



# RAPPORTI ISTISAN 21|3

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

## **Approccio ambientale all'antimicrobico-resistenza**

S. Giardina, S. Castiglioni, G. Corno, R. Fanelli,  
C. Maggi, L. Migliore, M. Sabbatucci,  
G. Sesta, C. Zaghi, E. Zuccato



AMBIENTE  
E SALUTE



# ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

## **Approccio ambientale all'antimicrobico-resistenza**

Silvia Giardina (a), Sara Castiglioni (b), Gianluca Corno (c),  
Roberto Fanelli (b), Chiara Maggi (d), Luciana Migliore (e),  
Michela Sabbatucci (f), Giulio Sesta (d),  
Carlo Zaghi (g), Ettore Zuccato (b)

*(a) Direzione Generale per il Patrimonio Naturalistico,  
Ministero della Transizione Ecologica, Roma*

*(b) Istituto di Ricerche Farmacologiche Mario Negri - IRCCS, Milano*

*(c) Istituto di Ricerca sulle Acque- Consiglio Nazionale delle Ricerche, Verbania*

*(d) Area Chimica del Centro Nazionale per la Rete Nazionale dei Laboratori, Istituto  
Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, Roma*

*(e) Dipartimento di Biologia, Università degli Studi di Roma "Tor Vergata", Roma*

*(f) Dipartimento Malattie Infettive, Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(g) Direzione Generale per il Mare e le Coste, Ministero della Transizione Ecologica, Roma*

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

**Rapporti ISTISAN  
21/3**

Istituto Superiore di Sanità

**Approccio ambientale all'antimicrobico-resistenza.**

Silvia Giardina, Sara Castiglioni, Gianluca Corno, Roberto Fanelli, Chiara Maggi, Luciana Migliore, Michela Sabbatucci, Giulio Sesta, Carlo Zaghi, Ettore Zuccato  
2021, iii, 40 p. Rapporti ISTISAN 21/3

Sebbene un livello naturale di Antimicrobico-Resistenza (AMR) sia presente in qualsiasi comunità microbica, l'uso eccessivo, protratto e improprio di antimicrobici in attività umane e veterinarie ha favorito lo sviluppo e la diffusione di resistenze antimicrobiche in tutto il pianeta. L'abbondanza e la diversità dei geni di resistenza e dei batteri resistenti presenti nell'ambiente sono strettamente correlate all'impatto locale delle attività antropiche che coinvolgono uso o emissione di antibiotici (allevamenti zootecnici e impianti di acquacoltura intensivi, scarichi fognari urbani e sanitari). Questi si diffondono nell'ambiente tramite molteplici vie di contaminazione, sia come principi attivi non utilizzati sia come metaboliti. In molti Paesi è assente un monitoraggio rappresentativo delle dinamiche di diffusione dell'AMR nell'ambiente, prerequisito fondamentale per sviluppare azioni di prevenzione e abbattimento. Questo rapporto inquadra l'impatto ambientale dell'AMR nel contesto italiano e propone le azioni prioritarie volte a facilitare la corretta gestione ambientale di questa minaccia per la salute.

*Parole chiave:* Antimicrobico-resistenza; Ambiente; Contaminazione ambientale; Antibiotici; Valutazione di rischio; Salute umana

Istituto Superiore di Sanità

**Environmental approach to antimicrobial resistance.**

Silvia Giardina, Sara Castiglioni, Gianluca Corno, Roberto Fanelli, Chiara Maggi, Luciana Migliore, Michela Sabbatucci, Giulio Sesta, Carlo Zaghi, Ettore Zuccato  
2021, iii, 40 p. Rapporti ISTISAN 21/3 (in Italian)

Although a natural level of Antimicrobial Resistance (AMR) is present in any microbial community, the excessive, protracted and improper use of antimicrobials in human and veterinary activities has favoured the development and spread of antimicrobial resistance throughout the planet. The abundance and diversity of resistance genes and resistant bacteria present in the environment are closely related to the local impact of anthropic activities involving the use or emission of antibiotics (livestock farms and intensive aquaculture facilities, urban and sanitary sewage). These antibiotics spread in the environment through multiple contamination pathways, both as unused active ingredients and as metabolites. In many countries there is no monitoring that can represent the dynamics of diffusion of AMR in the environment, a fundamental prerequisite for developing prevention and reduction actions. This report outlines the environmental impact of AMR in the Italian context and proposes priority actions aimed at facilitating the proper environmental management of this threat to health.

*Key words:* Antimicrobial resistance; Environment; Environmental contamination; Antibiotics; Risk assessment; Human health

Per informazioni su questo documento scrivere a: [michela.sabbatucci@iss.it](mailto:michela.sabbatucci@iss.it), [giardina.silvia@minambiente.it](mailto:giardina.silvia@minambiente.it)

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it)

Citare questo documento come segue:

Giardina S, Castiglioni S, Corno G, Fanelli R, Maggi C, Migliore L, Sabbatucci M, Sesta G, Zaghi C, Zuccato E. *Approccio ambientale all'antimicrobico-resistenza*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2021. (Rapporti ISTISAN 21/3).

---

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Silvio Brusaferrò*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Paola De Castro*

Redazione: *Sandra Salinetti*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



# INDICE

<b>Acronimi</b> .....	iii
<b>1. Resistenza antimicrobica e ambiente</b> .....	1
1.1. Consumo di antibiotici e produzione di nuovi antimicrobici .....	2
1.2. Antimicrobico-resistenza nell'attuale contesto COVID-19 .....	4
1.3. Importanza di un approccio One Health .....	5
<b>2. Analisi del problema</b> .....	9
2.1. AMR e ambiente: vie di contaminazione delle matrici ambientali .....	9
2.2. Propagazione dell'AMR dall'ambiente e implicazioni per la salute umana .....	12
2.3. Effetti di basse dosi di antibiotico e ormesi .....	12
<b>3. Strumenti normativi e orientamenti principali</b> .....	14
3.1. Direttiva acque e Watch List.....	14
3.1.1. Watch List – primo elenco (WL1).....	15
3.1.2. Revisione della Watch List – secondo elenco (WL2).....	16
3.1.3. Seconda revisione della Watch List – terzo elenco (WL3).....	18
3.2. Contrasto all'AMR e limiti dell'approccio legislativo attuale nel settore dei farmaci ad uso umano e ad uso veterinario .....	19
3.3. Cenni sulle linee guida dell'EMA per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci ad uso umano e veterinario, con particolare riferimento agli antimicrobici.....	21
3.3.1. Farmaci ad uso umano .....	21
3.3.2. Farmaci ad uso veterinario.....	22
3.3.3. Antimicrobici.....	23
3.4. Approccio regolatorio per la gestione dell'AMR.....	23
<b>4. PNCAR e ambiente: elementi prioritari d'intervento</b> .....	26
4.1. Innovazione nei sistemi di depurazione dei reflui civili e ospedalieri: possibilità di intervento .....	26
4.2. Prospettive di innovazione nella gestione degli allevamenti intensivi .....	27
4.3. Informazione ed educazione della popolazione a un corretto uso e smaltimento degli antimicrobici .....	28
4.4. Lacune conoscitive da colmare mediante attività di ricerca sul rapporto tra AMR e ambiente.....	28
<b>Bibliografia</b> .....	30



## ACRONIMI

<b>ARG</b>	<i>Antimicrobial Resistance Genes</i> (geni dell'antimicrobico resistenza)
<b>AMR</b>	<i>AntiMicrobial Resistance</i> (resistenza antimicrobica)
<b>CAS</b>	<i>Chemical Abstracts Service</i>
<b>COVID-19</b>	<i>Coronavirus disease 2019</i> (malattia da coronavirus SARS-CoV-2 del 2019)
<b>DDD</b>	<i>Defined Daily Doses</i> (dose definita giornaliera)
<b>ECDC</b>	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
<b>EIC</b>	<i>Expected Introduction Concentration</i>
<b>EMA</b>	<i>European Medicines Agency</i> (agenzia europea per i medicinali)
<b>ERA</b>	<i>Environmental Risk Assessment</i> (valutazione del rischio ambientale)
<b>ESBL-EC</b>	<i>Extended-spectrum <math>\beta</math>-lactamase-producing Escherichia coli</i> ( <i>Escherichia coli</i> produttore di $\beta$ -lattamasi a spettro esteso)
<b>ESVAC</b>	<i>European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption</i> (sorveglianza europea del consumo di antimicrobici veterinari)
<b>EU/AEE</b>	Europa/Area Economica Europea
<b>FAO</b>	<i>Food and Agriculture Organization</i> (Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura)
<b>GC-MS</b>	<i>Gas Chromatography-Mass Spectrometry</i> (gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa)
<b>IACG</b>	<i>InterAgency Coordination Group</i> (gruppo di coordinamento inter-agenzie)
<b>JRC</b>	<i>Joint Research Centre</i>
<b>LC-MS-MS</b>	<i>Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry</i> (cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa tandem)
<b>LLE</b>	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> (estrazione liquido-liquido)
<b>LOQ</b>	<i>Limit Of Quantification</i> (limite di quantificazione)
<b>MIC</b>	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (concentrazione minima inibitoria)
<b>OECD</b>	<i>Organisation for Co-operation and Development</i>
<b>OGM</b>	Organismi Geneticamente Modificati
<b>OIE</b>	<i>World Organisation for Animal Health</i> (organizzazione mondiale per la salute animale)
<b>pAmpC-EC</b>	<i>Plasmid-mediated AmpC-producing Escherichia coli</i>
<b>PBT</b>	<i>Persistent Bioaccumulative and Toxic</i>
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>PEC</b>	<i>Predicted Environmental Concentration</i>
<b>PNEC</b>	<i>Predicted No Effect Concentration</i> (concentrazione prevedibile priva di effetti)
<b>REACH</b>	<i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i>
<b>SARS-CoV-2</b>	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2</i>
<b>SDG</b>	<i>Sustainable Development Goal</i> (obiettivo di sviluppo sostenibile)
<b>SPE</b>	<i>Solid Phase Extraction</i> (estrazione in fase solida)
<b>STE</b>	<i>Spatial Temporal and Extent</i> (delle eccedenze rispetto ai valori di PNEC)
<b>VMP</b>	<i>Veterinary Medicinal Products</i> (prodotti medicinali veterinari)
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i> (Organizzazione Mondiale della Sanità)
<b>WL</b>	<i>Watch List</i> (Elenco di Controllo)



# 1. RESISTENZA ANTIMICROBICA E AMBIENTE

La resistenza antimicrobica (*Antimicrobial Resistance*, AMR) è la resistenza sviluppata da alcuni microrganismi a un medicinale antimicrobico a cui erano precedentemente sensibili, mediante mutazioni o acquisizione di elementi genetici di resistenza. I microrganismi resistenti (tra cui batteri, virus, funghi, protozoi ed elminti) sono quindi in grado di resistere all'azione di farmaci come antibiotici, antivirali e antiparassitari, e di causare infezioni persistenti. Pertanto, l'AMR è una grave minaccia per la salute umana e una sfida per la sicurezza globale con significative implicazioni economiche.

L'AMR mette in pericolo la sicurezza alimentare, il commercio internazionale, lo sviluppo economico e mina i progressi verso gli obiettivi di sviluppo sostenibile (*Sustainable Development Goals*, SDG) definiti dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (*World Health Organization*, WHO), oltre a determinare l'aumento dei costi sanitari legati a degenze prolungate, necessità di terapie spesso più costose e maggior utilizzo di tecniche diagnostiche, complicanze, decessi e contenziosi.

L'uso eccessivo e improprio di antibiotici in medicina umana e veterinaria ha promosso lo sviluppo e la proliferazione di resistenze specifiche nelle comunità batteriche esposte agli effetti delle attività umane in tutto il pianeta (United Nations, 2016). Questa situazione, drammatica a livello clinico umano e zootecnico, dove una resistenza in molti casi si traduce direttamente in una infezione di difficile o impossibile trattamento, vede un ruolo diretto dell'ambiente in cui viviamo sia come ricettore che come promotore dello sviluppo di determinanti di resistenza (batteri resistenti e geni che conferiscono resistenza agli stessi). È ampiamente dimostrato infatti che l'abbondanza e la diversità dei geni di resistenza e di batteri resistenti in ambiente (acque di superficie, suoli, foreste) è strettamente correlata all'impatto causato localmente dalle attività umane (Gaze *et al.*, 2011). Nel dettaglio: sebbene un *background* di resistenza cosiddetta naturale è presente in qualsiasi comunità batterica, c'è forte evidenza che il numero totale di geni di resistenza in una comunità batterica sia anche tre o quattro ordini di grandezza più elevato in presenza di pressione di origine antropica (Di Cesare *et al.*, 2015).

Inoltre, è stato diffusamente dimostrato come sia la diversità del resistoma (il numero di diversi geni di resistenza presenti in un dato ambiente) che le resistenze sviluppate sono legate allo stress antropico in quanto, in presenza di quest'ultimo, abbondano in ambiente resistenze ad antibiotici sintetici o semi-sintetici non presenti in natura. Infatti, è sufficiente una presenza umana sporadica per introdurre antibiotico-resistenze anche in comunità naturali remote e protette (Thaller *et al.*, 2010; Di Cesare *et al.*, 2015). Evidentemente, numerosi fattori concorrono ad aumentare il rischio di trasferimento delle resistenze dalle comunità microbiche naturali a batteri patogeni umani e animali.

Ad oggi, il ciclo dell'antibiotico-resistenza in ambiente è ancora in parte oscuro, non tanto nell'identificazione delle sorgenti di contaminazione e del rischio per l'uomo che questa sottende, ma piuttosto per una corretta conoscenza dei fenomeni naturali e delle interazioni ecologiche e ambientali che promuovono la stabilizzazione e anche la proliferazione di resistenze di origine umana in ambiti naturali. La discussione è stata innescata da studi con risultati contrastanti: Gilliver *et al.* (1999) avevano dimostrato una notevole prevalenza di tratti di antibiotico-resistenza acquisita in batteri fecali di roditori selvatici di aree boschive in cui non c'era rilascio di antibiotici (Nord-Ovest dell'Inghilterra), invece Österblad *et al.* (2001) non avevano trovato resistenze negli enterobatteri fecali di roditori selvatici e ungulati di aree remote della Finlandia. Molti lavori hanno messo in evidenza la presenza di tratti di resistenza acquisiti nel microbiota commensale

di vari animali della fauna selvatica, principalmente mammiferi e uccelli, sia in ambienti remoti sia promiscui (per una panoramica, vedere Pallecchi *et al.*, 2008).

Inoltre, è completamente da definire l'ampiezza del problema e del rischio sotteso in quanto, se sono presenti modelli ambientali e modelli sperimentali di assoluta qualità (in Italia il sistema del Lago Maggiore), nel nostro Paese come in molte nazioni manca del tutto un monitoraggio massivo e geograficamente significativo delle dinamiche di antibiotico-resistenza, che è fondamentale per poi sviluppare azioni di mitigazione dell'inquinamento, sia a livello locale, che regionale o nazionale. Mancano inoltre studi epidemiologici su larga scala che dimostrino l'ampiezza del rischio di "ritorno" delle resistenze sviluppate in ambiente all'uomo, sia come presenza di geni di resistenza nel microbioma umano, sia come introduzione nell'uomo di batteri patogeni resistenti, come dimostrato da studi sporadici, tra i surfisti del Regno Unito (Leonard *et al.*, 2018) o nelle popolazioni di aree particolarmente inquinate in India (Sasikaladevi *et al.*, 2020).

Questa situazione è alquanto annosa in Italia dove i dati sul consumo di antibiotici (umano e veterinario) e sui ceppi resistenti riconosciuti in ambito ospedaliero variano in modo estremo da regione a regione (e ancor di più tra provincia e provincia), suggerendo anche un diverso carico ambientale e quindi la necessità di sviluppare azioni mirate di controllo e abbattimento che non possono essere uniche a livello nazionale (AIFA, 2019).

## 1.1. Consumo di antibiotici e produzione di nuovi antimicrobici

La resistenza ai farmaci antimicrobici è un fenomeno evolutivo naturale, tuttavia le attività umane contribuiscono pesantemente allo sviluppo e alla diffusione di microrganismi resistenti.

Nel mondo, uno dei fattori antropici che maggiormente contribuisce all'aumento dei livelli di AMR è l'uso di farmaci antibiotici, soprattutto se inappropriato in termini di tipo di principio attivo utilizzato rispetto alla patologia, durata del trattamento, modalità di smaltimento o riuso. Independentemente dall'uso di antibiotici, durante la pandemia di COVID-19, il consumo di questi farmaci è rimasto massiccio a livello globale e in particolare in alcuni Paesi.

In Italia, nell'ultimo decennio, il consumo di antibiotici per uso sistemico in comunità, espresso come dose definita giornaliera per 1000 abitanti (*Defined Daily Doses*, DDD), è stato sempre più elevato rispetto al consumo medio europeo. Infatti, da un valore massimo di 23,3 DDD per 1000 abitanti/giorno nel 2013, il consumo di antibiotici per uso sistemico in Italia è lentamente diminuito fino a raggiungere un valore di 19,8 nel 2019, contro un valore massimo medio in Europa e nell'Area Economica Europea (EU/AEE) di 19,7 nel 2015, diminuito fino a 18,0 nel 2019, con una variabilità ampia tra i Paesi registrata tra 8,7 e 32,4 (ECDC, 2020). In particolare, nel periodo 2016-2019 in Italia è stato rilevato un consumo di antibiotici in diminuzione (-5,8%) nell'assistenza convenzionata e in aumento nell'assistenza ospedaliera (+9,9%). Nel 2019, in Italia si è registrato un consumo di fluorochinoloni in riduzione di oltre un terzo, sia nell'assistenza convenzionata sia in quella ospedaliera, mentre un aumento del consumo di cefalosporine orali (+9,1% nel 2019 vs. 2018) nell'assistenza convenzionata e del consumo di carbapenemi (+10,1% nel 2019 vs. 2018) nell'assistenza ospedaliera (Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali, 2020).

