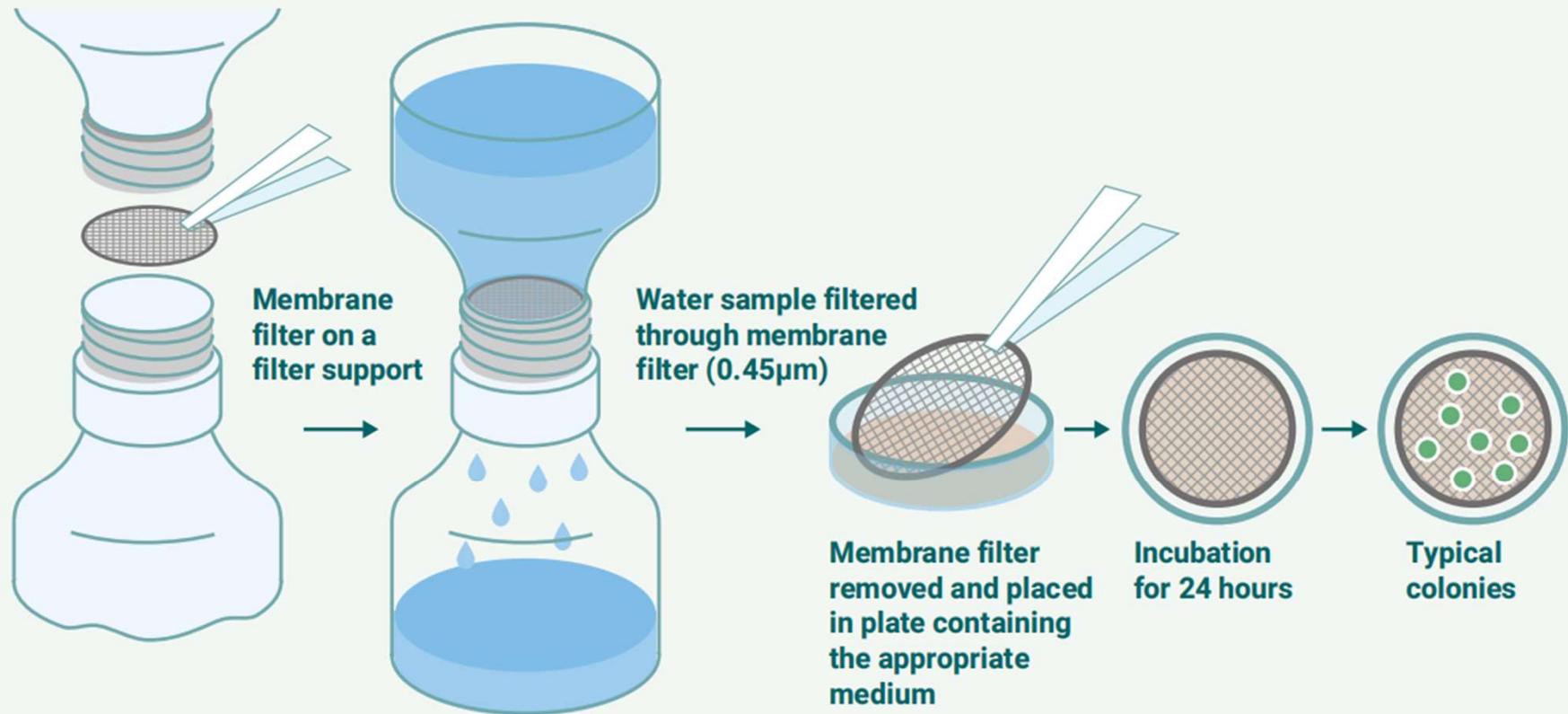
- Elevate cariche di *E. coli* 10^6 - 10^7
- Cariche di ESBL-*E. coli* più basse di 1 - $2 \log_{10}$
- Cariche di CR-*E. coli* e VRE ancora più basse

- **Ove sono attese cariche batteriche elevate occorre diluire il campione**
- **Ove sono attese cariche batteriche basse occorre filtrare il campione tal quale**