A livello globale, oltre due terzi di tutti gli antimicrobici venduti viene utilizzato nella produzione animale alimentare (Van Boeckel *et al.*, 2019). In ambito veterinario, l'ultimo rapporto sulla sorveglianza europea del consumo di antimicrobici veterinari (*European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption*, ESVAC) pubblicato nell'ottobre 2020

indica che le vendite di antibiotici per uso animale nell’AEE e in Svizzera sono diminuite di oltre il 34% nel periodo tra il 2011 e il 2018 (EMA, 2020).

Nonostante i progressi compiuti nel settore veterinario, la minaccia sanitaria dovuta all’AMR permane in Europa e non solo. A fronte della consistente immissione quotidiana di antibiotici nell’ambiente, a livello globale, la *pipeline* dei prodotti antimicrobici in sviluppo clinico e preclinico è limitata, ed è stata dichiarata insufficiente dalla WHO.

A settembre 2019, erano in fase di sviluppo clinico 49 antibiotici e 10 prodotti biologici, tuttavia gli antibiotici in fase III erano soltanto 14 e, tra questi, 12 potrebbero rivelarsi efficaci nel trattamento di almeno uno dei patogeni prioritari indicati dalla WHO, mentre solo 2 potrebbero essere attivi contro batteri Gram-negativi multi-resistenti.

Circa un terzo della *pipeline* clinica viene definito un prodotto innovativo (WHO, 2019). I prodotti in fase preclinica di sviluppo sono più innovativi, ma saranno necessari anni prima di poterli utilizzare, in quanto la loro efficacia e sicurezza deve essere ancora provata. I prodotti antibatterici preclinici (252) sono in sviluppo soprattutto nel continente europeo (128 prodotti) e nelle Americhe (86), mentre poche decine (26 nella regione del Pacifico Orientale, 11 nel sud-est Asiatico, 1 in Africa) sono in sviluppo nel resto del mondo. Tra questi, solo il 19% (49 prodotti) saranno impiegati nel trattamento di batteri Gram-negativi inclusi nella lista WHO dei patogeni a priorità critica, e il 10% (24 prodotti) per trattamento di batteri Gram-positivi di interesse prioritario (WHO, 2019).

Inoltre, esiste un circuito non virtuoso nell’accesso ai farmaci antimicrobici che potrebbe ben presto avere ripercussioni devastanti. Infatti il modello attuale, secondo cui la distribuzione globale di un farmaco avviene attraverso una multinazionale farmaceutica, funziona in modo ottimale laddove i ricavi economici e le necessità terapeutiche si sovrappongono al meglio. In particolare, i Paesi ad alto reddito sono interessati da una piccola frazione delle infezioni resistenti globali, ma attualmente generano la maggior parte dei ricavi di vendita dei farmaci. Invece, i nuovi prodotti antimicrobici in via di sviluppo e commercializzazione sarebbero più necessari nei Paesi a basso e medio reddito, dove si concentra la proporzione maggiore delle infezioni resistenti, Paesi questi non attrattivi dal punto di vista economico per i produttori farmaceutici. Pertanto, si stima che i pochi nuovi prodotti antimicrobici disponibili non raggiungeranno la maggior parte dei pazienti che ne hanno bisogno, portando nel tempo a un peggioramento del divario geografico nell’accesso ai farmaci (Conferenza “Translating AMR R&D mapping into policy and action”, Global AMR R&D Hub, 2 dicembre 2020; Kakkar *et al.*, 2020). Per esempio, a livello globale solo circa il 10% dei finanziamenti distribuiti per la ricerca e lo sviluppo in tema di AMR è destinato a Paesi diversi da quello finanziatore. Questa proporzione aumenta fino a circa un terzo dei finanziamenti se si considerano i finanziamenti dell’UE (Global AMR R&D Hub, 2021).

Questo scenario è ancora più preoccupante se si considera la previsione secondo cui le infezioni resistenti causate da batteri Gram-negativi, che si verificano in modo sproporzionato nei Paesi non ad alto reddito, aumenteranno notevolmente nel prossimo ventennio.

Come abbiamo verificato nel corso dell’attuale emergenza pandemica, le malattie infettive non hanno confini geografici e pertanto, questo scenario complesso richiede interventi urgenti e condivisi tra i vari Paesi, mirati da un lato all’uso prudente degli antimicrobici attualmente disponibili, per preservarne l’efficacia terapeutica, e dall’altro all’investimento in attività di ricerca e sviluppo.

## 1.2. Antimicrobico-resistenza nell'attuale contesto COVID-19

Mentre il mondo continua a combattere l'emergenza pandemica da SARS-CoV-2 per limitare il numero gravoso dei decessi associati a COVID-19, la diffusione dell'infezione e il collasso delle strutture sanitarie, è essenziale rimanere vigili e impegnati nel contrasto allo sviluppo e alla diffusione della resistenza microbica. Sia la pandemia di COVID-19 sia quella dell'AMR infatti, sono minacce sanitarie globali che richiedono un approccio condiviso delle politiche sanitarie rilevanti nei vari Paesi e a tutti i livelli della società.

Se da un lato il numero dei decessi COVID-19 continua ad aggravarsi in tutto il mondo, l'ultimo rapporto europeo sull'AMR (ECDC, 2020) continua a fornire dati estremamente preoccupanti: in Europa, oltre 33 mila decessi l'anno sono associati ad infezioni antimicrobico-resistenti e, tra questi, oltre 10 mila decessi continuano a verificarsi in Italia.

Il nostro Paese contribuisce dunque alla meno nota pandemia di AMR per circa un terzo dei decessi che si verificano in Europa ogni anno. L'interazione di queste emergenze sanitarie potrebbe avere conseguenze importanti (Nieuwlaat *et al.*, 2020), che rimangono ancora incerte. Un'indagine inglese ha recentemente riportato che la maggior parte delle attività di contrasto all'AMR sono state influenzate negativamente dall'emergenza pandemica (Ashiru-Oredope *et al.*, 2021). L'impatto dell'emergenza pandemica di COVID-19 sull'AMR assume un'importanza ancora maggiore nei Paesi in via di sviluppo, dove i dati sui livelli di resistenza antimicrobica sono scarsi, esistono condizioni sociosanitarie e climatiche che favoriscono la trasmissione di patogeni infettivi e le risorse terapeutiche non sono ottimali (Reverter *et al.*, 2020; Kaba *et al.*, 2020; Mentor *et al.*, 2021; Majumder *et al.*, 2020).

In genere, le infezioni virali respiratorie predispongono i pazienti a complicazioni batteriche. Per esempio, la maggioranza dei decessi avvenuti durante la pandemia influenzale del 1918 erano stati causati da conseguenti infezioni batteriche, come anche avvenuto durante le ultime tre pandemie del XXI secolo: quella causata dai ceppi H2N2 del 1957 e H3N2 del 1969, e quella da H1N1 degli anni 2009-2010 (Morris *et al.*, 2017). Durante l'attuale pandemia, alcune ricerche (condotte in Germania, Italia, USA) hanno segnalato focolai con infezioni dovute a batteri multiresistenti o comunque un aumento di questo tipo di infezioni (Kampmeier *et al.*, 2020; Nori *et al.*, 2020; Porretta *et al.*, 2020; Tiri *et al.*, 2020), mentre altri studi (condotti per esempio in Francia e Spagna) non hanno rilevato un aumento delle infezioni causate da batteri multiresistenti durante l'attuale emergenza pandemica (Contou *et al.*, 2020; Garcia-Vidal *et al.*, 2020). Uno studio italiano ha evidenziato una riduzione delle infezioni da *Clostridioides difficile* in pazienti COVID-19 ricoverati (Bentivegna *et al.*, 2020), mentre Fattorini *et al.* hanno calcolato che solo l'1,3% di 522 pazienti COVID-19 ricoverati in reparti di Terapia Intensiva in Italia aveva avuto una superinfezione causata da batteri multiresistenti (Fattorini *et al.*, 2020). Nei pazienti COVID-19 sono state riportate infezioni fungine invasive (Chowdhary *et al.*, 2020; Posteraro *et al.*, 2020).

I fattori che possono influenzare l'AMR durante la pandemia da COVID-19, a livello globale, sono molteplici. Si stima che durante il primo semestre del 2020, nel tentativo di prevenire l'aggravamento del quadro clinico, siano stati trattati con almeno un medicinale antibiotico circa i due terzi dei casi COVID-19 ospedalizzati, nonostante l'infezione batterica sia stata riscontrata solo in una minima proporzione di questi pazienti (Rawson *et al.*, 2020; Langford *et al.*, 2020). Soprattutto, è stata utilizzata una terapia antibiotica empirica ad ampio spettro, spesso per la difficoltà di consultare un infettivologo prima della prescrizione (Cantón *et al.*, 2020) o per la carenza di antibiotici a spettro ristretto (EAHP, 2018; ReAct, 2020). Circa il 16% dei pazienti ospedalizzati con COVID-19 inoltre, aveva sviluppato una seconda infezione batterica (Rawson *et al.*, 2020a), necessitando quindi di un ulteriore trattamento antibiotico. Inoltre, nel corso di

questa emergenza pandemica il rispetto delle misure di prevenzione e controllo delle infezioni nel *setting* ospedaliero è stato difficile in molte realtà, anche italiane, per l’iniziale carenza dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI) da parte del personale sanitario (Ford, 2020), per il prolungamento delle degenze, il sovraffollamento delle strutture di cura (Donà *et al.*, 2020) e la temporanea diminuzione degli screening per l’identificazione dei soggetti colonizzati con microrganismi resistenti (Stevens *et al.*, 2020). Di contro, il posticipo dei ricoveri, sia programmati che urgenti, per i pazienti affetti da patologie diverse da COVID-19 ha comportato un minor uso degli antibiotici (Mulholland *et al.*, 2020; Sokolski *et al.*, 2020), mentre il rafforzamento delle misure di prevenzione, come la diffusa raccomandazione a una scrupolosa igiene delle mani e la maggiore frequenza della pulizia ambientale, insieme alle misure di distanziamento fisico e sociale adottate durante la pandemia, inclusa la drastica riduzione degli spostamenti nazionali e internazionali, potrebbero aver diminuito la frequenza e la diffusione delle infezioni resistenti. Solo in futuro, quindi, potremo verificare il reale effetto, a livello globale e locale, della pandemia di COVID-19 sull’AMR. Sono necessari investimenti per il miglioramento delle infrastrutture per le acque reflue, insieme a programmi di monitoraggio globale e collaborazioni multidisciplinari per comprendere l’impatto ambientale di questa pandemia (Usman *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2020). Sarebbe inoltre auspicabile e urgente sviluppare protocolli di terapia antibiotica specifica per COVID-19 che tengano in considerazione l’impatto delle misure pandemiche sull’AMR, oltre a strategie coordinate a livello sanitario e politico (Rawson *et al.*, 2020b).

### 1.3. Importanza di un approccio *One Health*

Molte attività antropiche esercitano un’azione favorente e selettiva sullo sviluppo delle resistenze nei microrganismi esistenti in natura. Per esempio, l’uso di antibiotici, soprattutto se inappropriato, induce una pressione selettiva sui batteri presenti nel nostro corpo, che possono sviluppare una resistenza a questi farmaci. Espulsi principalmente attraverso feci e urine, questi batteri resistenti possono contaminare l’ambiente e trasmettere i determinanti genetici dell’antibiotico-resistenza ad altri microrganismi presenti nell’ambiente e al microbioma di animali e piante. Inoltre, occorre considerare che il corpo umano espelle anche buona parte dei farmaci assunti. Infatti, una quota consistente di un principio attivo terapeutico, variabile tra il 30% e il 90%, non viene assimilato ed è quindi escreto negli scarichi domestici e ospedalieri (Tyrrell *et al.*, 2019). Non solo, ogni anno vengono vendute nel mondo decine di migliaia di tonnellate di farmaci per uso umano o veterinario, ma le quantità non utilizzate non vengono smaltite in maniera adeguata, contribuendo così a contaminare l’ambiente. Pertanto, batteri resistenti, metaboliti di antibiotici e residui di medicinali finiscono nelle acque reflue urbane e negli impianti di depurazione delle acque, e poiché neanche le tecnologie più avanzate riescono a eliminarli del tutto, contaminano corsi d’acqua, inclusi laghi e mari, acque irrigue e acqua potabile (Castiglioni *et al.*, 2018; Riva *et al.*, 2018).

Una volta nell’ambiente, il farmaco, a seconda delle caratteristiche chimico-fisiche, viene degradato oppure può accumularsi. Alcuni antibiotici hanno una vita media nell’ambiente superiore ad 1 anno, altri possono contaminare l’ambiente per decenni (Pan & Chu, 2017). Nonostante le diverse caratteristiche di persistenza che variano da classe a classe, gli antibiotici e più in generale i farmaci, vengono generalmente definiti “semi persistenti” poiché il loro utilizzo è continuo e massiccio: quantitativi rilevanti vengono immessi quotidianamente nell’ambiente in seguito all’uso in medicina umana e veterinaria. In pratica, anche se alcune sostanze si degradano rapidamente nell’ambiente, risultano sempre presenti a causa dell’immissione continua. Inoltre, molti principi attivi per il trattamento delle malattie infettive umane vengono utilizzati anche nella

medicina veterinaria. Numerose sostanze antimicrobiche sono quindi comunemente presenti nelle acque dei fiumi e dei laghi di aree densamente popolate, in concentrazioni relativamente basse, ma ancora potenzialmente tossiche (Castiglioni *et al.*, 2018) esponendo gli organismi acquatici a un contatto cronico.

Anche molti processi di produzione industriale, fattorie agricole, operazioni per l'alimentazione animale, oltre a percolati di discarica e deflusso urbano contribuiscono a questo tipo di inquinamento ambientale. L'inquinamento da farmaci per uso umano e veterinario, documentato da decenni, ha dimensioni globali e correla con la presenza umana. Alcuni studi hanno evidenziato come nelle acque del nord Europa si riscontri una maggiore presenza di sedativi e antidepressivi, mentre nelle aree più a sud del globo i contaminanti medicinali più rilevati sarebbero gli antibiotici (Halling-Sorensen *et al.* 1998; Zuccato *et al.* 2000; Heberer, 2002). Questi prodotti possono favorire e selezionare resistenze antimicrobiche in alcuni microrganismi e, data la velocità di replicazione degli stessi, queste resistenze si diffondono nell'ambiente senza possibilità di controllo. Per esempio, ceppi di *Escherichia coli* produttori di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (*Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing E. coli*, ESBL-EC) o pAmpC (*plasmid-mediated AmpC-producing E. coli*, pAmpC-EC), resistenti ad antibiotici  $\beta$ -lattamici molto importanti per il trattamento di alcune infezioni umane e animali, sono stati isolati sempre più frequentemente, a partire dall'anno 2000, a livello globale, negli animali, negli alimenti, nell'ambiente e nelle infezioni umane acquisite in comunità o associate all'assistenza sanitaria.

Spesso le infezioni umane sono precedute da uno stato di portatore ESBL/pAmpC asintomatico, per cui è difficile stabilire l'origine di queste infezioni. In vari studi è stato valutato il contributo relativo di *reservoir* diversi allo stato di portatore intestinale di *E. coli* ESBL o pAmpC, e la trasmissione umana comunitaria risulterebbe la fonte di contaminazione principale, seguita dagli alimenti e dal contatto con animali da compagnia, mentre l'attività ricreativa in acque superficiali o il contatto con volatili selvatici contribuirebbero in minima parte. In anni recenti, è stato stimato che dal 10% al 30% degli isolati clinici di *E. coli* che producono ESBL possono provenire da allevamenti animali, anche se questa proporzione dipende dal livello di dettaglio con cui vengono studiate le relazioni genetiche dei ceppi isolati, ed è soggetta a variazioni di campionamento di tipo geografico, temporale e di fonte (1 Health 4 Food, 2018; Mughini-Gras *et al.*, 2019; Dorado-García *et al.*, 2018). Pertanto, si ritiene che le fonti non-umane abbiano un ruolo molto importante nel mantenere la trasmissione di queste resistenze, e studi longitudinali e un monitoraggio continuo saranno indispensabili per stabilire rischi attribuibili e mettere in atto possibili interventi di sanità pubblica.

I crescenti livelli di AMR nei comuni patogeni di origine alimentare hanno evidenziato la necessità di azioni per migliorare la sicurezza alimentare e il coordinamento tra i diversi settori. Le autorità per la sicurezza alimentare svolgono un ruolo chiave nel rafforzare il quadro giuridico riguardante i residui di antimicrobici negli alimenti. Il *Codex Alimentarius*, che sviluppa standard e linee guida con l'obiettivo di proteggere la salute e facilitare un commercio equo e solidale nel settore alimentare, include le indicazioni per la gestione della resistenza antimicrobica lungo la catena alimentare e nei mangimi per gli animali. L'uso prudente di antimicrobici nella produzione agricola e zootecnica e in acquacoltura è fondamentale per ridurre il rischio di acquisire patogeni resistenti di origine alimentare.

Il sostegno fornito dalla Commissione e dallo *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) all'approccio *One Health* degli Stati Membri non ha ancora prodotto risultati dimostrabili in termini di riduzione dell'AMR (Corte dei Conti europea, 2019). Per esempio, in Italia sono stati riportati isolati resistenti di *E. coli* anche in allevamenti di suini biologici (Österberg *et al.*, 2016), e la presenza di batteri Gram-negativi antibiotico-resistenti, soprattutto *Enterobacterales*, è stata dimostrata in animali marini sia sani che malati, che contribuiscono alla

loro diffusione (Blasi *et al.*, 2020). Anche gli uccelli selvatici sono stati identificati come fonte di ceppi batterici resistenti, per esempio di *Salmonella* spp. (Martín-Maldonado *et al.*, 2020). È stato anche valutato il rischio per la salute umana durante lo svolgimento di attività ricreative nelle acque superficiali (Nappier *et al.*, 2020).

L'impatto dell'AMR indotta dall'uomo nel settore ambientale rimane poco conosciuto e generalmente indagato soltanto a livello locale. In Europa, per la prima volta nel 1993, la Direttiva 93/39/CEE introduceva la necessità di segnalare ogni possibile rischio ambientale potenzialmente correlato all'utilizzo dei prodotti medicinali. Successivamente, l'Agenzia europea per i medicinali (*European Medicines Agency*, EMA) introduceva il principio della valutazione del rischio ambientale per tutti i nuovi farmaci prima della registrazione. Mentre la valutazione annuale del Piano Nazionale Residui (Ministero della Salute, 2019) assicura che la popolazione non sia esposta a sostanze antibatteriche attraverso il consumo di alimenti di origine animale, rimane complesso stabilire quale sia l'impatto sulla salute umana dell'esposizione continua nel tempo a microrganismi resistenti e residui antimicrobici attraverso la matrice ambientale, e vari fattori possono influire sui risultati degli studi di valutazione del rischio, come la sensibilità degli strumenti analitici e la qualificazione del personale addetto ai rilevamenti, il grado di diluizione degli antimicrobici nell'ambiente e i tempi di degradazione ambientale, la possibilità di bioconcentrazione e di biomagnificazione. Per questi motivi, per il contrasto al fenomeno dell'AMR è necessaria una collaborazione globale trasversale, sia fra i Paesi sia tra le competenze dei diversi settori, e sviluppare un'agenda comune per la salute che includa il settore veterinario e ambientale.

Nel 2015, gli Stati Membri della WHO hanno approvato all'unanimità un Piano di azione globale per affrontare l'AMR e la WHO ha richiesto a tutti Paesi un'azione concertata che interessi tutti i settori delle attività umane, con un approccio definito *One Health*. In occasione dell'ultima celebrazione della Settimana mondiale per l'uso consapevole degli antimicrobici (18-24 novembre 2020), le organizzazioni del tripartito – l'Organizzazione delle Nazioni Unite per l'alimentazione e l'agricoltura (*Food and Agriculture Organization*, FAO), l'Organizzazione mondiale per la salute animale (*World Organisation for Animal Health*, OIE) e la WHO –, come parte del loro appello condiviso per un'azione unitaria per preservare e proteggere l'efficacia dei farmaci antimicrobici, hanno annunciato l'istituzione del “Gruppo mondiale dei leader per il contrasto all'AMR con approccio *One Health*” (*One Health Global Leaders Group on Antimicrobial Resistance*). Il gruppo è stato creato per volontà del Gruppo di coordinamento inter-agenzie (*InterAgency Coordination Group*, IACG) e sostenuto dal Segretario Generale delle Nazioni Unite. I suoi componenti, scelti tra capi di governo e Ministri, leader del settore privato e della società civile, ed esperti di livello internazionale, metteranno a frutto la loro leadership, anche politica, per attuare una legislazione più attenta in tema di AMR e catalizzare l'attenzione e l'azione globale per preservare l'efficacia dei farmaci antimicrobici e scongiurare ulteriori conseguenze disastrose della resistenza antimicrobica, proteggendo la salute e il benessere collettivo. Infatti, come dichiarato recentemente anche dal Direttore Generale della FAO, Qu Dongyu, nel suo discorso inaugurale per la prima riunione di questo gruppo mondiale il 26 gennaio 2021, la pandemia di COVID-19 rappresenta anche un'opportunità, poiché siamo tutti più sensibili alla fragilità dei nostri sistemi sanitari e alla necessità di affrontare collettivamente qualsiasi minaccia in modo olistico, coerente, e collettivo.

La necessità di collaborazione intersettoriale, riconoscendo la relazione tra salute umana, salute animale e ambiente, è stata recentemente sottolineata anche dalla Rete europea di regolamentazione dei medicinali per rafforzare ulteriormente le misure nella lotta alla resistenza antimicrobica (Pelfrene *et al.*, 2021). Questo approccio intersettoriale potrà anche favorire la disponibilità di investimenti per l'attuazione dei piani d'azione nazionali per il contrasto all'AMR e per il settore della ricerca e dello sviluppo. In particolare, con lo scopo di supportare il processo

decisionale basato sull'evidenza, e definire le priorità per massimizzare l'impatto e l'efficienza delle risorse e degli sforzi investiti nella ricerca e nello sviluppo in materia di AMR, nel maggio 2018, per volontà dei leader del G20, è stato istituito il *Global AMR R&D Hub*. Questo gruppo internazionale di esperti in AMR e stakeholder, ha realizzato una *dashboard* dinamica pubblica online per migliorare il coordinamento e la collaborazione nell'ambito della ricerca e sviluppo in tema di AMR, che coinvolge il settore umano, veterinario, e ambientale (*One Health*). I dati raccolti in questa *dashboard* riguardano gli investimenti in ricerca e sviluppo in tema di AMR, i prodotti antimicrobici in sviluppo o recentemente approvati, e gli incentivi disponibili in tema di AMR a livello globale. Queste informazioni sono state recentemente analizzate in un primo rapporto (Global AMR R&D Hub, 2020).

Oltre alle attività delle varie organizzazioni che agiscono a livello locale o internazionale nel contrasto all'AMR, rimane importante valutare l'impatto sull'AMR degli interventi operati nei vari settori. La valutazione degli interventi a contrasto dell'AMR, finora, ha riguardato soprattutto il settore umano, e sarebbero necessarie valutazioni intersettoriali. Infatti, sebbene vi siano alcune prove di un effetto positivo della riduzione dell'uso di antibiotici negli animali da allevamento sulla prevalenza di batteri antibiotico-resistenti negli esseri umani (Tang *et al.*, 2017), vi è una mancanza di studi quantitativi sull'impatto di questi interventi in un più ampio contesto socio-economico e *One Health* (Wilton *et al.*, 2002; Naylor *et al.*, 2017). Recentemente, è stato proposto un metodo di valutazione quantitativa degli interventi intersettoriali e *One Health* che è stato applicato alle azioni adottate per contrastare l'AMR (Naylor *et al.*, 2020).

L'AMR incide anche su molti dei 17 obiettivi di sviluppo sostenibile (SDG) adottati da tutti gli Stati Membri delle Nazioni Unite a partire dal 2015 con lo scopo di creare un mondo migliore per le persone e per il nostro pianeta entro il 2030. In particolare, la problematica dell'AMR è specificamente indicata nell'obiettivo "Buona salute e benessere" (SDG 3), e il raggiungimento di molti altri SDG è subordinato all'affrontare l'AMR in modo efficace. Infatti, gli antibiotici sono essenziali per gli esseri umani, così come per la produzione alimentare e animale (SDG 1, 2, 8). Inoltre, la non corretta gestione di rifiuti sanitari e acque reflue può contaminare le falde acquifere, l'acqua potabile e il suolo con antibiotici o batteri resistenti (SDG 6,12). Infine, la collaborazione è un prerequisito indispensabile per contrastare l'AMR e il Tripartito (WHO, FAO e OIE), ha adottato l'approccio *One Health* per affrontare questa grave minaccia sanitaria (SDG 17).

Considerato quindi l'attuale contesto pandemico, l'elevato consumo di antibiotici nel mondo e la necessità di misure condivise e intersettoriali per il contrasto alla resistenza antimicrobica, il presente rapporto raccoglie le evidenze disponibili in Italia in tema di AMR e ambiente, e fornisce indicazioni sugli elementi prioritari d'intervento quali l'informazione e l'educazione della popolazione ad un corretto uso e smaltimento degli antimicrobici, l'attività di ricerca e training specifico per colmare lacune conoscitive, l'uso di sistemi innovativi di depurazione dei reflui civili e ospedalieri, oltre alle prospettive di innovazione nella gestione degli allevamenti intensivi.

## 2. ANALISI DEL PROBLEMA

### 2.1. AMR e ambiente: vie di contaminazione delle matrici ambientali

L'AMR, data da geni di resistenza ad antibiotici sintetici e semisintetici, si diffonde nell'ambiente tramite molteplici vie di contaminazione e in seguito alle differenti attività antropiche in cui vi è un elevato utilizzo di antibiotici. I geni di resistenza possono raggiungere l'ambiente sia tramite fonti diffuse di contaminazione (aree ad agricoltura intensiva, distretti industriali, attività umane distribuite sul territorio) sia attraverso sorgenti puntiformi quali impianti zootecnici intensivi, acquacoltura e scarichi fognari urbani e ospedalieri (Bush *et al.*, 2011; Berendonk *et al.*, 2015).

Gli scarichi fognari urbani, che spesso ricevono scarichi ospedalieri trattati e non trattati, sono tra le principali fonti di immissione di determinanti di AMR nell'ambiente, per il tramite degli effluenti degli impianti di depurazione che, per come concepiti, sono attualmente poco o per nulla efficienti nella loro rimozione. Bisogna inoltre tener conto che la copertura di raccolta e trattamento dei reflui urbani non è completa e vi sono pertanto scarichi diretti di reflui non trattati in corsi d'acqua e laghi come dimostrato recentemente dall'analisi di alcuni marcatori antropici nel bacino del fiume Lambro (Castiglioni *et al.*, 2018). Ulteriore sversamento diretto di reflui non trattati avviene in periodi di forte pioggia, quando i depuratori non riescono a collettare interamente i reflui che ricevono e sono costretti a scaricarne direttamente una parte senza trattamento. Studi recenti hanno evidenziato e quantificato in ambito nazionale sia la presenza di sorgenti di contaminazione diffuse (Eckert *et al.* 2018; Di Cesare *et al.* 2017) che puntiformi (Di Cesare *et al.* 2016a, 2016b), ponendo le basi scientifiche necessarie per possibili azioni di contenimento delle resistenze.

L'impatto dell'utilizzo massivo di antibiotici non causa solo il rilascio in ambiente di batteri resistenti e di geni di resistenza (*Antibiotic Resistant Gene*, ARG), ma anche di notevoli quantitativi dei diversi antibiotici, che sono tra i farmaci più utilizzati in medicina umana e veterinaria e che possono avere un ruolo cruciale nello sviluppo di resistenze (Michael *et al.*, 2013). Le sostanze parentali non metabolizzate dal corpo umano e i rispettivi metaboliti vengono escreti per via urinaria e fecale, raggiungono le acque reflue urbane e gli impianti di depurazione delle acque, dove generalmente non sono rimossi totalmente. Antibiotici e metaboliti vengono quindi immessi in corsi d'acqua, laghi o mare con le acque trattate oppure in suoli tramite l'utilizzo dei fanghi di depurazione come concime nei campi. Dai suoli possono infine raggiungere nuovamente le acque superficiali o le acque di falda per percolazione. L'Italia è uno dei paesi europei con più elevato consumo di antibiotici e sviluppo di resistenze sia in ambito veterinario che medico ospedaliero, che vengono monitorate sia come presenza sia per il loro destino ambientale sul territorio nazionale, in studi successivi al 2000. In particolare, in uno studio dedicato agli antibiotici (Zuccato *et al.*, 2010) è stato stimato che in Italia, circa 7–14 tonnellate di antibiotici sono immesse annualmente nell'ambiente tramite i reflui urbani trattati, mentre uno studio più recente ha mostrato come gli antibiotici siano tra i composti più abbondanti nei reflui urbani e nelle acque di superficie (Castiglioni *et al.*, 2018). La Tabella 1 riporta i valori medi dei principali antibiotici utilizzati in Italia misurati in acque reflue, di superficie e di falda, durante un'indagine condotta nel bacino del fiume Lambro in Lombardia (Castiglioni *et al.*, 2018). Relativamente alle acque reflue, sono state analizzate le acque in entrata ai depuratori (non trattate) e acque in uscita (trattate); come evidenziato precedentemente, la maggior parte degli

antibiotici analizzati è ancora presente in concentrazioni rilevanti nelle acque trattate e viene pertanto riversato nelle acque superficiali. Gli antibiotici più abbondanti sono risultati macrolidi (claritromicina, deidro-eritromicina) e fluorochinoloni (ciprofloxacina, ofloxacina) che sono stati presenti nel *range* di alcune centinaia di nanogrammi/Litro (ng/L). Tracce di questi composti sono state rilevate anche nelle acque di falda indicando una presenza ubiquitaria degli antibiotici nell'ambiente.

**Tabella 1. Concentrazioni medie di antibiotici in acque reflue, di superficie e di falda nel bacino del fiume Lambro (Lombardia)**

Antibiotico	Concentrazioni (ng/L)			
	Acque reflue		Acque di superficie	Acque di falda
	<i>non trattate</i>	<i>trattate</i>		
Amoxicillina	1,2	16,3	13,49	<LOQ
Ciprofloxacina	618,1	202,3	33,76	<LOQ
Claritromicina	960,3	465,6	195,31	7,6
Eritromicina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Deidro-eritromicina	269,3	201,6	61,58	8,8
Lincomicina	23,8	16,2	9,57	0,6
Ofloxacina	545,7	293,6	97,05	<LOQ
Ossitetraciclina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Spiramicina	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Sulfametoxazolo	60,4	50,1	6,55	<LOQ
Vancomicina	22,3	15,1	7,79	<LOQ

LOQ= Limite di quantificazione, generalmente inferiore a 1.5 ng/L.

La presenza di antibiotici e di ARG nei reflui trattati e nelle acque di superficie può creare ulteriori potenziali rischi se queste acque vengono riutilizzate per l'irrigazione in agricoltura. Questa pratica è molto diffusa anche in Italia e viene adottata specialmente in zone ad alta intensità agricola e scarse risorse acquifere (per es. Israele, Spagna). Il problema è ad oggi poco studiato e la ricerca dovrebbe focalizzarsi sullo studio dell'impatto del riuso delle acque trattate in agricoltura legato alla presenza di microinquinanti quali farmaci e antibiotici (Miarov *et al.*, 2020). Di fatto è dimostrata l'inefficienza dei sistemi convenzionali di trattamento e disinfezione ad abbattere in modo efficiente e selettivo i batteri resistenti e a distruggere o inattivare i geni di resistenza (Pruden *et al.*, 2006). Se le tecniche di disinfezione chimica tradizionale (es. clorinazione) non vengono utilizzate perché i loro sottoprodotti possono essere altamente tossici e inficerebbero la qualità dell'acqua per riuso, anche le metodologie alternative utilizzate (es. ozono, carboni attivi, radiazione UV) hanno grossi limiti tecnici (Rizzo *et al.*, 2013; Di Cesare *et al.*, 2016a; Manaia *et al.*, 2018) che ne riducono l'efficienza.

Quando si considera la produzione di acqua reflua da riuso agricolo, in accordo con la legislazione nazionale, si deve considerare che spesso il refluo forma canali irrigui che non si mescolano con altre acque superficiali per svariate centinaia di metri o addirittura per chilometri, e che generalmente questi canali terminano direttamente nei terreni da irrigare. La mancanza di *mixing* con acque superficiali fa sì che le comunità microbiche che escono dal depuratore non siano esposte ai fattori ecologici che ne limiterebbero la crescita e le possibilità di permanenza, che invece si stabilirebbero con il *mixing* con altre acque superficiali (Corno *et al.* 2019); di fatto questo permette la crescita incontrollata (in qualche ora) di batteri sopravvissuti ai trattamenti e potenzialmente molto pericolosi per la salute umana (batteri patogeni e antibiotico-resistenti). È stato anche dimostrato che l'esposizione continuativa di comunità batteriche naturali ad acque

reflue per riuso agricolo al più elevato stato di purezza attualmente ottenibile e di fatto prive di cellule batteriche, è risultato nella promozione di una crescita incontrollata di ceppi di *Pseudomonas* e *Acinetobacter* generalmente molto rari in comunità non disturbate (Subirats *et al.*, 2019). Questa situazione suggerisce l'applicazione di metodi di trattamento alternativi ad oggi solo sperimentali (*Advanced Oxidation Processes*, come fenton o photo-fenton, possibilmente combinati a micro o nano-filtrazione) ad oggi saggiati solamente in settaggi sperimentali (Fiorentino *et al.*, 2018).

Già da molti anni si riconosce che i sistemi di zootecnia e acquacoltura intensivi hanno determinato un notevole incremento della produzione di risorse alimentari (AA.VV., 1998). Per questa attività, però, vengono utilizzate consistenti quantità di farmaci, principalmente antibiotici, che vengono somministrati agli animali per curare ed evitare il diffondersi di malattie batteriche tra gli animali, fenomeno molto comune nelle condizioni di alta densità in cui sono mantenuti.

I farmaci vengono somministrati per via orale, e per questa via vengono scarsamente assorbiti; sono quindi escreti in forma attiva con le deiezioni, da cui vengono veicolati nei vari comparti ambientali. Poiché i farmaci vengono scelti in base alla loro efficienza farmacologica e alle loro caratteristiche fisiche e chimiche (es. stabilità e persistenza), una volta smaltiti nell'ambiente possono rappresentare contaminanti pericolosi per il biota degli ecosistemi in cui vengono introdotti. Infatti i farmaci sono progettati per avere elevata affinità e attività biologica sugli organismi, proprietà che ne facilitano l'*uptake* nel biota e provocano anche effetti tossici sugli organismi. Il destino e gli effetti dei farmaci che si accumulano nell'ambiente sono documentati già da molto tempo (Halling-Sørensen *et al.*, 1998; Jørgensen & Halling-Sørensen, 2000).