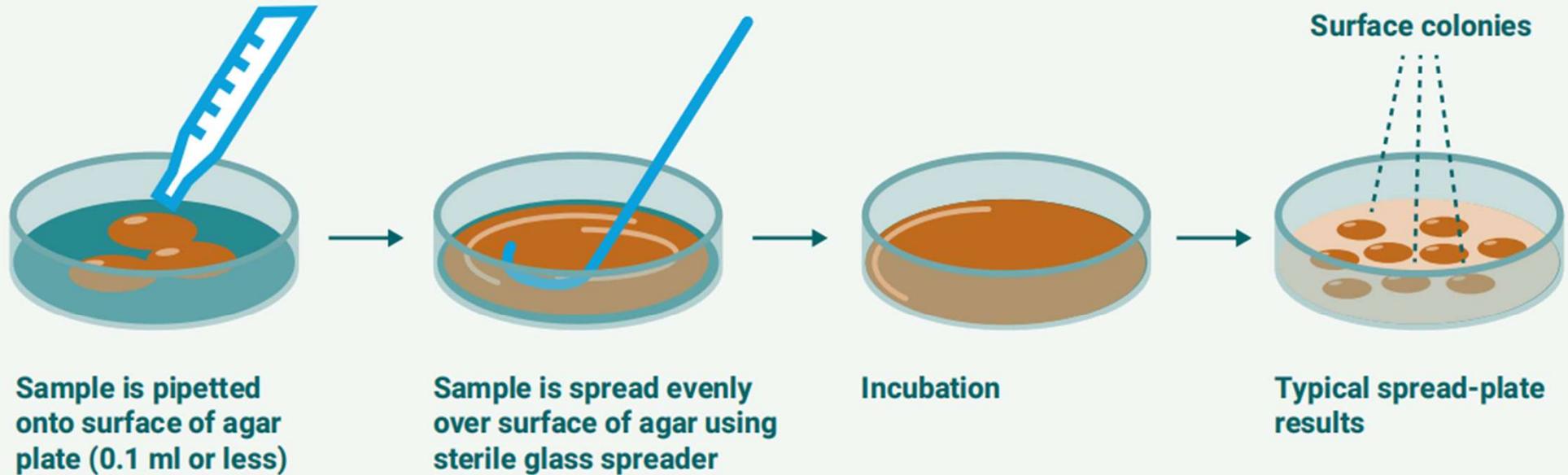
Sarà necessario fare delle prove preliminari per stabilire le diluizioni da utilizzare per la ricerca di *E. coli* e ESBL-*E. coli*, per stabilire se è necessario ricorrere alla filtrazione per poter isolare e contare CR-*E. coli* e VRE e per definire i volumi degli inoculi.

Figure 5.5 Steps of membrane filter procedure



Per velocizzare le prove di laboratorio si possono utilizzare sistemi di filtrazione manuali o semiautomatici ...

Figure 5.6 Spread plate procedure



... ma i metodi di semina manuali per spatolamento, senza filtrazione, vanno benissimo e sono meno costosi (il Tricycle protocol riporta tutti i dettagli tecnici necessari)

➤ Per l'isolamento di ESBL-Ec, CR-Ec, VRE si usano terreni selettivi differenziali

TERRENO	MICROORGANISMO	CARATTERISTICHE FENOTIPICHE
TBX agar (con o senza CTX*)	E. coli	Colonie blu o blu-verdi
	Non E. coli	Colonie bianche o color crema
TBX-MER*	E. coli	Colonie rosa
	K. pneumoniae	Colonie blu (non oggetto della PDP)
	Non E. coli o K. pneumoniae	Colonie incolori
Chromid VRE agar	Enterococcus faecalis	Colonie viola
	Enterococcus faecium	Colonie blu
	Non Enterococcus	Colonie incolori

* Concentrazioni secondo indicazioni EUCAST



- E' necessaria la conferma dell'identificazione presuntiva di specie (colonie pigmentate)
- **La disponibilità di MALDI-TOF MS abbatte i costi e i tempi dell'identificazione**

E' necessaria la conferma del fenotipo di resistenza

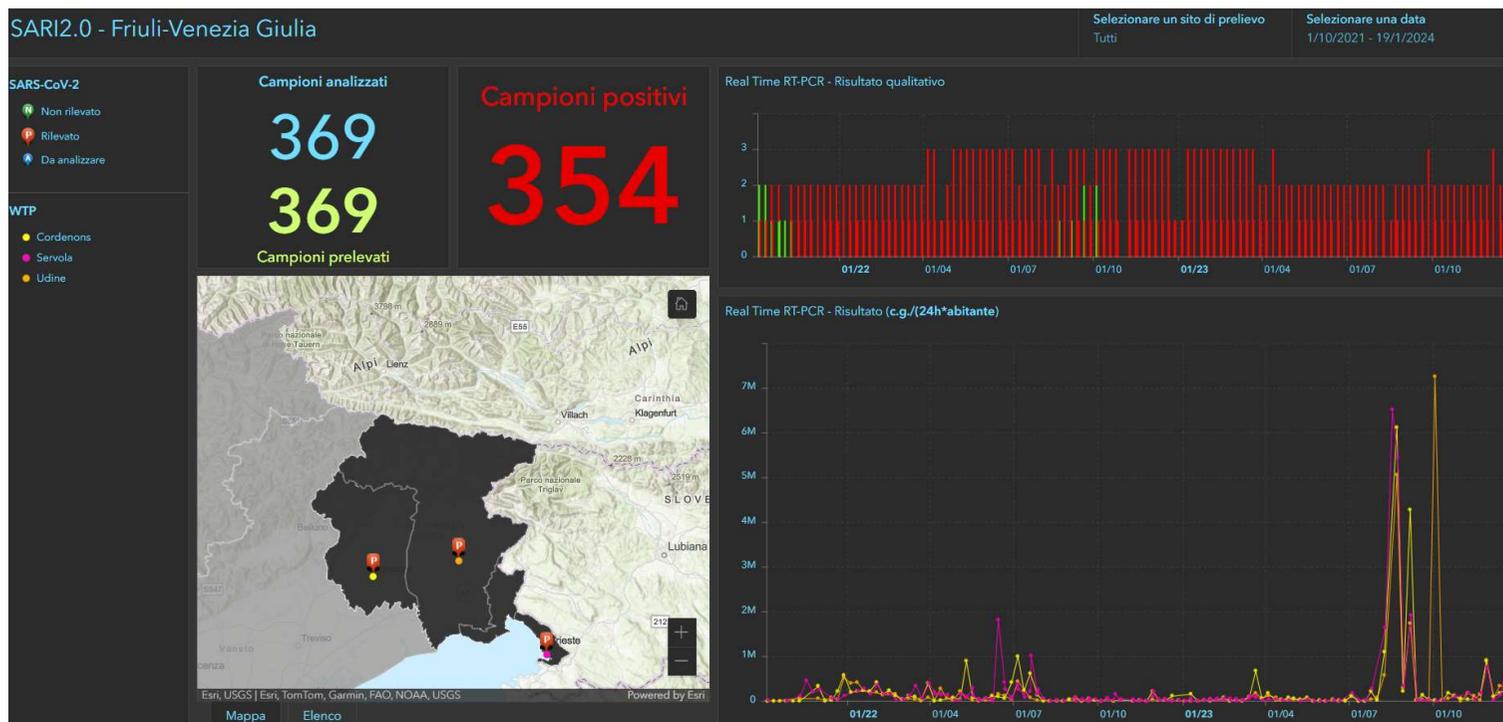
FENOTIPO DI RESISTENZA DA CONFERMARE	METODO
Resistenza alle cefalosporine a spettro esteso (ESBL-E. coli)	Secondo algoritmi EUCAST ¹ ed ECOFF ² come criteri interpretativi
Resistenza ai carbapenemi (CR-E. coli)	Secondo algoritmi EUCAST ¹ ed ECOFF ² come criteri interpretativi
Resistenza alla vancomicina di Enterococcus (E. faecalis o E. faecium)	Secondo algoritmi EUCAST ¹ ed ECOFF ² come criteri interpretativi