La presenza di antibiotici nei reflui zootecnici di allevamenti terrestri è ampiamente dimostrata da fonti bibliografiche e riscontri analitici (es. la presenza di tetracicline e sulfamidici); questi reflui vengono spesso 'lagunati' e le concentrazioni di tetracicline nei lagoni mostrano una certa omogeneità per fasce di profondità, e aumentano con questa. Dall'analisi delle cinetiche di degradazione si può dedurre che nella situazione tipo di un lagone, la curva di degradazione è in fase di asintoto, e che quindi, il prolungamento del periodo di lagunaggio non è in grado di abbassare ulteriormente la concentrazione di farmaco. Dopo il periodo di lagunaggio i reflui vengono utilizzati nella pratica cosiddetta di 'fertirrigazione' per cui i reflui e il loro carico di antibiotici in forma attiva vengono sversati sui terreni agricoli. La presenza di questi farmaci nei suoli e il loro trasferimento e/o accumulo nelle piante, è un processo comune e ben noto già da molto tempo (Migliore *et al.*, 1995a, 1996, 1997, 2000, 2003, 2010).

Anche la presenza di antibiotici nei reflui dell'acquacoltura è stata dimostrata da fonti bibliografiche e riscontri analitici (es. la presenza di Flumequina in Migliore *et al.*, 1995b, oppure varie sostanze in Lalumera G. *et al.*, 2004). I reflui dell'acquacoltura vengono direttamente immessi negli ambienti dulciacquicoli e marini aprendo problemi quali il destino ambientale e gli effetti di questi farmaci sul comparto marino. Per questi allevamenti il problema è ulteriormente aggravato dall'alimento 'medicato' (cioè quello che contiene i farmaci) non utilizzato dai pesci che entra direttamente negli ecosistemi acquatici insieme al suo carico di nutrienti.

La contaminazione da antibiotici e determinanti di AMR coinvolge sicuramente la matrice ambientale acquatica (acque reflue, di superficie e di falda) e terrestre (suoli e sedimenti), ma non si esclude il coinvolgimento del biota (piante che accumulano i farmaci e animali), amplificando il rischio che organismi non-target (microrganismi, ma anche piante, animali e uomo) entrino in contatto con questi residui attivi di farmaci presenti nell'ambiente. Il comportamento ambientale e la persistenza degli antibiotici variano in base alle proprietà chimico fisiche delle differenti sostanze, ma questa classe di contaminati viene generalmente definita "semi persistente" poiché il loro utilizzo è continuo e massiccio e quantitativi rilevanti vengono immessi quotidianamente nell'ambiente a seguito d'uso in medicina umana e veterinaria (Boxall *et al.*, 2012). In pratica, anche se alcune sostanze si degradano rapidamente nell'ambiente, risultano sempre presenti a

causa dell'immissione continua. La definizione del destino ambientale degli antibiotici e dei farmaci in generale risulta quindi complessa e bisogna tenere conto di molti fattori tra cui è opportuno ricordare l'eterogeneità delle differenti sostanze che, a seconda della classe terapeutica, presentano strutture chimiche differenti a cui corrispondono differenti comportamenti ambientali (Castiglioni *et al.*, 2006).

## 2.2. Propagazione dell'AMR dall'ambiente e implicazioni per la salute umana

L'antibiotico-resistenza è uno dei principali problemi di sanità pubblica ed ha raggiunto negli ultimi anni proporzioni tali da indurre istituzioni internazionali e nazionali a lanciare l'allarme e a promuovere iniziative finalizzate al suo controllo. L'ultimo rapporto europeo sull'antibiotico-resistenza (ECDC, 2020) continua a fornire stime estremamente preoccupanti: circa 33.000 morti l'anno, di cui oltre 10.000 solo in Italia, sono conseguenza diretta di infezioni resistenti.

Ad oggi, la strategia comunemente adottata in ambito medico umano e veterinario è il monitoraggio dell'antibiotico-resistenza in un selezionato gruppo di specie batteriche di rilevanza clinica. A questa mappatura fanno generalmente seguito azioni dirette di informazione sull'utilizzo di "buone pratiche" e di "stewardship" ospedaliera e negli allevamenti intensivi, al fine di ridurre e ottimizzare l'uso di antibiotici e la conseguente proliferazione di resistenze. È stato ampiamente dimostrato anche il rischio di trasmissione di resistenze dall'ambiente antropizzato a patogeni umani e il conseguente abbattimento degli effetti positivi di azioni mirate in ambito clinico e veterinario a causa della presenza in ambiente di resistenze: il trasferimento di resistenze attraverso i prodotti alimentari all'uomo è stato oggetto nel 2019 del *Joint FAO/WHO Expert Meeting in collaboration with OIE on Foodborne Antimicrobial Resistance: Role of the Environment, Crops and Biocides*, tenutosi a Roma, che presenta nel suo rapporto finale una lunghissima serie di casi dove la contaminazione dei cibi può essere sia diretta (sviluppo di resistenze in seguito all'utilizzo di antibiotici nel ciclo vitale dell'animale) che indiretta (acquisizione di resistenze dall'ambiente dove l'animale o la pianta sono stati cresciuti). Ancora più estremo è il caso di trasmissione di resistenze da animali selvatici all'uomo (per una review sui vari casi riportati vedi Dolejska & Literak, 2019): dalle acque di balneazione alle persone (es. i surfisti) che passano molto tempo a contatto con esse, come dimostrato in Gran Bretagna (Leonard *et al.*, 2019). In quest'ultimo caso è stato dimostrato che il contatto prolungato con *E. coli* resistenti presenti nelle acque costiere antropizzate della Gran Bretagna ha causato nei surfisti un aumento di 3 volte delle resistenze ai beta-lattamici nel loro microbioma orale.

## 2.3. Effetti di basse dosi di antibiotico e ormesi

La presenza di antibiotici sia nelle matrici ambientali sia nel biota, è una presenza a basse concentrazioni, perché i farmaci si 'diluiscano' nelle matrici ambientali (abiotiche e biotiche).

Pertanto, ci sono molti ambienti (es. acque reflue, fanghi, suolo e acque superficiali) in cui i batteri sono esposti per lunghi periodi di tempo a basse concentrazioni di antibiotici (Thiele-Bruhn, 2003; Lindberg *et al.*, 2007). Inoltre, durante l'uso terapeutico basse concentrazioni di antibiotici (al di sotto della minima concentrazione inibente: *Minimal Inhibitory Concentration*, MIC) potrebbero trovarsi in determinati tessuti o comparti dell'ospite umano/animale trattato. Diversi studi hanno dimostrato che bassi livelli di antibiotici (sub-MIC) possono selezionare mutanti resistenti preesistenti nelle popolazioni batteriche, indicando come queste situazioni

possano contribuire all'evoluzione della resistenza anche a concentrazioni molto più basse della MIC (Gullberg *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2017). È dunque sempre più chiaro che bassi livelli di antibiotici presenti in molti ambienti possono selezionare batteri resistenti, ma i percorsi evolutivi per lo sviluppo di resistenza durante l'esposizione a basse quantità di antibiotici rimangono ancora poco definiti (Wistrand-Yuen *et al.*, 2018).

Oltre a questo fenomeno selettivo, già chiaramente previsto, va tenuto in considerazione un altro processo fisiologico, meno noto ma ampiamente accertato, l'ormesi. L'ormesi è una relazione dose-risposta bifasica, considerata una funzione adattativa e caratterizzata da una lieve stimolazione della funzione considerata (30-60%) a basse concentrazioni e dall'inibizione della stessa funzione a dosi più elevate. Molti organismi filogeneticamente distanti e sistemi biologici esposti a una vasta gamma di stimoli mostrano una risposta bifasica dose-dipendente (Stebbing 1998; Chapman 2001; Calabrese & Baldwin 2001, 2002; Calabrese 2008, 2012; Calabrese & Blain 2009; Migliore *et al.*, 2010). La definizione di ormesi non tiene conto del risultato (benefico o dannoso) della stimolazione, che deve essere dedotto dal contesto biologico o ecologico, ma in un ambiente variabile imprevedibile, il processo ormetico consente a un singolo individuo di superare una condizione di stress di bassa/media intensità (Migliore *et al.*, 2013). In questo contesto la risposta ormetica è in grado di favorire la crescita dei microrganismi in presenza di basse/medie concentrazioni di antibiotico, invece di limitarne la crescita. Per esempio le dosi di tetraciclina che inducono la risposta ormetica in *E. coli* (Migliore *et al.*, 2013) sono paragonabili alle concentrazioni comunemente rilevate nei suoli e nelle acque contaminate (Sarmah *et al.*, 2006; Brambilla *et al.*, 2007), così come quelle di sulfamidici ed eritromicina (Wang *et al.*, 2017). La risposta ormetica a queste concentrazioni apre nuove preoccupazioni sugli effetti della contaminazione ambientale da antibiotici.

In contesti ambientali (acque libere, suoli) è ancora da dimostrare una diretta correlazione tra la presenza di antibiotici (generalmente in dosi bassissime, nell'ordine di pochi ng/L) e lo sviluppo o la permanenza di resistenze (Eckert *et al.*, 2018). Infatti, diversi studi sperimentali hanno dimostrato che in presenza di dosi bassissime (ma comunque uguali o superiori a quelle ambientali) di diversi antibiotici, la risposta della comunità batterica è stata fenotipica o comportamentale, con un aumento di aggregazione e biofilm (Donlan & Costerton, 2002; Corno *et al.*, 2014), senza però uno sviluppo di determinanti genetici di resistenza se non si considerasse un aumento relativo del gene *IntI1* (integrone dell'integrasi 1) che è considerato un *proxy* di adattamento della comunità microbica ad un inquinamento di origine antropica (Gillings *et al.*, 2015), o anche (indirettamente) di potenziale sviluppo di antibiotico-resistenza (Ma *et al.*, 2017). Ricerche più dettagliate, che siano in grado di modellizzare e contestualizzare i sistemi ambientali così come fatto per i (più semplici) sistemi batterio/organismo ospite, sono necessari per chiarire questo importante aspetto del ciclo dell'antibiotico-resistenza in ambiente.

Per preservare l'efficacia dei farmaci è dunque necessario imporre una regolamentazione più severa sull'uso (e l'abuso) di antibiotici ma, in definitiva, è solo attraverso la ricerca – in particolare attraverso la comprensione degli effetti biologici degli antibiotici su singoli ceppi microbici e sulle comunità microbiche nel loro complesso – che si potrà continuare la corsa contro la diffusione della resistenza agli antibiotici.

### 3. STRUMENTI NORMATIVI E ORIENTAMENTI PRINCIPALI

#### 3.1. Direttiva acque e *Watch List*

Le acque superficiali ricevono grandi quantità di sostanze pericolose, che derivano principalmente da prodotti industriali, agricoli, domestici, fonti e impianti municipali di trattamento delle acque reflue, nonché dal deflusso superficiale e dalla deposizione atmosferica. In questo contesto, la Direttiva Quadro sulle Acque (Direttiva 2000/60/CE) (Europa, 2000) ha stabilito i criteri per proteggere le acque superficiali interne, di transizione, costiere e sotterranee, per prevenire il loro declino ecologico, proteggere e migliorare lo stato degli ecosistemi, promuovere un uso idrico sostenibile basato sulla protezione a lungo termine delle risorse idriche disponibili e contribuire a mitigare gli effetti delle inondazioni e della siccità. La direttiva stabilisce per la prima volta la necessità di definire un elenco di sostanze, cosiddette pericolose e prioritarie (PP), la cui presenza e livelli richiedono uno specifico monitoraggio e di fissare dei valori soglia da rispettare al fine di ottenere un cosiddetto “buono stato chimico”, per proteggere gli ecosistemi acquatici e la salute umana dai possibili rischi derivanti dall’esposizione a tali sostanze.

Ai fini della valutazione del buono stato chimico delle acque è stata definita, nella Decisione 2455/2001/CE (Europa, 2001), una prima lista di 33 sostanze o gruppi di sostanze prioritarie. Successivamente, la Direttiva 2008/105/CE (Europa, 2008) ha definito gli Standard di Qualità Ambientale (SQA) per queste 33 sostanze e per altri 8 inquinanti già regolamentati a livello europeo dalla Direttiva 76/464/CE (Europa, 1976). La lista è stata, poi, nuovamente modificata con la Direttiva 2013/39/UE (Europa, 2013): le sostanze prioritarie sono diventate 45 e per molte di esse sono cambiati gli standard di qualità ambientale. Da ricordare è anche la Direttiva 2009/90/CE che stabilisce le specifiche tecniche per l’analisi chimica e il monitoraggio dello stato chimico dei corpi idrici e i criteri minimi di prestazione dei metodi analitici da impiegare.

La lista delle sostanze pericolose da monitorare è sempre in fase di aggiornamento. A tal fine la Direttiva 2013/39/UE ha predisposto un nuovo meccanismo per fornire informazioni attendibili sul monitoraggio di sostanze emergenti che potenzialmente possono inquinare l’ambiente acquatico europeo. Questo nuovo strumento, chiamato elenco di controllo (*Watch List*), monitora la presenza, su tutto il territorio europeo, di sostanze per le quali non sono ancora chiari i meccanismi di danno agli ecosistemi acquatici e alla salute umana. Le sostanze incluse nella *Watch List*, da aggiornare ogni 2 anni, sono selezionate tra quelle che, secondo le informazioni disponibili, possono presentare un significativo rischio per l’ambiente acquatico e la salute umana ma per le quali i dati di monitoraggio sono attualmente insufficienti. Il processo di definizione della *Watch List* prevede che le sostanze altamente tossiche, impiegate in molti Stati Membri e rilasciate in ambiente acquatico ma raramente o mai monitorate, siano prese in considerazione per l’inclusione nell’elenco di controllo. Il processo di selezione deve tener conto delle informazioni indicate all’articolo 8 ter, paragrafo 1, lettere da a) a e), della Direttiva 2008/105/CE, prestando particolare attenzione agli inquinanti emergenti. Secondo la Direttiva, il monitoraggio delle sostanze figuranti nell’elenco di controllo deve generare dati di elevata qualità sulla loro concentrazione nell’ambiente acquatico, adatti a suffragare la valutazione del rischio che sta alla base dell’individuazione delle sostanze prioritarie, da utilizzare in un esercizio di riesame separato conformemente all’articolo 16, paragrafo 4, della Direttiva 2000/60/CE. Nell’ambito di tale riesame, le sostanze che comportano un rischio significativo dovrebbero essere prese in

considerazione ai fini della loro inclusione nell'elenco delle sostanze prioritarie e dovrebbe essere stabilito anche uno standard di qualità ambientale che gli Stati Membri dovranno soddisfare. Quindi, sulla base dei dati raccolti tramite specifici monitoraggi (per un periodo di almeno 4 anni e su un numero ristretto di stazioni significative), saranno individuate le sostanze emergenti da inserire ufficialmente nell'elenco delle sostanze prioritarie da monitorare per definire lo stato chimico delle acque. Viceversa le sostanze della *Watch List* per le quali risulterà un rischio non significativo a livello dell'Unione, saranno eliminate dall'elenco di controllo direttamente dalla Commissione.

### 3.1.1. *Watch List* – primo elenco (WL1)

Le sostanze dell'elenco di controllo stabilite dalla Decisione di esecuzione 2015/495 del 20 marzo 2015 della Commissione europea (Europa, 2015) sono riportate nella Tabella 2 insieme al numero CAS (*Chemical Abstracts Service*) e EU, alla strumentazione analitica utilizzabile per la determinazione della loro concentrazione in massa e la sensibilità minima del metodo di analisi definito rispetto al potenziale effetto in acque superficiali.

**Tabella 2. Sostanze del primo elenco di controllo (Decisione di esecuzione 2015/495 del 20 marzo 2015 della Commissione europea) con requisiti analitici**

Denominazione della sostanza o del gruppo di sostanze	Numero CAS	Numero UE*	Metodi di analisi indicativi <sup>(1-3)</sup>	Limite massimo ammissibile del metodo di rilevazione (ng/L)
17-alfa-etinilestradiolo (EE2)	57-63-6	200-342-2	SPE - LC-MS-MS su grandi volumi	0,035
17-beta-estradiolo (E 2), estrone (e 1)	50-28-2, 53-16-7	200-023-8 200-164-5	SPE - LC-MS-MS	0,4
diclofenac	15307-86-5	239-348-5	SPE - LC-MS-MS	10
2,6-di-terz-butil-4-metilfenolo	128-37-0	204-881-4	SPE - GC-MS	3160
4-metossicinnamato di 2-etilesile	5466-77-3	226-775-7	SPE - LC-MS-MS oppure GC-MS	6000
Antibiotici macrolidi <sup>(4)</sup>			SPE - LC-MS-MS	90
Metiocarb	2032-65-7	217-991-2	SPE - LC-MS-M oppure GC-MS	10
Neonicotinoidi <sup>(5)</sup>			SPE - LC-MS-MS	9
Ossadiazone	19666-30-9	243-215-7	LLE/SPE - GC-MS	88
Tri-allato	2303-17-5	218-962-7	LLE/SPE - GC-MS oppure LC-MS-MS	670

\* non disponibile per tutte le sostanze

<sup>(1)</sup> Per garantire la comparabilità dei risultati provenienti da diversi Stati Membri, tutte le sostanze sono monitorate nell'intero campione d'acqua.

<sup>(2)</sup> Metodi di estrazione: LLE, estrazione liquido-liquido; SPE, estrazione in fase solida.

Metodi analitici: GC-MS, Gascromatografia-spettrometria di massa; LC-MS-MS, cromatografia liquida, spettrometria di massa (tandem) a triplo quadripolo

<sup>(3)</sup> Per il monitoraggio del 2-etilexil 4-metossicinnamato nel particolato sospeso (SPM, Suspended Particular Matter) o nei sedimenti (dimensione < 63 µm), viene utilizzato il seguente metodo analitico: SLE (estrazione solido-liquido) — GC-MS, con un limite di rilevazione massimo di 0,2 mg/kg.