¹https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf

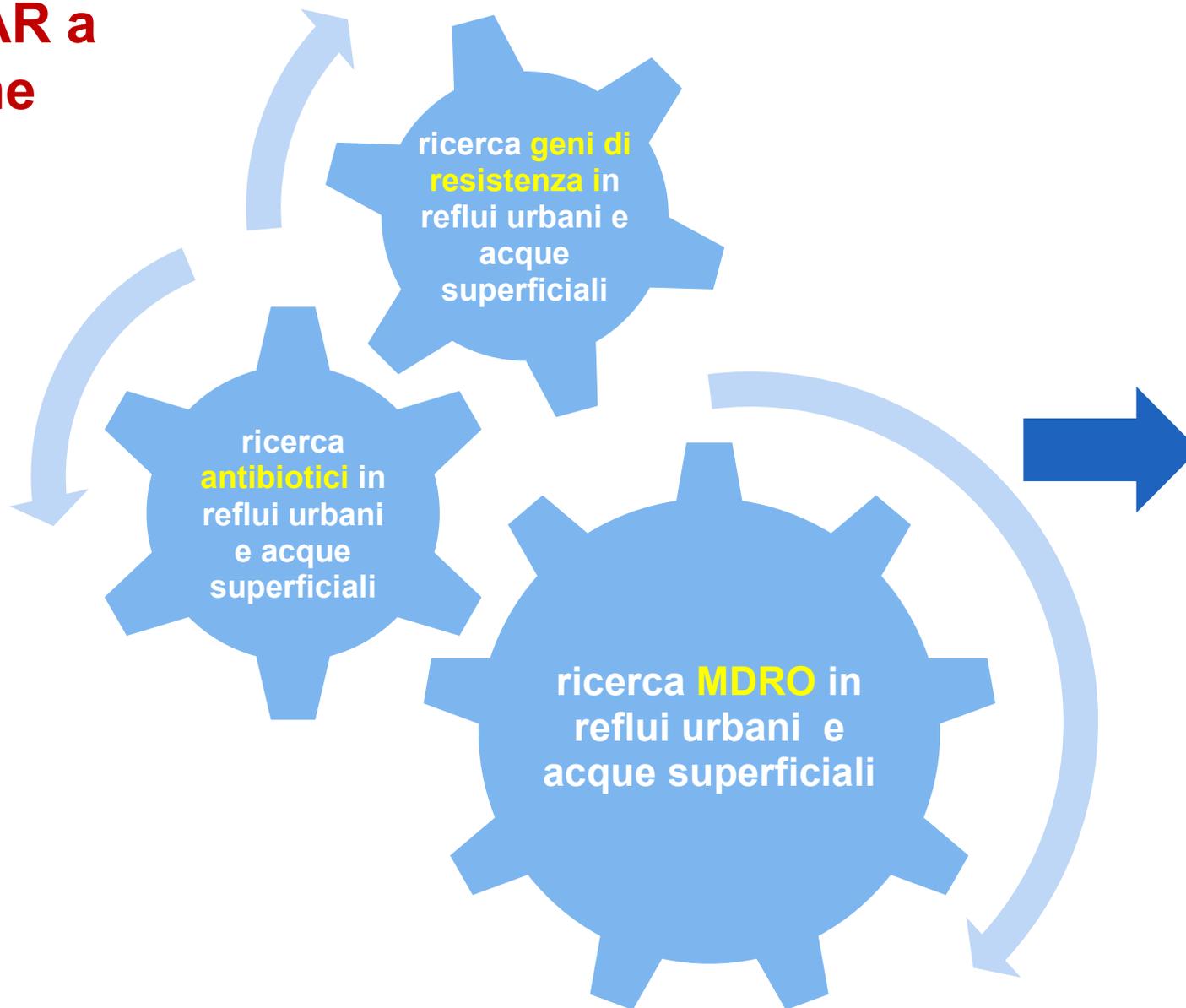
²https://www.eucast.org/mic_and_zone_distributions_and_ecoffs

Armonizzazione dei protocolli e raccolta dei dati

- In carico a ISS
- La piattaforma SARI verrà adattata per raccogliere anche i dati di AMR (MDRO e ARGs)

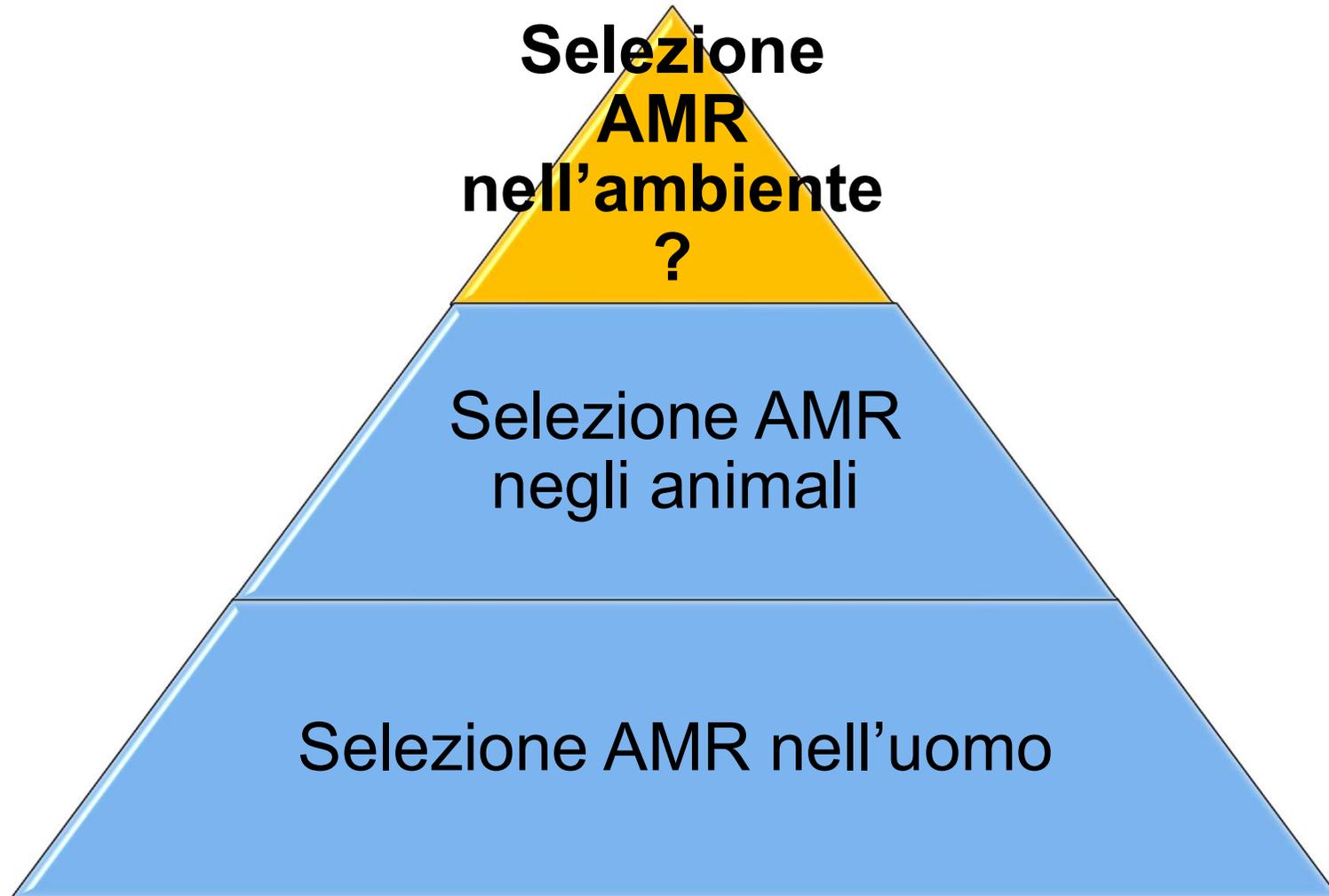


PNCAR a regime

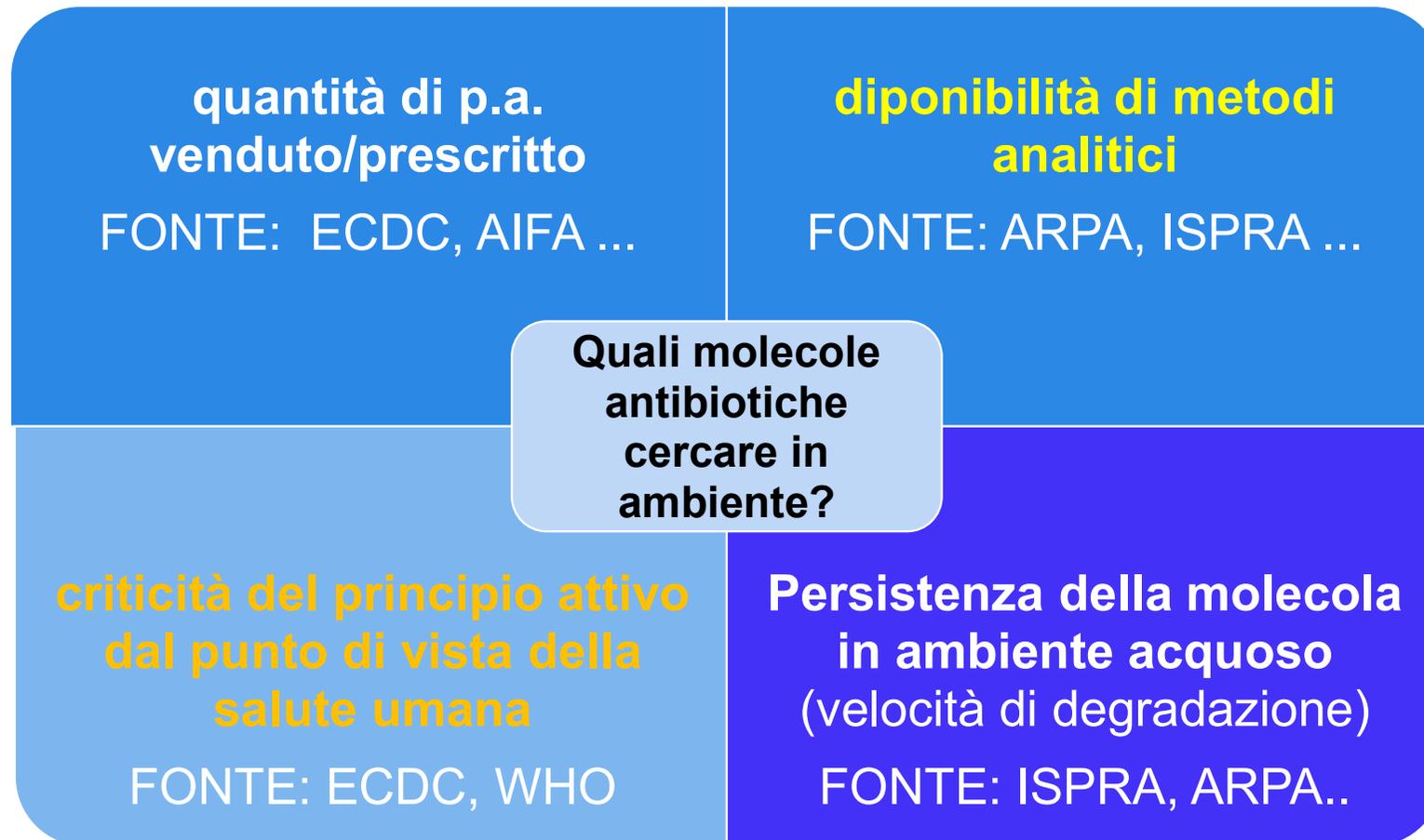


Dashboard ISS

(l'analisi delle informazioni raccolte con metodi armonizzati potrà suggerire rimodulazioni e implementazioni del piano di sorveglianza)



Quali antibiotici cercare?



- In EU è necessario procedere alla valutazione del rischio ambientale (**ERA: Environmental Risk Assessment**) per molecole di natura farmacologica con concentrazioni > 10 ng/L.
- Le **Predicted no effect concentrations (PNECs)**, stabilite con criteri ecotossicologici, non sempre sono protettive nei confronti della selezione di AMR
- I test utilizzati per la valutazione del rischio ambientale (inibizione della respirazione della comunità batterica di un fango attivo) non sono in grado di valutare il rischio di selezione di nuove resistenze
- **Rischio di selezione di nuove resistenze esercitato da concentrazioni molto basse (subinibitorie) di antibiotici**
- MSC (minimal selective concentration): la più bassa concentrazione di un p.a. in grado di indurre selezione di AMR
- **MSC: fino a 200 volte < MIC**
- Molti metodi utilizzati per valutare la MSC ma non è stata valutata la resilienza della comunità microbica ambientale