<sup>(4)</sup> Eritromicina (numero CAS 114-07-8; numero UE 204-040-1), claritromicina (numero CAS 81103-11-9), azitromicina (numero CAS 83905-01-5; numero UE 617-500-5)

<sup>(5)</sup> Imidacloprid (numero CAS 105827-78-9/138261-41-3, numero UE 428-040-8), tiacloprid (numero CAS 111988-49-9), tiametoxam (numero CAS 153719-23-4; numero UE 428-650-4), clotianidin (numero CAS 210880-92-5; numero UE 433-460-1), acetamiprid (numero CAS (135410-20-7/160430-64-8)

Sulla base dell'elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione, l'Italia ha richiesto all'Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale (ISPRA) di definire le stazioni e la frequenza di campionamento di tali sostanze. Da qui, il "Primo monitoraggio delle sostanze dell'elenco di controllo", datato marzo 2017 (ISPRA, 2017). In collaborazione con le Regioni sono stati definiti 25 punti di prelievo, localizzati nei dintorni di impianti di trattamento di acque reflue urbane, confluenza di corpi idrici con impatti noti oppure situati presso luoghi turistici su laghi e acque marino costiere. A livello nazionale, tra le sostanze emergenti indicate nell'elenco della Decisione 2015/495 sono state analizzate, nei primi tre anni (WL1), farmaci, ormoni, pesticidi e protettivi solari.

Nel corso del 2017 la Commissione ha analizzato i dati relativi al primo anno di monitoraggio per le sostanze presenti nella prima WL del 2015. Ad aprile 2018 è stato pubblicato il rapporto del *Joint Research Centre* (JRC) della Commissione UE sulla revisione della prima WL "Review of the 1<sup>st</sup> Watch List under the Water Framework Directive and recommendations for the 2<sup>nd</sup> Watch List" in cui sono discussi i risultati del monitoraggio (Loos *et al.*, 2018).

Nella prima WL era inserito il gruppo degli antibiotici macrolidi che conteneva tre sostanze: eritromicina, claritromicina e azitromicina, per la quale qualche Stato Membro ha avuto difficoltà a raggiungere un LOQ (*Limit Of Quantification*) analitico inferiore alla PNEC (*Predicted No Effect Concentration*) del 2015. Tra le sostanze per le quali il monitoraggio ha mostrato il maggior numero di superamenti delle PNEC 2015 figurano anche claritromicina e azitromicina con punteggio STE (*Spatial Temporal and Extent*) (Scenario 3), rispettivamente, di 0,52 e 0,35. L'approccio STE consiste in una strategia di prioritizzazione delle sostanze, basata sui dati di monitoraggio, e che valuta i superamenti delle PNEC dal punto di vista dell'entità del superamento stesso, della distribuzione spaziale e della frequenza temporale, per ordinare e classificare le sostanze in base al rischio che esse pongono nei confronti delle acque superficiali. È da notare che il periodo di campionamento influenza i risultati: è stato rilevato un incremento della presenza degli antibiotici nel periodo invernale.

Successivamente al 2015 i valori delle PNEC hanno subito degli aggiornamenti sulla base di nuove informazioni ecotossicologiche derivanti da un esercizio di prioritizzazione e da dati forniti da alcuni paesi membri. Per la claritromicina l'aggiornamento della PNEC è stato minimo e non ha modificato significativamente il punteggio STE (da 0,52 a 0,53). Per l'azitromicina vi è stato un aggiornamento molto significativo della PNEC (da 0,09 a 0,019 µg/L) che ha comportato un importante aumento del punteggio STE (da 0,35 a 0,88) e che inoltre richiede un LOQ analitico che non è stato raggiunto da circa la metà dei laboratori. Si ritiene tuttavia (Tavazzi *et al.*, 2016) che, con strumentazione analitica di buon livello, si possa raggiungere un LOQ adeguato anche rispetto alla PNEC aggiornata.

### 3.1.2. Revisione della *Watch List* – secondo elenco (WL2)

Il rapporto JRC di aprile 2018 oltre a riportare i risultati del primo monitoraggio esprime, sulla base di questi, le raccomandazioni per la composizione della seconda WL. Affinché una sostanza possa essere rimossa dalla WL i risultati del monitoraggio devono soddisfare due criteri. Il primo criterio verifica il fatto che il LOQ sia sufficiente rispetto alla PNEC. Il secondo criterio verifica che i risultati inferiori al LOQ non influenzino eccessivamente i punteggi STE risultanti. Da quanto emerge dal rapporto del JRC, cinque sostanze per le quali si sono ottenute sufficienti informazioni verranno eliminate dall'elenco della WL e saranno sostituite con altre tre.

In base ai risultati del monitoraggio vi sono due delle tre sostanze figuranti nel gruppo degli antibiotici macrolidi, eritromicina e claritromicina, che soddisfano i due succitati criteri per la rimozione (Tabella 3). Il rapporto tecnico JRC tuttavia raccomanda il mantenimento delle due sostanze nella lista per diversi motivi: un terzo macrolide, l'azitromicina, ha mostrato risultati del

monitoraggio che, specie considerando l'aggiornamento della PNEC, sono tali da richiedere ulteriori dati di elevata qualità; eritromicina e claritromicina possono essere determinate analiticamente in maniera congiunta all'azitromicina; gli effetti degli antibiotici possono essere cumulativi. Per questi motivi è ragionevole continuare a mantenere tutte e tre le sostanze nella seconda WL.

**Tabella 3. Esiti della valutazione del monitoraggio dei tre antibiotici macrolidi inseriti nel primo elenco di controllo**

Denominazione della sostanza o del gruppo di sostanze	Tipo di sostanza	PNEC WL 2015 (µg/L)	PNEC aggiornata (µg/L)	Raccomandazione JRC
Eritromicina	antibiotico macrolide	0,2		Soddisfa entrambi i criteri per la rimozione ma è raccomandata per WL2
Claritromicina	antibiotico macrolide	0,13	0,12	Soddisfa entrambi i criteri per la rimozione ma è raccomandata per WL2
Azitromicina	antibiotico macrolide	0,09	0,019	Inclusione nella WL2

Il rapporto JRC 2018, oltre a raccomandare di mantenere i tre antibiotici macrolidi nella seconda WL, raccomanda anche di inserirvi due nuovi antibiotici, amoxicillina e ciprofloxacina, anche in considerazione della disponibilità di tecniche analitiche in SPE-LC/MS/MS che consentono, a costi non eccessivi, di raggiungere LOQ inferiori alle PNEC (Tabella 4).

**Tabella 4. Affidabilità dei valori di PNEC e idoneità delle metodologie analitiche per i due antibiotici introdotti nella seconda Watch List (WL2)**

Sostanza	CAS	PNEC (µg/L)	PNEC è affidabile?	Metodo analitico disponibile per l'analisi in acqua	LOQ < PNEC? (in acqua) (rif.)
Amoxicillina	26787-78-0	0,078	Sì	LC-MS-MS	Sì (LOQ = 0,004) (Gros <i>et al.</i> 2013)
Ciprofloxacina	85721-33-1	0,089	Sì	LC-MS-MS	Sì (LOQ = 0,002) (Gros <i>et al.</i> 2009)

L'inclusione di questi due antibiotici nella WL2 è in linea con il piano d'azione europeo *One Health* contro l'AMR che prevede un approccio integrato multisettoriale alla lotta contro la resistenza agli antibiotici, affrontando la minaccia, oltre che dal punto di vista sanitario e veterinario, anche dal punto di vista ambientale. L'approccio *One Health* prevede, infatti, l'impiego della WL come strumento per "migliorare le conoscenze sulla comparsa e diffusione degli antimicrobici nell'ambiente".

Dal punto di vista del destino ambientale, l'amoxicillina nelle acque tende ad essere rapidamente degradata da fattori biotici e abiotici ma si ipotizza che i prodotti risultanti siano più resistenti alla degradazione e potenzialmente più tossici della molecola originaria. L'amoxicillina può anche bioaccumulare nei tessuti muscolari dei pesci con il rischio di un'assunzione di questo antibiotico tramite l'alimentazione e soprattutto con il rischio di indurre nei batteri i geni della resistenza agli antibiotici. L'emivita della ciprofloxacina nelle acque è stimata essere

relativamente breve per via di bio- e foto-degradazione. Inoltre, in dipendenza anche del pH, la molecola può avere una significativa tendenza ad adsorbirsi sul particolato sospeso o sui fanghi negli impianti di depurazione che poi possono essere utilizzati come concime in agricoltura.

Le conclusioni e le raccomandazioni del rapporto JRC 2018 costituiscono la base della Decisione di esecuzione (UE) 2018/840 del 5 giugno 2018 che modifica la WL (Europa, 2018). In essa ora compaiono quindi i cinque antibiotici riportati nella seguente Tabella 5.

**Tabella 5. Riassunto degli antibiotici di cui è previsto il monitoraggio nella seconda Watch List (WL2) e requisiti analitici**

Denominazione della sostanza o del gruppo di sostanze	Numero CAS	Numero EU*	Metodi di analisi indicativi <sup>(1)(2)</sup>	Limite massimo ammissibile di rilevazione del metodo (ng/L)
Antibiotici macrolidi <sup>(3)</sup>			SPE - LC-MS-MS	19
Amoxicillina	26787-78-0	248-003-8	SPE - LC-MS-MS	78
Ciprofloxacina	85721-33-1	617-751-0	SPE - LC-MS-MS	89

\* non disponibile per tutte le sostanze.

<sup>(1)</sup> Per garantire la comparabilità dei risultati provenienti da diversi Stati Membri, tutte le sostanze sono monitorate in campioni integrali d'acqua.

<sup>(2)</sup> Metodi di estrazione: SPE, estrazione in fase solida; Metodi di analisi: LC-MS-MS, Cromatografia liquida, spettrometria di massa (tandem) a triplo quadripolo.

<sup>(3)</sup> Eritromicina (numero CAS 114-07-8; numero UE 204-040-1), claritromicina (numero CAS 81103-11-9), azitromicina (numero CAS 83905-01-5; numero UE 617-500-5)

Se nuove informazioni porteranno per queste sostanze, in futuro, a una riduzione della concentrazione senza effetti significativi, potrebbe essere necessario abbassare il limite massimo ammissibile di rilevazione del metodo finché le sostanze rimangano nell'elenco.

L'obiettivo di determinare le sostanze elencate nella WL ai livelli richiesti, con i migliori standard tecnologici oggi disponibili, richiede da un lato una dotazione di strumentazione di alto livello, dall'altro una complessa attività di sviluppo e validazione dei metodi analitici che non può certamente prescindere da un'elevata qualificazione, dall'aggiornamento e da una forte motivazione del personale coinvolto.

### 3.1.3. Seconda revisione della *Watch List* – terzo elenco (WL3)

Ad agosto 2020 è stato pubblicato il rapporto del JRC della Commissione UE sulla revisione della WL2 nel quale, tra i criteri per la selezione delle sostanze da monitorare, oltre a tossicità, persistenza, bioaccumulabilità, cancerogenicità, mutagenicità e capacità di interferenza col sistema endocrino, è stato incluso anche il potenziale contributo delle sostanze alla diffusione e alla persistenza dell'antimicrobico resistenza. Le sostanze candidate, che soddisfano i criteri di selezione e identificate dal JCR come più adatte per l'inclusione nel prossimo elenco (WL3), includono due antibiotici, che sono spesso prescritti insieme per superare la resistenza antimicrobica; dieci sostanze azoliche, utilizzate come prodotti farmaceutici o pesticidi; un farmaco antidepressivo e il suo metabolita; e due ulteriori pesticidi usati come fungicidi.

Nello specifico la revisione di agosto 2020, anche per coerenza con il piano europeo *One Health* contro l'AMR (COM/2017/339 final; Europa, 2017), ha inserito nella terza WL antibiotici come il sulfametossazolo e il trimetoprim e antifungini come clotrimazolo, fluconazolo e miconazolo, a causa del loro largo impiego e facilità di rilascio in acqua, della loro tossicità nei confronti della vita acquatica e del loro possibile contributo alla diffusione e alla persistenza dell'antimicrobico e antifungino resistenza. Si tratta di composti che possono essere monitorati utilizzando lo stesso

metodo analitico LC/MS/MS e la loro selezione è in linea anche con la comunicazione della Commissione sull'approccio strategico ai prodotti farmaceutici nell'ambiente (COM/2019/128 final; Europa, 2019).

Il report evidenzia che i dati di monitoraggio utili per la prioritizzazione di queste sostanze nelle acque superficiali interne sono non sufficientemente rappresentativi (nel caso del sulfametossazolo) e/o insufficienti (nel caso del trimetoprim e degli antifungini azolici) o addirittura assenti, come nel caso del miconazolo, per fare una valutazione del rischio a livello di Unione.

A differenza della precedente revisione, in quest'ultima viene esplicitamente trattata la questione degli antimicrobici nell'ambiente. Gli antimicrobici sono composti naturali, semisintetici o sintetici che possono uccidere o inibire la crescita di microrganismi inclusi batteri e funghi. Gli antibiotici sono stati rilevati nei sistemi acquatici di tutto il mondo (nei quali vengono immessi attraverso scarichi di acque reflue, dilavamento, reflui di impianti di produzione, smaltimento improprio), con concentrazioni comprese tra 0,01 e 1 µg/L ma in alcuni casi, come in presenza di effluenti dai siti di produzione di antibiotici, queste concentrazioni potrebbero raggiungere valori più elevati, dell'ordine dei mg/L.

Gli antibiotici presentano un potenziale rischio per la salute dell'ecosistema perché la loro modalità di azione tossica viene conservata dai microrganismi ambientali, alcuni dei quali sono persistenti. Diversi studi hanno dimostrato che gli antimicrobici potrebbero aumentare, mantenere e diffondere batteri resistenti agli antibiotici (*Antibiotic Resistant Bacteria*, ARB) nell'ambiente anche a concentrazioni di esposizione basse, sub-letali o sub-inibitorie mettendo quindi a rischio la salute umana. Nel report JRC viene evidenziato come vi sia una seria possibilità di trascurare eventuali effetti avversi degli antibiotici sui batteri ambientali, poiché i saggi ecotossicologici normalmente applicati per la valutazione del rischio ambientale (*Environmental Risk Assessment*, ERA) dedicano una minore attenzione alla tossicità batterica.

Allo scopo di garantire protezione sia all'uomo che all'ambiente è stato proposto (Bengtsson-Palme & Larsson, 2016) di derivare una PNEC per l'antimicrobico resistenza, intesa come limite superiore di concentrazione che induce resistenza, utilizzando la MIC. In alcuni casi tale PNEC-MIC è risultata inferiore alla PNEC derivata dagli effetti ecotossicologici. Si suggerisce pertanto di utilizzare, per la valutazione del rischio ambientale degli antibiotici, il valore più basso tra la PNEC derivata da valutazione ecotossicologica e PNEC derivata dalla concentrazione minima inibitoria.

Il JRC sta anche valutando la possibilità di aggiungere, quale endpoint per la valutazione del rischio, la rilevazione di geni dell'antimicrobico resistenza (ARG) mediante PCR quantitativa e metodi di sequenziamento.

### **3.2. Contrasto all'AMR e limiti dell'approccio legislativo attuale nel settore dei farmaci ad uso umano e ad uso veterinario**

Il quadro normativo europeo relativo ai medicinali per uso umano e ai medicinali veterinari è stato recentemente riformato con l'approvazione di un pacchetto di regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio con cui sono state stabilite nuove procedure per l'immissione in commercio di questi prodotti. Ci si riferisce ai seguenti regolamenti:

- Regolamento (UE) 2019/4 sui mangimi medicati, che modifica il Regolamento (CE) 183/2005 e abroga la Direttiva 90/167/CEE;
- Regolamento (UE) 2019/5 che modifica sia il Regolamento (CE) 726/2004 sulle procedure per l'autorizzazione e la sorveglianza dei medicinali per uso umano e veterinario sia il

Regolamento (CE) 1901/2006 relativo ai medicinali per uso pediatrico sia la Direttiva 2001/83/CE relativa ai medicinali per uso umano;

- Regolamento (UE) 2019/6 che abroga la Direttiva 2001/82/CE relativo ai medicinali veterinari.

Con la Direttiva Quadro 2001/83/CE, recante un codice comunitario relativo ai medicinali per uso umano, recepita nell'ordinamento nazionale con il DL.vo 219/2006, modificata da ultimo con il Regolamento (UE) 2019/5, è stata introdotta la valutazione dei rischi potenziali per l'ambiente come requisito per l'autorizzazione all'immissione in commercio di un farmaco sul mercato.

Il processo di valutazione di un medicinale per uso umano sotto il profilo ambientale, in base alle linee guida predisposte dall'EMA, consiste schematicamente nella stima delle concentrazioni ambientali previste (PEC) delle sostanze attive e dei loro metaboliti nel comparto acquatico e nei sistemi di depurazione delle acque reflue, nella valutazione degli effetti sulle popolazioni animali potenzialmente esposte e, infine, nella valutazione del rischio che scaturisce dal porre a confronto le concentrazioni stimate (PEC) con le concentrazioni ambientali previste di non effetto (PNEC).

Quando un farmaco presenta rischi significativi per l'ambiente ( $PEC > PNEC$ ), l'impresa interessata deve proporre misure di precauzione e di riduzione dei rischi ambientali, che possono riguardare sia la fase di somministrazione del farmaco che la fase di smaltimento.

Le linee guida dell'EMA (oggi EMA), illustrate in dettaglio nel paragrafo successivo, pur raccomandando una serie di misure di mitigazione dei rischi da attuare nei casi più critici, non prevedono esplicitamente la possibilità di rifiutare la concessione dell'autorizzazione di un farmaco quando i rischi ambientali non possono essere riportati entro livelli accettabili. Inoltre, la valutazione del rischio di insorgenza di fenomeni di antimicrobico resistenza generati dalla diffusione nell'ambiente di farmaci con proprietà antimicrobiche è stata introdotta solo di recente e, pertanto, l'esperienza nel campo delle misure atte a mitigare l'esposizione ambientale e i rischi correlati è ancora piuttosto limitata.

Per quanto riguarda i medicinali veterinari, si sottolinea che la Direttiva 2001/82/CE recante il codice comunitario relativo ai medicinali veterinari è stata abrogata e sostituita dal Regolamento (UE) 2019/6 che, di fatto, centralizza parte delle procedure per l'autorizzazione dei medicinali veterinari, mantenendo comunque in vigore le disposizioni concernenti la valutazione dei rischi ambientali di questi prodotti. A tale Regolamento deve aggiungersi, per completare il quadro, il Regolamento (UE) 2019/4 sui mangimi medicati, che come è noto costituiscono ulteriori vie potenziali di esposizione ambientale alle sostanze antimicrobiche.

Il Regolamento (UE) 2019/6 sui medicinali veterinari considera necessario un uso prudente degli antimicrobici per fronteggiare la resistenza antimicrobica. In base al Regolamento europeo, tutte le parti interessate dovrebbero promuovere l'uso prudente degli antimicrobici e a questo scopo viene richiamata la necessità di tenere conto degli orientamenti esistenti sull'uso prudente degli antimicrobici nella medicina veterinaria e della necessità di elaborarne di ulteriori. L'identificazione dei fattori di rischio e l'elaborazione di criteri atti a limitare la somministrazione degli antimicrobici, dovrebbe permettere agli Stati Membri di adottare ulteriori misure restrittive in materia di uso prudente degli antimicrobici.

La valutazione del rischio ambientale è comunque obbligatoria per ogni nuovo farmaco veterinario immesso sul mercato europeo e le modalità per effettuare tale valutazione sono indicate nelle linee guida dell'EMA, illustrate più in dettaglio nel paragrafo successivo.

Attraverso un approccio graduale, basato su una prima fase di valutazione che prende in considerazione alcuni dati di base e una seconda fase più approfondita di esame, viene determinato il rapporto tra PEC e PNEC sia per il principio attivo che per gli eventuali metaboliti. Qualora tale rapporto evidenzia un rischio inaccettabile per l'ambiente, devono essere adottate opportune misure di gestione del rischio per ridurre, entro livelli accettabili, il rischio evidenziato.

Nelle situazioni estreme, quando nessuna misura di gestione del rischio si rivela sufficiente, la conclusione della valutazione può condurre al rifiuto dell'autorizzazione richiesta.

### **3.3. Cenni sulle linee guida dell'EMA per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci ad uso umano e veterinario, con particolare riferimento agli antimicrobici**

Nel 1965 la Comunità Economica Europea ha posto le prime basi per regolare i prodotti medicinali di marchio con la Direttiva 65/65/CEE. Questa non conteneva però aspetti di tipo ambientale, che vennero affrontati per la prima volta solo molto più tardivamente, con la Direttiva 93/39/CEE. Tale normativa introduceva la necessità di segnalare ogni possibile rischio ambientale potenzialmente correlato all'utilizzo dei prodotti medicinali. Nello stesso anno, il Regolamento (CEE) 2309/93 decretava la fondazione dell'agenzia europea per la valutazione dei farmaci (*European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, EMEA oggi semplicemente EMA *European Medicines Agency*, agenzia europea per i medicinali), dettagliava le procedure per la registrazione dei prodotti farmaceutici e, tra le altre cose, introduceva la necessità di valutare il rischio ambientale prima di provvedere alla registrazione dei nuovi farmaci. La prima versione delle linee guida tecniche per la registrazione dei farmaci (*notice to applicant*), pubblicate nel 1986, veniva intanto revisionata a seguito della Direttiva 93/39/CEE e pubblicata nel 1995 (*common technical document*). Era intanto iniziata anche la discussione relativa ai farmaci non-OGM, che inizialmente conglobava sia i farmaci per uso umano che quelli per uso veterinario. I due tipi di farmaci venivano poi separati a livello normativo nel procedere della discussione e le prime linee guida per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci per uso veterinario venivano pubblicate nel 1997 (EMEA/CVMP/055/96-Final), mentre il primo *draft* delle linee guida di valutazione del rischio ambientale dei farmaci per uso umano veniva pubblicato nel 2001 (EMEA CPMP, 2001).

#### **3.3.1. Farmaci ad uso umano**

Le linee guida per la valutazione del rischio ambientale dei farmaci per uso umano venivano successivamente riviste e implementate in una linea guida adottata nel 2006 (EMEA/CHMP/SWP/4447/00), che, sulla base di successive consultazioni e revisioni, risulta in una versione rivista (EMEA/CHMP/SWP/4447/00 Rev.1) oggetto di consultazione pubblica nel 2019. La valutazione del rischio ambientale (ERA) è richiesta per i nuovi prodotti medicinali per cui si richiede autorizzazione alla commercializzazione all'interno dell'Unione Europea e attualmente non è prevista una fase di valutazione dei medicinali già in commercio. Le linee guida si applicano ai prodotti medicinali per uso umano regolati dalla Direttiva 2001/83/EC e successivi emendamenti, in particolare alle nuove sostanze attive, e si riferiscono ai rischi ambientali connessi all'utilizzo, conservazione e smaltimento dei prodotti medicinali, e non ai rischi derivanti dalla loro sintesi e produzione. Inoltre non si applicano ai prodotti medicinali consistenti o contenenti OGM.

L'ERA si basa una procedura *step-wise*, cioè suddivisa in fasi, che si conclude quando esistono sufficienti informazioni per stabilire che è improbabile che il prodotto medicinale in questione rappresenti un rischio per l'ambiente, oppure per identificare e caratterizzare il potenziale rischio. Il procedimento viene condotto dall'*Applicant*, che ha il dovere e la responsabilità di giustificare

le proprie conclusioni. In caso la procedura identifichi potenziali rischi ambientali, l'*Applicant* dovrebbe proporre adeguate misure di precauzione e di sicurezza, da seguire durante la somministrazione del prodotto medicinale ai pazienti e per lo smaltimento dei residui.

L'ERA consiste di due fasi. La prima (Fase I) valuta l'esposizione dell'ambiente alla sostanza attiva, la seconda (Fase II) è suddivisa in due *Tier*: il *Tier A*, che prevede lo studio del destino ambientale e una iniziale valutazione degli effetti e dei rischi ambientali relativi alle sostanze in esame, e il *Tier B* che approfondisce e caratterizza i rischi ambientali eventualmente identificati nel *Tier A*. Vengono definiti specifici valori soglia di *Predicted Environmental Concentration* (PEC) che permettono di valutare la presenza di rischio ambientale nelle varie fasi e il passaggio a fasi successive di valutazione di rischio mediante test più specifici. La valutazione di rischio include il comparto acquatico (acque superficiali e di falda) e terrestre (suoli e sedimenti). Le procedure dei test da eseguire sono quelle indicate dall'*Organisation for Co-operation and Development* (OECD) della comunità europea, oppure nelle linee guida più recenti, relative al Regolamento (CE) 1907/2006 noto come Regolamento REACH (*Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals*) concernente la registrazione, la valutazione, l'autorizzazione e la restrizione delle sostanze chimiche

La versione rivista della linea guida (EMA/CHMP/SWP/4447/00 Rev.1) include una descrizione delle procedure da seguire molto più dettagliata e richiede alcune valutazioni aggiuntive. La Fase I prevede una valutazione di rischio come nella direttiva precedente e richiede parallelamente una valutazione delle caratteristiche di Persistenza, Bioaccumulo e Tossicità della sostanza (*PBT Assessment*). Nella Fase II il *Tier A* richiede valutazioni specifiche per un *panel* più ampio di comparti (acque di superficie, sedimenti, impianti di depurazione delle acque, acque di falda, suoli) e una valutazione specifica per sostanze in grado di bioaccumulare e creare effetti tossici legati al consumo di prede contaminate (*secondary poisoning*). Infine già in Fase I si richiede una valutazione specifica per alcune sostanze come gli antimicrobici e gli interferenti endocrini.

### 3.3.2. Farmaci ad uso veterinario

Per i prodotti medicinali veterinari (*Veterinary Medicinal Products*, VMP) a seguito del primo documento di orientamento del 1997 (EMA/CVMP/055/96-Final) entrano in vigore due linee guida successive, rispettivamente nel 2000 e nel 2005, che descrivono in modo specifico le valutazioni di rischio di Fase I (CVMP/VICH/592/98-Final) e di Fase II (CVMP/VICH/790/03-Final). Sinteticamente, la Fase I consiste nell'identificazione della natura della sostanza in esame (sostanza attiva, eccipienti, metaboliti) e nella valutazione del potenziale di esposizione ambientale. Mediante l'applicazione di un albero decisionale vengono escluse dalle successive analisi le sostanze a basso potenziale di esposizione ambientale, quindi con un probabile rischio ridotto per l'ambiente. Vengono valutati rischi per l'ambiente acquatico o terrestre a seconda dell'utilizzo di ciascuna sostanza, in caso di superamento dei valori soglia di *Expected Introduction Concentration* (EIC) per l'ambiente acquatico e di PEC per l'ambiente terrestre è prevista la prosecuzione alla Fase II. La Fase II è divisa in due *Tier*. Il *Tier A* prevede la valutazione di emissioni, distribuzione, esposizione, effetti e rischi ambientali della sostanza in esame. Complessivamente il *Tier A* prevede una valutazione conservativa del rischio, basata sui dati di esposizione e sugli effetti di tipo acuto, nel comparto ambientale critico. Nel caso la valutazione indichi per la sostanza in esame un possibile rischio per alcune specie ambientali, sono allora richiesti test più specifici, nell'ambito del *Tier B*.

Le informazioni sulla valutazione di rischio vengono infine raccolte in un'unica linea guida (EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1) (EMA CVMP, 2005) che entra in vigore nel 2009

mantenendo lo stesso schema delle precedenti ma fornendo informazioni tecniche più dettagliate sulla metodologia per condurre la valutazione di rischio.

### 3.3.3. Antimicrobici

La valutazione di rischio per la presenza di antimicrobici nell'ambiente viene analizzata in dettaglio per la prima volta nella recente revisione della linea guida per la valutazione di rischio dei farmaci ad uso umano (EMA/CHMP/SWP/4447/00 Rev.1, pubblicata nel 2018). Si prevede in Fase I una valutazione specifica (*tailored assessment*) per alcune classi di sostanze, in particolare per gli antimicrobici la valutazione di rischio richiesta si focalizza sui livelli trofici inferiori come batteri (Cianobatteri), alghe (alghe verdi) e invertebrati acquatici come *Daphnia magna* di cui è nota la sensibilità agli antibiotici (Dojmi di Delupis *et al.*, 1992) che ne alterano il microbiota intestinale compromettendo l'alimentazione e la crescita (Gorokhova *et al.*, 2015). Se si evidenziano effetti di tossicità, la sostanza passa direttamente alle valutazioni di Fase II descritte precedentemente.

## 3.4. Approccio regolatorio per la gestione dell'AMR

La WHO nel *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance* riporta che la resistenza antimicrobica ha raggiunto livelli preoccupanti in molte parti del mondo (WHO, 2015). Al fine di contrastare tale tendenza globale, l'Unione Europea ha già da tempo riconosciuto l'importanza di affrontare la resistenza antimicrobica, impostando una strategia comunitaria contro la resistenza antimicrobica già nel 2011 (Europa, 2011), per poi aggiornarla nel 2017 con un nuovo piano d'azione contro la resistenza antimicrobica: il Piano d'azione europeo *One Health*, lanciato dalla Commissione con la Comunicazione COM (2017) 339 (Europa, 2017), che riguarda tutti gli antimicrobici come antibiotici, antivirali, antimicotici e antiprotocisti.

Il Piano prevede un rafforzamento delle azioni esistenti tramite un approccio maggiormente integrato tra salute, agricoltura e ambiente, nonché nuove attività che possano rendere più incisiva la lotta alla resistenza antimicrobica. Tra le azioni previste dal Piano, che riguardano in modo più specifico l'ambiente, si trovano incentivi a considerare l'ambiente come fattore che può contribuire alla diffusione della resistenza antimicrobica e indicazioni volte a colmare le lacune conoscitive sulla resistenza antimicrobica nell'ambiente.

Il 22 novembre 2017 la Commissione europea ha lanciato una consultazione pubblica per individuare nuovi strumenti (legislativi e non) per affrontare la questione dei farmaci nell'ambiente. La consultazione è stata svolta sulla base del mandato previsto dalla Direttiva 2013/39/UE (elenco delle sostanze prioritarie nelle acque; Europa, 2013) che prevede la definizione di un approccio strategico sulla questione dei farmaci nell'ambiente, anche per facilitare il raggiungimento dell'obiettivo n.6 dell'Agenda 2030 delle Nazioni Unite per lo sviluppo sostenibile ("un'acqua pulita e sicura"). La consultazione si è conclusa il 21 febbraio 2018 e le relative conclusioni sono oggetto di una specifica Comunicazione: "Approccio strategico dell'Unione europea riguardo all'impatto ambientale dei farmaci" (COM (2019) 128 final; Europa, 2019). Tale approccio riguarda i farmaci in generale e non solamente gli antimicrobici e copre tutte le fasi del ciclo di vita dei prodotti farmaceutici, dalla progettazione e produzione fino all'uso e allo smaltimento. In merito all'AMR, la Commissione intende ampliare la portata del monitoraggio ambientale, valutando la possibilità di estenderlo a microrganismi e geni antimicrobico-resistenti. Inoltre la Commissione intende colmare le lacune conoscitive in merito alla relazione tra la presenza di antimicrobici nell'ambiente (se possibile, anche

l'introduzione e la presenza naturale di geni di antimicrobico-resistenza) e lo sviluppo e la diffusione della resistenza antimicrobica.

Alcuni Paesi hanno iniziato già da tempo ad affrontare l'insorgenza di antimicrobico-resistenze con un approccio regolatorio a livello nazionale.

L'uso di antibiotici nella produzione alimentare in Norvegia è molto ridotto perché è rigorosamente regolato. Per esempio, il consumo di antibiotici nella produzione di salmonidi negli ultimi dieci anni è stato di circa 1 mg/kg di pesce prodotto. Su questa base il consumo di antimicrobici nell'acquacoltura norvegese implica una bassissima probabilità di sviluppo di resistenza antimicrobica nei pesci di allevamento e la trasmissione di tale resistenza alle comunità microbiche naturali e all'uomo (Norwegian Veterinary Institute, 2016).

Particolarmente significativo risulta l'esempio della Danimarca, che ha promosso dagli anni '90 del secolo scorso una campagna per limitare l'uso di antimicrobici – in particolare antibiotici – nel settore della produzione suina, dopo aver riscontrato che la quantità di antibiotici prescritti per la promozione della crescita nei suini e nel pollame aveva superato di gran lunga l'uso terapeutico dei farmaci. In seguito a numerosi studi e valutazioni, anche di carattere socioeconomico, nel 1995 la Danimarca è diventata il primo Paese europeo a vietare tutti gli usi dell'avoparcina e, nel 1999, ogni uso non terapeutico di antibiotici: un enorme cambiamento per una nazione che è tra i principali esportatori mondiali di carne suina (Levy, 2014). Tali riforme hanno mostrato solidi progressi nel ridurre la prevalenza di batteri resistenti: nella maggior parte dei casi, l'interruzione dell'uso non terapeutico di antibiotici nel bestiame ha portato a una significativa riduzione dei microbi resistenti negli animali e nella carne entro un anno o due, mentre in altri casi, a seconda del farmaco coinvolto e di altri fattori, si è riscontrata una decrescita più lenta della resistenza (Levy, 2014). Questi risultati sarebbero stati riscontrati a fronte di un aumento irrisorio dei costi di produzione. Tale esempio si basa su di un approccio integrato frutto della collaborazione tra le amministrazioni centrali, i professionisti veterinari privati e i produttori di suini, grandi e piccoli. Inoltre, grazie alla politica messa in atto dalla Danimarca che ha previsto investimenti in strategie per la prevenzione delle infezioni (es. migliorando l'igiene, l'alimentazione e le strutture abitative), l'uso complessivo di antibiotici nel settore suino continua a diminuire (FAO, Denmark Ministry of Environment and Food – Danish Veterinary and Food Administration, 2019).

Un'azione altamente innovativa per ridurre la presenza di farmaci e antibiotici potenzialmente pericolosi nell'ambiente è stata portata avanti dalla Svezia dove lo *Stockholm County Council and Apoteket* e lo *Swedish Chemicals Inspectorate* hanno messo a punto un modello per la classificazione dei farmaci in base alle loro caratteristiche ecotossicologiche. Ne è derivato un opuscolo in cui tutti i principali farmaci utilizzati in Svezia sono stati classificati in base alla loro azione e, secondariamente, in base ai rischi ambientali correlati al loro utilizzo (Stockholm County Council, 2012). L'opuscolo pubblicato in una prima versione nel 2006 è stato poi aggiornato periodicamente e distribuito a tutti i medici prescrittori svedesi con il suggerimento di tener conto, per farmaci di pari attività e costo, anche delle caratteristiche ambientali, prescrivendo ai propri pazienti il farmaco più ecocompatibile. Questa iniziativa ha permesso di sensibilizzare i medici prescrittori sui rischi ambientali dei farmaci e di allertare l'industria farmaceutica perché inizi a considerare queste tematiche.

Recentemente la Svizzera ha sviluppato e adottato un'ordinanza per la protezione delle acque superficiali da microinquinanti (Ordinanza 814.201 del 2015) (AFAM, 2015), che prevede l'obbligo di introdurre nei depuratori delle acque tecnologie di trattamento avanzate per la riduzione dell'80% dell'immissione nell'ambiente di 12 sostanze specificamente selezionate (DATEC, 2016). Questa lista include vari farmaci e un solo antibiotico, il macrolide claritromicina.