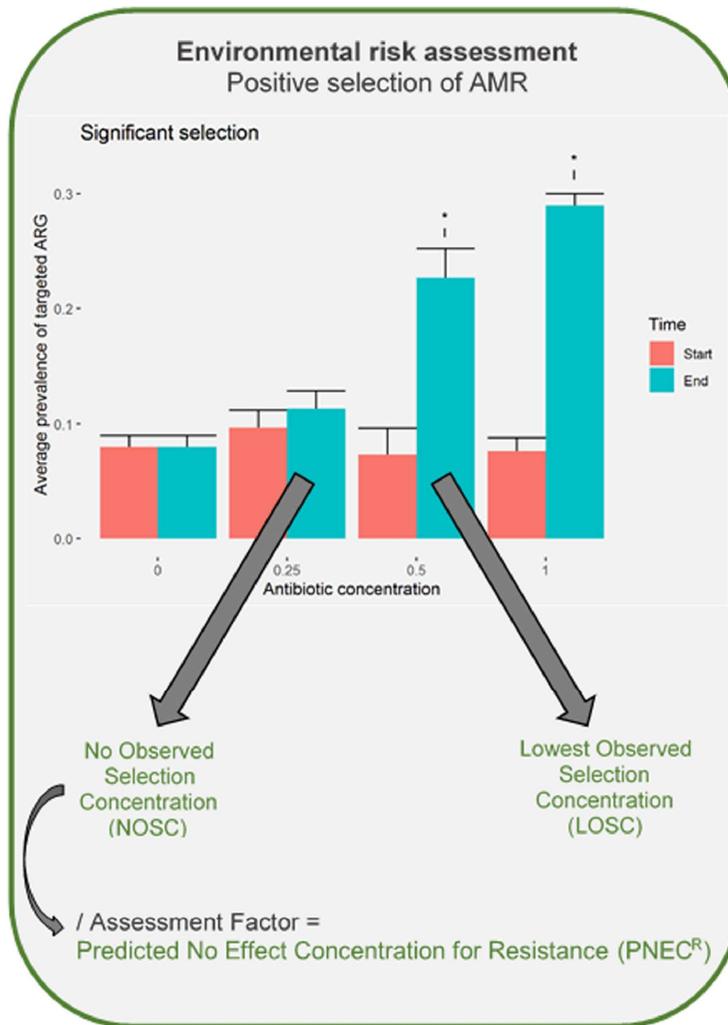
Determinazione del rischio ambientale

PEC (predicted environmental concentration)
o MEC (measured environmental concentration)
_____ = RQ (RISK QUOTIENT)

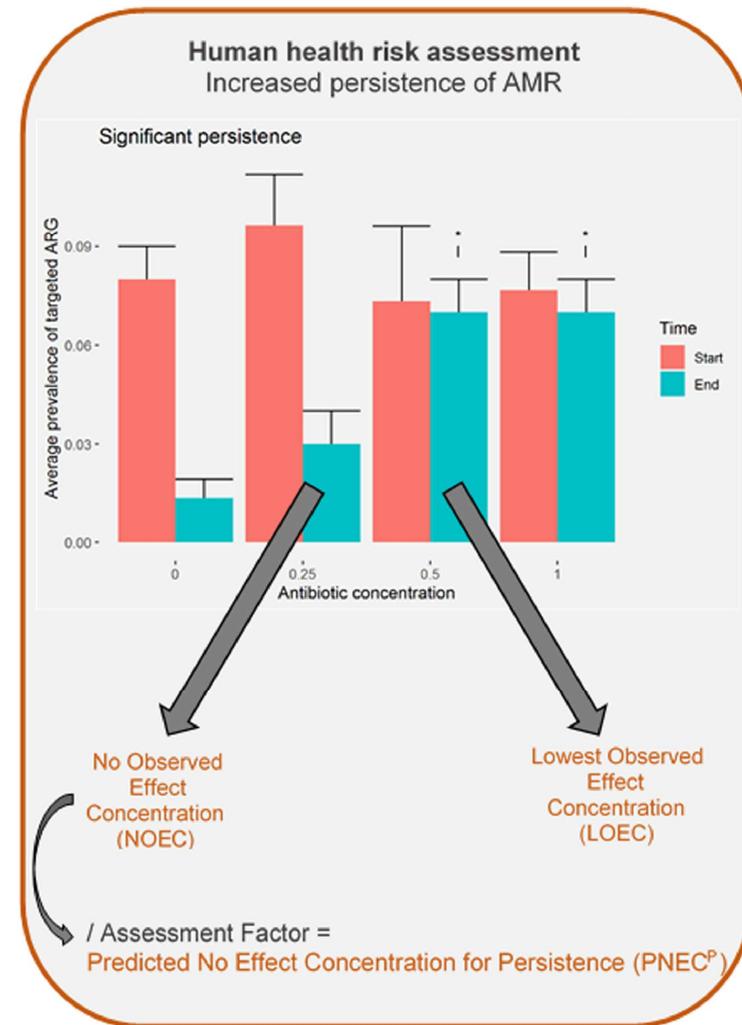
PNEC (predicted no effect concentration)

Le PNECs (Predicted no effect concentrations), stabilite con criteri ecotossicologici, non sono necessariamente protettive anche nei confronti della selezione di AMR

- **Le Agenzie Regionali per la Protezione Ambientale dovranno impegnarsi in attività sperimentali per la determinazione della PNEC^R**



PNEC^R →



Murray et al., 2021

Assessment factor (AF): costruito in base al tipo di esposizione (acuta vs cronica) e agli studi scientifici