In linea con le strategie adottate a livello europeo e internazionale, il Ministero della Salute ha predisposto nell'ottobre del 2017 un Piano nazionale di contrasto all'AMR (PNCAR 2017-2020) (Ministero della Salute, 2017), la cui attuazione è coordinata da un Gruppo di lavoro istituito nel novembre del 2017, che vede coinvolti rappresentanti di istituzioni nazionali e regionali, oltre che di enti di ricerca che offrono supporto tecnico-scientifico.

I principali ambiti di intervento individuati dal PNCAR sono:

- Sorveglianza;
- Prevenzione e controllo delle infezioni;
- Uso corretto degli antibiotici;
- Formazione;
- Comunicazione e Informazione;
- Ricerca e Innovazione.

## 4. PNCAR E AMBIENTE: ELEMENTI PRIORITARI D'INTERVENTO

### 4.1. Innovazione nei sistemi di depurazione dei reflui civili e ospedalieri: possibilità di intervento

Ad oggi gli effluenti dei reflui civili e ospedalieri sono considerati la principale fonte di contaminazione ambientale puntiforme da determinanti di AMR. I reflui ospedalieri possono essere pretrattati oppure immessi direttamente nei reflui civili portando quindi un ampio carico di antibiotici e farmaci in generale, nonché di ARB. Le concentrazioni di antibiotici, geni di resistenza e batteri antibiotico-resistenti nei reflui (anche trattati) è generalmente di 2-5 ordini di grandezza superiore rispetto a quella dei corpi idrici superficiali naturali, a conferma dell'elevato impatto delle attività umane nella promozione dell'ambiente antropizzato come *reservoir* naturale di resistenze (Berendonk *et al.*, 2016; Di Cesare *et al.*, 2015). I sistemi di trattamento oggi più utilizzati prevedono trattamenti secondari o terziari con un passaggio finale di disinfezione del refluo, al fine di abbattere il numero totale di batteri patogeni, misurati attraverso lo storico parametro di *E. coli* coltivabile. È ampiamente dimostrata sia la scarsissima efficienza di questi trattamenti nell'abbattimento dei geni di resistenza, spesso legati a batteri che riescono a sopravvivere al trattamento finale di disinfezione, sia la selezione in favore degli stessi geni di resistenza quando la disinfezione agisce su comunità batteriche già naturalizzate dalla permanenza nelle vasche di sedimentazione (Alexander *et al.*, 2017; Di Cesare *et al.*, 2016a). Non si è quasi mai tenuto conto inoltre della potenziale importanza del DNA extracellulare prodotto dalla distruzione per disinfezione delle cellule dei batteri resistenti, che riversa in ambiente frammenti di DNA contenenti geni di resistenza e tantomeno le resistenze portate da virus (il cosiddetto viroma). Entrambe queste forme, in ambiente, sono a disposizione delle comunità naturali antropizzate per una potenziale acquisizione *via* trasferimento genico orizzontale.

Studi più recenti hanno dimostrato come i sistemi convenzionali di disinfezione chimica (in Italia domina l'utilizzo di cloro, seguito poi da acido peracetico e perossido) sono in realtà molto aggressivi, e se generalmente portano all'abbattimento della stragrande maggioranza dei batteri, in alcuni casi oltre il 99%, portano anche ad una forte selezione di ARB tra i sopravvissuti (Di Cesare *et al.*, 2016b), e in modo simile agisce anche la più recente tecnologia di disinfezione tramite ozono (Alexander *et al.*, 2017). L'utilizzo di radiazione UV, danneggiando il DNA, sembra essere più efficiente in questo senso, ma soffre della scarsa affidabilità del metodo, che è altamente influenzato dalla torbidità del refluo stesso, oltre che dagli elevati costi di utilizzo. Nuovi metodi di disinfezione (*Advanced Oxidation Processes*, AOP) sono allo studio in fase anche molto avanzata, ma soffrono comunque di scarsa specificità e quindi di limitata efficienza. L'utilizzo di membrane insieme all'utilizzo di carboni attivi di ultima generazione, ad oggi, parrebbe la soluzione migliore, ma anche in questo caso gli elevatissimi costi di utilizzo e la scarsa praticità dei prodotti ad oggi in commercio ne limitano l'utilizzo su larga scala. Inoltre, considerando la possibilità promossa dalle politiche EU di recuperare a scopi irrigui e potabili l'acqua reflua trattata, bisogna considerare che un abbattimento del 99% o oltre del numero di batteri è del tutto inutile se poi il refluo, con pochi batteri ma potenzialmente patogeni e AR viene a formare un canale irriguo dove, in assenza di competitori naturali e predatori, le poche cellule sopravvissute potrebbero sviluppare grandi popolazioni in poche centinaia di metri.

Ad oggi una nuova filosofia di trattamento che si può semplificare nel motto "let nature play its role" prevede l'abbattimento di batteri di origine antropica e di resistenze attraverso

l'allungamento dei tempi di ritenzione dei reflui nelle vasche di sedimentazione dove i fattori ecologici naturali (competizione, predazione) selezionano comunità microbiche più simili a quelle naturali, in cui i batteri di origine antropica hanno pochissime possibilità di sopravvivere. Questo tipo di intervento presupporrebbe però un investimento nella riprogettazione di molti impianti oggi esistenti.

Non va poi dimenticato il problema dell'utilizzo di metalli e altri agenti chimici nell'abbattimento dei nutrienti (es. fosforo), causa di forti fenomeni di co-selezione genica e quindi di promozione di antibiotico-resistenze direttamente in impianto.

Infine, sull'esempio di altre nazioni europee, dovrebbe essere vietato o fortemente limitato l'utilizzo dei fanghi di depurazione, anche trattati, in agricoltura. È infatti ampiamente dimostrato come questi fanghi siano veri e propri incubatori di resistenze, che attraverso le pratiche agricole poi si distribuiscono non solo nell'ambiente ma anche direttamente nei prodotti alimentari.

In ogni caso sarebbe auspicabile, conformemente ai principi dell'economia circolare, un intervento innovativo anche da parte delle industrie farmaceutiche, in particolare nella fase di progettazione dei principi attivi dei medicinali, per realizzare sostanze attive sostenibili.

## 4.2. Prospettive di innovazione nella gestione degli allevamenti intensivi

Per limitare l'uso degli antibiotici negli allevamenti intensivi una soluzione potrebbe essere utilizzare sistemi diversi di protezione degli animali dalle malattie batteriche (Marquardt & Li, 2018), sebbene l'allevamento intensivo è basato su densità di allevamento estremamente elevate che favoriscono il contagio.

La vaccinazione è un modo molto efficace per prevenire le infezioni e quindi la necessità di usare gli antibiotici.

Un nodo importante per contrastare la resistenza agli antibiotici e ridurre malattie e morti prevenibili è fare un uso più efficiente dei vaccini esistenti e svilupparne di nuovi.

Interessanti alternative all'immunizzazione con agenti patogeni interi sono i vaccini a subunità (Bobbala & Hook, 2016), a DNA (Liao *et al.*, 2017) e a RNA (Reichmuth *et al.*, 2016) e l'uso degli adiuvanti, che sono componenti cruciali dei vaccini in quanto riducono la quantità e il numero di dosi necessarie per ottenere un'immunità efficace (Garg *et al.*, 2017). I peptidi antimicrobici di difesa dell'ospite e i loro corrispondenti sintetici sono candidati promettenti per combattere i batteri patogeni. La loro carica cationica e l'anfifilicità sono i due tratti chiave ma il loro uso è ostacolato da costi, tossicità e limitata distribuzione nei tessuti (Marquardt & Li, 2018).

L'immunoterapia orale (immunizzazione passiva) con anticorpi è un approccio efficace per il controllo delle malattie enteriche per la loro specificità, efficacia e rapidità d'azione. La somministrazione orale di anticorpi derivati da siero e colostro di mammifero e persino di anticorpi monoclonali è stata utilizzata con successo ma, anche in questo caso, il suo uso è limitato dall'alto costo (Marquardt & Li, 2018). L'immunoglobulina Y (l'immunoglobulina di tuorlo d'uovo di gallina) somministrata per via orale è stata utilizzata per prevenire o curare diverse malattie batteriche e virali in mammiferi, uccelli e pesci (Kovacs-Nolan & Mine, 2012) ed è efficace nel ridurre l'incidenza della diarrea anche in suini, topi, pollame e vitelli (Diraviyam *et al.*, 2014). Sebbene l'immunoglobulina Y abbia dimostrato di essere estremamente efficace nel controllo dei patogeni intestinali (Yokoyama *et al.*, 1992; Marquardt *et al.*, 1999), è necessario condurre ulteriori ricerche per aumentare l'efficacia del trattamento anticorpale.

Un'altra tecnica interessante, che potrebbe avere sviluppo nel prossimo futuro è la produzione di anticorpi nelle piante, con tecniche biotecnologiche che ne permettano una produzione su larga

scala (Buyel *et al.*, 2017; Edgue *et al.*, 2017) con sicurezza, velocità, e basso costo. Anche in questo caso c'è bisogno ancora di molto lavoro.

Da ultimo, come sostituti degli antibiotici e promotori della crescita potrebbero essere usati gli eubiotici (probiotici, prebiotici, acidi organici, enzimi esogeni, oli essenziali ed erbe), in grado di mantenere l'eubiosi intestinale negli animali da allevamento (Dhama *et al.*, 2014). Anche in questo caso bisogna ulteriormente lavorare su questa possibilità, anche sfruttando l'approccio genetico per rafforzare o creare nuovi probiotici con applicazione immuno-terapeutica.

Discorso a parte andrebbe proposto per l'acquacoltura, in particolare nelle gabbie a mare, dove l'utilizzo sistematico di antimicrobici andrebbe vietato, compreso l'utilizzo routinario di alimentazione "medicata". Dovrebbe essere prevista una riduzione nella densità degli allevamenti e la possibilità di isolare in vasche separate, che permettano il controllo e la gestione sicura dello scarico di reflui, i pesci che presentano problematiche sanitarie. In questo modo si potrebbe contrastare attivamente la diffusione delle malattie e limitare l'uso di antimicrobici, evitando l'immissione diretta di principi attivi negli ambienti dulciacquicoli e marini.

### **4.3. Informazione ed educazione della popolazione a un corretto uso e smaltimento degli antimicrobici**

L'educazione della popolazione ad un corretto uso degli antibiotici è sicuramente di prioritaria importanza per controllare l'immissione nell'ambiente. L'esempio svedese descritto precedentemente è stato un primo passo rilevante, ma non è stato seguito da altri paesi fino ad oggi. Molto potrebbe fare una corretta educazione dei medici prescrittori e dei consumatori all'utilizzo e allo smaltimento appropriato degli antibiotici, soprattutto quelli scaduti che andrebbero consegnati in farmacia per uno smaltimento adeguato. Questo problema viene discusso da circa un ventennio (Daughton, 2003), ma ha ottenuto fino ad ora poche risposte pratiche. In un recente rapporto "Gli italiani e gli antibiotici: informazione, utilizzo e consapevolezza del fenomeno dell'antimicrobico resistenza" (Censis, 2020) – che espone i risultati di un'indagine nazionale realizzata dal Censis su incarico e in collaborazione con il Settore di Igiene dell'Università di Foggia, nell'ambito di un Progetto finanziato dal Centro per il Controllo delle Malattie (CCM) del Ministero della Salute – solo il 59% degli italiani sottoposti all'indagine dichiara che gettare gli antibiotici non utilizzati o scaduti nei rifiuti domestici o nell'ambiente contribuisce in modo importante all'AMR. Parallelamente si è sviluppata la *green pharmacy*, un tentativo di stimolare la nascita di una farmaceutica più ecocompatibile che tenga conto anche dei risvolti ambientali di ciò che produce (Daughton, 2003). Più recentemente è stato coniato il termine di "eco-farmacovigilanza" per la "farmacosorveglianza ambientale", cioè la valutazione dell'impatto e degli effetti della presenza di farmaci nell'ambiente in relazione alle attività regolatorie vigenti (Migliore, 2007; Jose *et al.*, 2019).

### **4.4. Lacune conoscitive da colmare mediante attività di ricerca sul rapporto tra AMR e ambiente**

Il ruolo dei diversi parametri ambientali e dei fattori ecologici, nel limitare o promuovere la diffusione delle antibiotico-resistenze è oggetto di una gran mole di ricerche a livello mondiale. Se è ampiamente dimostrato come sistemi e zone dove l'introduzione costante di batteri resistenti abbia provocato la stabilizzazione delle stesse resistenze nelle comunità batteriche residenti (es.

mercati, ospedali, aree industriali con produzione di farmaci, aerei di linea, ecc.) non è assolutamente chiaro quanto i diversi fattori naturali o antropogenici favoriscano lo svilupparsi di resistenze e il loro potenziale trasferimento all'uomo. Per esempio, è stato dimostrato come la proporzione tra acque reflue trattate e acque superficiali sia un fattore chiave per la stabilizzazione in natura dei geni di resistenza (più alta la percentuale di reflu, più stabile il resistoma, indipendentemente dalla sorte dei batteri resistenti originali; Corno *et al.*, 2019) o come anche un'acqua reflua *bacteria free* di altissima qualità possa modificare – nel senso di favorire batteri AR e potenzialmente patogeni – una comunità microbica naturale (Subirats *et al.*, 2019). Inoltre è stato appurato il ruolo di altri inquinanti (es. microplastiche) nel favorire la stabilizzazione di batteri alloctoni e potenzialmente patogeni e AB resistenti in ambiente naturale (Eckert *et al.*, 2018; Arias *et al.*, 2018). Conoscere quanto questi fenomeni siano sviluppati sul territorio nazionale, e i rischi ad essi sottesi, è fondamentale per capire meglio il ruolo dell'ambiente nel ciclo delle resistenze e approntare misure per ridurne l'impatto.

In questo senso sarebbe importante sviluppare una rete nazionale di monitoraggio ambientale degli antibiotici e dell'AMR coinvolgendo, in prima battuta, le Agenzie Regionali e Provinciali per la Protezione Ambientale (ARPA/APPA), nell'ambito del Sistema Nazionale a rete per la Protezione dell'Ambiente istituito ai sensi della Legge 132/2016, che sono già impegnate nel monitoraggio delle sostanze previste dalla *Watch List* della Direttiva Quadro sulle Acque (*Water Framework Directive*).

In considerazione della variabilità da regione a regione della contaminazione ambientale da parte di antibiotici e microrganismi patogeni antibiotico-resistenti, è fondamentale implementare la rete di monitoraggio che è attualmente costituita dalle sole stazioni di acque superficiali per le quali vengono determinate le concentrazioni dei 5 antibiotici previsti dalla *Watch List* della Direttiva Quadro sulle Acque. Nello specifico è necessario sia ampliare la numerosità delle stazioni di acque monitorate sia estendere la ricerca ad altre matrici come i terreni agricoli, in particolare quelli su cui vengono sparsi fanghi di depurazione o letame proveniente da allevamenti. Oltre alle stazioni di campionamento per le acque indagate finora, è necessario monitorare gli scarichi di siti quali ospedali e strutture di cura, allevamenti, impianti di depurazione (anche per valutare l'effettiva efficacia dei trattamenti di rimozione) e impianti di acquacoltura. Oltre ad implementare il monitoraggio chimico di antibiotici e metaboliti nelle matrici ambientali, sarebbe auspicabile che la rete di monitoraggio si attrezzasse per la determinazione di batteri resistenti e geni di resistenza.

Poiché i reflui urbani sono ricchi di antibiotici e di geni di resistenza e raccolgono spesso anche reflui ospedalieri, potrebbe essere utilizzata una nuova metodologia chiamata “epidemiologia delle acque reflue” per valutare la correlazione tra uso di antibiotici e presenza di AMR. L'approccio consiste nell'analisi chimica dei reflui in entrata ai depuratori per stimare l'utilizzo di sostanze nella popolazione. Nel caso specifico si potrebbe quantificare la presenza di prodotti del metabolismo umano che riflettano l'uso effettivo di antibiotici ed effettuare parallelamente un'analisi della presenza di geni di resistenza agli antibiotici. Questo permetterebbe di caratterizzare la presenza di AMR in un'intera popolazione e correlarla direttamente all'uso di antibiotici nella popolazione stessa, prendendo quindi in considerazione non solo l'apporto derivante dalla clinica, peraltro già ben caratterizzato, ma anche l'apporto legato all'uso comune di antibiotici nella popolazione generale, che possiamo definire “sana”.