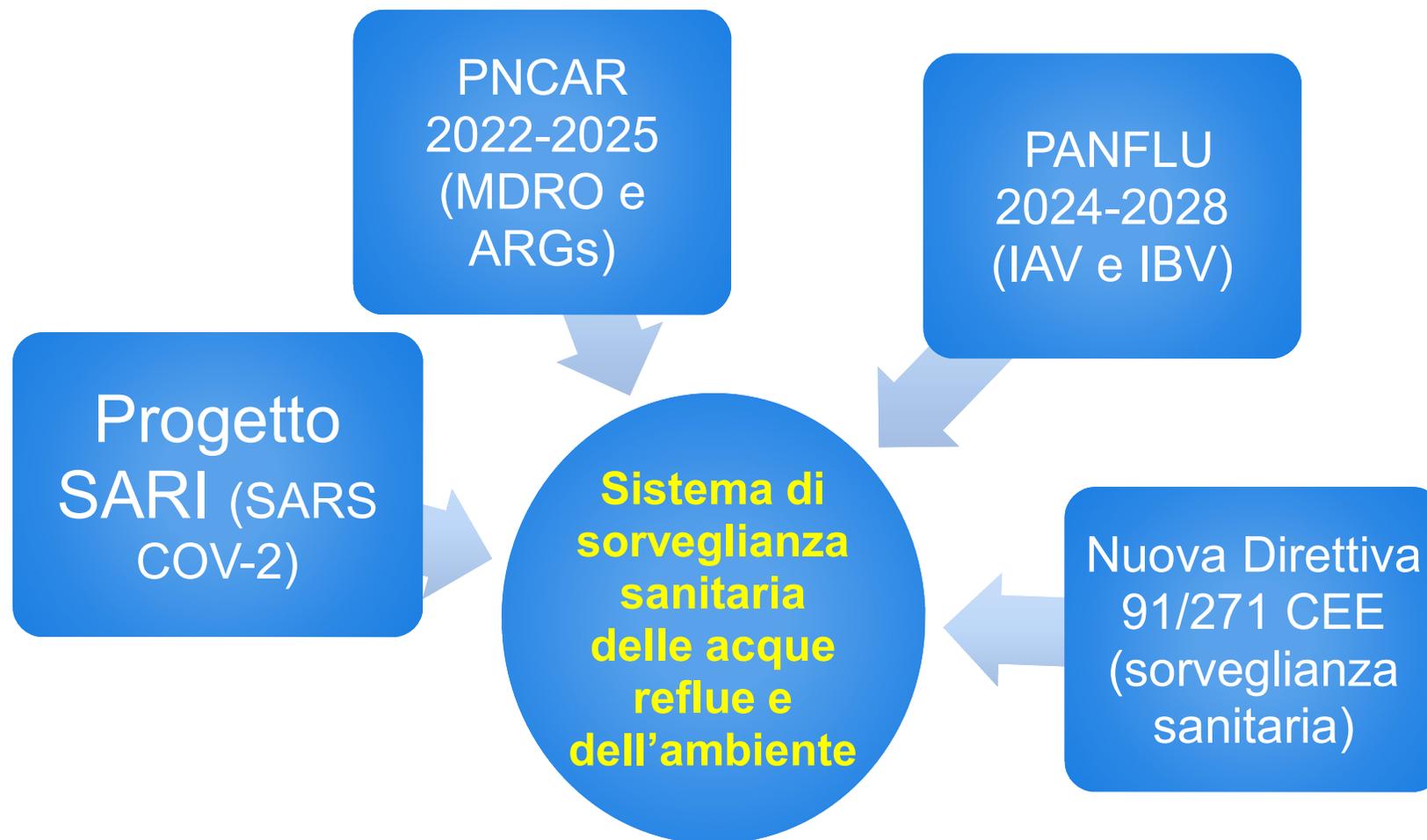
Necessità di un cronoprogramma differenziato!

2024: avvio ricerca MDRO in acque reflue urbane e acque superficiali?

2025: avvio ricerca geni di resistenza in reflui urbani e acque superficiali?

> 2025: avvio ricerca residui antibiotici?

Progetti diversi stanno convergendo verso la creazione di un sistema di sorveglianza sanitaria basato sulle acque reflue



GRAZIE PER L'ATTENZIONE!

Per approfondimenti: corso ECM online Antimicrobico-resistenza in ottica One Health

<https://www.izsvenzie.it/corso-ecm-online-antimicrobico-resistenza-one-health/>