## BIBLIOGRAFIA

- 1 Health 4 Food. Summary ESBL-Attribution-analysis (ESBLAT) One Health for Food (1H4F); 2018. Disponibile all'indirizzo: [https://www.uu.nl/sites/default/files/summary\\_esbl\\_attribution\\_en.pdf](https://www.uu.nl/sites/default/files/summary_esbl_attribution_en.pdf); ultima consultazione 15/02/21.
- AA.VV. Acquacoltura. In: II Suppl Lessico Universale Italiano. *Istituto della Enciclopedia Italiana nell'Enciclopedia Treccani* Roma, 1998.
- AFAM (Ufficio federale dell'ambiente). *Ordinanza sulla protezione delle acque (OPAc)*. Berna: Consiglio Federale Svizzero; 2015. Disponibile all'indirizzo: <https://www.news.admin.ch/news/message/attachments/42171.pdf>; ultima consultazione 15/02/21.
- AIFA. Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali. *L'uso degli antibiotici in Italia. Rapporto Nazionale 2018*. Roma: Agenzia Italiana del Farmaco 2019.
- Ashiru-Oredope D, Kerr F, Hughes S, Urch J, Lanzman M, Yau T, et al. Assessing the Impact of COVID-19 on Antimicrobial Stewardship Activities/Programs in the United Kingdom. *Antibiotics* 2021
- Bengtsson-Palme J, Larsson DGJ. Concentrations of antibiotics predicted to select for resistant bacteria: Proposed limits for environmental regulation. *Environment International* 2016;86:140-9. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2015.10.015>; ultima consultazione 15/02/21.
- Bentivegna E, Alessio G, Spuntarelli V, Luciani M, Santino I, Simmaco M, et al. Impact of COVID-19 prevention measures on risk of health care-associated *Clostridium difficile* infection. *American Journal of Infection Control* 2020;S0196-6553(20)30891-9. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2020.09.010>; ultima consultazione 15/02/21.
- Berendonk TU, Manaia CM, Merlin C, Fatta-Kassinos D, Cytryn E, Walsh F, et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology* 2015;13:310-7.
- Blasi MF, Migliore L, Mattei D, Rotini A, Thaller MC, Alduina R. Antibiotic resistance of Gram-negative bacteria from wild captured loggerhead sea Turtles. *Antibiotics* 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://www.mdpi.com/2079-6382/9/4/162>; ultima consultazione 15/02/21.
- Bobbala S, and Hook S. Is there an optimal formulation and delivery strategy for subunit vaccines? *Pharmaceutical Research* 2016;33:2078–2097.
- Boxall ABA, Rudd MA, Brooks BW, Caldwell DJ, Choi K, Hickmann S, et al. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environmental Health Perspectives* 2012;120(9):1221-9.
- Brambilla G, Patrizii M, De Filippis SP, Bonazzi G, Mantovi P, Barchi D, et al. Oxytetracycline as environmental contaminant in arable lands. *Analytica Chimica Acta* 2007;586(1):326-9.
- Bush K, Courvalin P, Zgurskaya HI. Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2011;(9)894-6.
- Buyel JF, Twyman RM, Fischer R. Very-large-scale production of antibodies in plants: the biologization of manufacturing. *Biotechnology Advances* 2017;35:458-65.
- Calabrese EJ, Baldwin LA. Defining hormesis, *Human & Experimental Toxicology* 2002;21:91-7.
- Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis: U-shape dose response and their centrality in toxicology. *Trend in Pharmacological sciences* 2001;22(6):285-91.
- Calabrese EJ, Blain RB. Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution* 2009;157: 42-48.
- Calabrese EJ. Hormesis: Improving Predictions in the Low-Dose Zone. In: Luch A (Ed). Molecular, clinical and environmental toxicology. *Experientia Supplementum* 2012;101(3):551-64.

- Calabrese EJ. Hormesis: why it is important to toxicology and toxicologists. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2008;27(7):1451-74.
- Cantón R, Gijón D, Ruiz-Garbajosa P. Antimicrobial resistance in ICUs: an update in the light of the COVID-19 pandemic. *Current Opinion in Critical Care* 2020;26(5):433-41.
- Castiglioni S, Bagnati R, Fanelli R, Pomati F, Calamari D, Zuccato E. Removal of pharmaceuticals in sewage treatment plants in Italy. *Environmental Science & Technology* 2006;40:357-63.
- Castiglioni S, Davoli E, Riva F, Palmiotto M, Camporini P, Manenti A, *et al.* Mass balance of emerging contaminants in the water cycle of a highly urbanized and industrialized area of Italy. *Water Research* 2018;131:287-98.
- Censis. *Gli italiani e gli antibiotici: informazione, utilizzo e consapevolezza del fenomeno dell'antimicrobico resistenza*. Roma: Centro Studi Investimenti Sociali; 2020. Disponibile all'indirizzo: [https://www.censis.it/sites/default/files/downloads/rapporto\\_finale\\_antibiotici.pdf](https://www.censis.it/sites/default/files/downloads/rapporto_finale_antibiotici.pdf); ultima consultazione 15/02/21.
- Chapman PM. The implication of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. *Human & Experimental Toxicology* 2001;20(10):499-505.
- Chen S, Wang J, Feng H, Shen D, He S, Xu Y. Quantitative study on the fate of antibiotic emissions in China. *Environmental Geochemistry and Health* 2020;42:3471-9.
- Chowdhary A, Tarai B, Singh A, Sharma A. Multidrug-resistant *Candida auris* infections in critically ill coronavirus disease patients, India, April-July 2020. *Emerging Infectious Disease* 2020;26(11):2694-6.
- Contou D, Claudinon A, Pajot O, Micaëlo M, Flandre PL, Dubert M, *et al.* Bacterial and viral co-infections in patients with severe SARS-CoV-2 pneumonia admitted to a French ICU. *Annals Intensive Care*. 2020;10(1):119.
- Corno G, Coci M, Giardina M, Plechuk S, Campanile F, Stefani S. Antibiotics promote aggregation within aquatic bacterial communities. *Frontiers in Microbiology* 2014;5:143.
- Corno G, Yang Y, Eckert EM, Fontaneto D, Fiorentino A, Galafassi S, *et al.* Effluents of wastewater treatment plants promote the rapid stabilization of the antibiotic resistome in receiving freshwater bodies. *Water Research* 2019;158,:72-81.
- Corte dei Conti europea. *Lotta alla resistenza antimicrobica: nonostante i progressi compiuti nel settore veterinario, permane la minaccia sanitaria per l'UE*. Luxembourg: Unione Europea; 2019. (Relazione speciale n. 21/2019). Disponibile all'indirizzo: <https://www.eca.europa.eu/it/Pages/DocItem.aspx?did=51992>; ultima consultazione 15/02/21.
- DATEC. *Ordinanza del DATEC del 3 novembre 2016 concernente la verifica dell'efficienza depurativa delle misure volte a eliminare sostanze organiche in tracce negli impianti di depurazione delle acque di scarico*. Berna: Dipartimento federale dell'ambiente, dei trasporti, dell'energia e delle comunicazioni; 2016. (RS 814.201.231). Disponibile all'indirizzo: <https://www.admin.ch/opc/it/classified-compilation/20160123/index.html>; ultima consultazione 15/02/21.
- Daughton CG. Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. II. Drug disposal, waste reduction, and future directions. *Environmental Health Perspectives* 2003;111(5):775-85.
- Dhama K, Tiwari R, Khan RU, Chakraborty S, Gopi M, Karthik K, Saminathan M, Desingu PA, Sunkara LT. Growth promoters and novel feed additives improving poultry production and health, bioactive principles and beneficial applications: the trends and advances—a review. *International Journal of Pharmacology* 2014;10(3):129-59.
- Di Cesare A, Eckert EM, D'Urso S, Bertoni R, Gillan DC, Wattiez R, *et al.* Co-occurrence of integrase 1, antibiotic and heavy metal resistance genes in municipal wastewater treatment plants. *Water Research* 2016a;94:208-14.

- Di Cesare A, Eckert EM, Rogora M, Corno G. Rainfall increases the abundance of antibiotic resistance genes within a riverine microbial community. *Environmental Pollution* 2017;226:473-8.
- Di Cesare A, Eckert EM, Teruggi A, Fontaneto D, Bertoni R, Callieri C, Corno G. Constitutive presence of antibiotic resistance genes within the bacterial community of a large subalpine lake. *Molecular Ecology* 2015;24:3888-3900.
- Di Cesare A, Fontaneto D, Doppelbauer J, Corno G. Fitness and recovery of bacterial communities and antibiotic resistance genes in urban wastewaters exposed to classical disinfection treatments. *Environmental Science & Technology* 2016b;50(18):10153-61.
- Diraviyam T, Zhao B, Wang Y, Schade R, Michael A, Zhang X. Effect of chicken egg yolk antibodies (IgY) against diarrhea in domesticated animals: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(5):e97716.
- Dojmi di Delupis G, Macrí A, Civitareale C, Migliore L. Antibiotics of zootechnical use: Effects of acute high and low dose contamination on *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology* 1992;22(1):53-9.
- Dolejska M, Literak I. Wildlife Is overlooked in the epidemiology of medically important antibiotic-resistant bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019;63(8)e01167-19.
- Donà D, Di Chiara C, Sharlanda M. Multi-drug-resistant infections in the COVID-19 era: a framework for considering the potential impact. *Journal of Hospital Infection* 2020;106(1):198-9.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews* 2002;15(2):167-93.
- Dorado-García A, Smid JH, van Pelt W, Bonten MJM, Fluit AC, van den Bunt G, *et al.* Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2018;73(2):339-47.
- ECDC. *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2019.
- Eckert EM, Di Cesare A, Coci M, Corno G. Persistence of antibiotic resistance genes in large subalpine lakes: the role of anthropogenic pollution and ecological interactions. *Hydrobiologia* 2018;824(1):93-108.
- Edgue G, Twyman RM, Beiss V, Fischer R, Sack M. Antibodies from plants for bionanomaterials. *WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology* 2017;9(6):e1462.
- EMA. *Guideline on the environmental risk assessment of medicinal products for human use*. London: European Medicines Agency; 2018. (EMA/CHMP/SWP/4447/00 Rev.1).
- EMA. *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC)*. Amsterdam: European Medicines Agency; 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac>; ultima consultazione 17/02/21.
- EMA CPMP. *Guideline on environmental impact assessment for veterinary medicinal products in support of the VICH guidelines GL6 and GL38*. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 2005. (EMA/CVMP/ERA/418282/2005-Rev.1).
- EMA CPMP. Note for guidance on the quality, preclinical and clinical aspects of gene transfer medicinal products. *EMA*, London, UK. CPMP/BPW/3088/99; 2001.
- EMA. *CVMP Note for Guidance: Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products other than GMO Containing and Immunological Products (EMA/CVMP/055/96-FINAL). Guidelines on environmental impact assessment (EIAS) for veterinary medicinal products – phase I and II (CVMP/VICH/592/98-FINAL; CVMP/VICH/790/03-FINAL)*. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 1997.

- EMA. *Note for Guidance: Environmental Risk Assessment for Veterinary Medicinal Products Other Than GMO-Containing and Immunological Products*. London: European Agency for the Evaluation of Medicinal Products; 1997.
- Europa. Direttiva 76/464/CEE del Consiglio, del 4 maggio 1976, concernente l'inquinamento provocato da certe sostanze pericolose scaricate nell'ambiente idrico della Comunità. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* L 129 del 18.5.1976
- Europa. Direttiva 2000/60/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 23 ottobre 2000, che istituisce un quadro per l'azione comunitaria in materia di acque. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* L 327 del 22.12.2000.
- Europa. Decisione n. 2455/2001/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 novembre 2001, relativa all'istituzione di un elenco di sostanze prioritarie in materia di acque e che modifica la direttiva 2000/60/CE. *Gazzetta Ufficiale delle Comunità europee* L 331 del 15.12.2001
- Europa. Direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 16 dicembre 2008, relativa a standard di qualità ambientale nel settore della politica delle acque. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 348 del 24.12.2008.
- Europa. *Comunicazione della Commissione al Parlamento Europeo e al Consiglio. Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR)*. Bruxelles: Commissione Europea; 2011. (COM(2011) 748 definitivo). *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 303 del 14.11.2013.
- Europa. Direttiva 2013/39/UE del Parlamento europeo e del Consiglio del 12 agosto 2013 che modifica le direttive 2000/60/CE e 2008/105/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 226 del 24.8.2013
- Europa. Decisione di esecuzione (UE) 2015/495 della Commissione del 20 marzo 2015 che istituisce un elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione nel settore della politica delle acque in attuazione della Direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 78 del 24.3.2015
- Europa. *Comunicazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento Europeo. Piano d'azione europeo "One Health" contro la resistenza antimicrobica*. Bruxelles: Commissione Europea; 2017. (COM(2017) 339 final).
- Europa. *Risoluzione del Parlamento europeo del 13 settembre 2018 su un Piano d'azione europeo "One Health" contro la resistenza antimicrobica (2017/2254(INI))*. Strasburgo: Parlamento europeo; 2018.
- Europa. Decisione di esecuzione (UE) 2018/840 della Commissione del 5 giugno 2018 che istituisce un elenco di controllo delle sostanze da sottoporre a monitoraggio a livello dell'Unione nel settore della politica delle acque in attuazione della Direttiva 2008/105/CE del Parlamento europeo e del Consiglio e che abroga la decisione di esecuzione (UE) 2015/495 della Commissione. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 141 del 7.6.2018.
- Europa. *Comunicazione della Commissione al Parlamento Europeo, al Consiglio e al Comitato Economico e Sociale Europeo. Approccio strategico dell'Unione europea riguardo all'impatto ambientale dei farmaci*. Bruxelles: Commissione Europea; 2019. (COM(2019) 128 final).
- EAHP. *Medicines shortages in European hospitals*. Brussels: European Association of Hospital Pharmacists; 2018. Disponibile all'indirizzo: [https://www.eahp.eu/sites/default/files/shortages\\_report05online.pdf](https://www.eahp.eu/sites/default/files/shortages_report05online.pdf); ultima consultazione 17/03/21.
- ECDC. *Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report 2019*. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control; 2020.
- FAO, Denmark Ministry of Environment and Food – Danish Veterinary and Food Administration. *Tackling antimicrobial use and resistance in pig production: lessons learned from Denmark*. Rome: Food and Agriculture Organization; 2019.
- Fattorini L, et al., Bacterial coinfections in COVID-19: an underestimated adversary. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 2020;56(3):359-64.

- Fiorentino A, Cucciniello R, Di Cesare A, Fontaneto D, Prete P, Rizzo L, Corno G, Proto A. Disinfection of urban wastewater by a new photo-Fenton like process using Cu-iminodisuccinic acid complex as catalyst at neutral pH. *Water Research* 2018;146:206-15.
- Ford S. Infection control concerns spark new advice on PPE use during Covid-19 crisis. *Nursing Times* 21 May, 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://www.nursingtimes.net/news/policiesand-guidance/infection-control-concerns-spark-new-advice-onppe-use-during-covid-19-crisis-21-05-2020/>; ultima consultazione 17/02/21.
- Garcia-Vidal C, Sanjuan G, Moreno-García E, Puerta-Alcalde P, Garcia-Pouton N, Chumbita M, *et al.* Incidence of co-infections and superinfections in hospitalised patients with COVID-19: a retrospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection* 2021;27(1):83-8. Disponibile all'indirizzo: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.07.041>; ultima consultazione 17/02/21.
- Garg R., Babiuk L, van Drunen Littel-van den Hurk S, Gerdts V. A novel combination adjuvant platform for human and animal vaccines. *Vaccine* 2017;35(35 Pt A):4486-9.
- Gaze WH, Zhang L, Abdousslam NA, Hawkey PM, Calvo-Bado L, Royle J, *et al.* Impacts of anthropogenic activity on the ecology of class 1 integrons and integron-associated genes in the environment. *The ISME Journal* 2011;5:1253-61.
- Gillings MR, Gaze WH, Pruden A, Smalla K, Tiedje JM, Zhu Y-G. Using the class 1 integron-integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. *The ISME Journal* 2015; 9(6):1269-79.
- Gilliver M, Bennett M, Begon M, Hazel S, Hart C. Antibiotic resistance found in wild rodents. *Nature* 1999;401:233-4.
- Global AMR R&D Hub. *Dynamic dashboard*. Berlin: Global AMR R&D Hub; 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://dashboard.globalamrhub.org/>; ultima consultazione 17/02/21.
- Global AMR R&D Hub. *The state of public and philanthropic investments in AMR R&D*. Berlin: Global AMR R&D Hub; 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://globalamrhub.org/wp-content/uploads/2020/11/GlobalAMRHubReportDD.Nov2020.pdf>; ultima consultazione 17/02/21.
- Global AMR R&D Hub. *Translating AMR R&D mapping into policy and action. Virtual conference –2 December 2020. Conference Report and Recommendations*. Berlin: Global AMR R&D Hub; 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://globalamrhub.org/wp-content/uploads/2021/01/GlobalAMRHub.Dec2020.Conference.report.recommend.pdf>; ultima consultazione 15/02/21.
- Gorokhova E, Rivetti C, Furuhaugen S, Edlund A, Ek K, Breitholtz M. Bacteria-mediated effects of antibiotics on Daphnia nutrition. *Environmental Science & Technology* 2015;49(9):5779-87.
- Gros M, Petrovic M, Barceló D. Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters by using liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching. *Analytical Chemistry* 2009;81:898-912.
- Gros M, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D. Rapid analysis of multiclass antibiotic residues and some of their metabolites in hospital, urban wastewater and river water by ultra-high-performance liquid chromatography coupled to quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2013;1292:173-88.
- Gullberg E, Cao S, Berg OG, Ilbäck C, Sandegren L, Hughes D, *et al.* Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS Pathogens* 2011;7:e1002158.
- Halling-Sørensen B, Nielsen SN, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhøft HC, Jørgensen SE. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment. *Chemosphere* 1998;36:2:357-93.
- Heberer T. Occurrence, fate, and removal of pharmaceuticals residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters* 2002;131,1–2:5-17.

- ISPRA. *Primo monitoraggio delle sostanze dell'elenco di controllo (Watch List)*. Roma: Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, 2017. (Rapporti 260/2017).
- Italia. Decreto legislativo. N.172 del 13 ottobre 2015 Attuazione della Direttiva 2013/39/UE che modifica le Direttive 2000/60/CE per quanto riguarda le sostanze prioritarie nel settore della politica delle acque. GU Serie Generale n.250 del 27-10-2015.
- Jørgensen SE, Halling-Sørensen B. Drugs in the environment. *Chemosphere* 2000;40:691-699.
- Jose J, Sandra Pinto J, Kotian B, Mathew Thomas A, Narayana Charyulu R. Comparison of the regulatory outline of ecopharmacovigilance of pharmaceuticals in Europe, USA, Japan and Australia. *Science of the Total Environment* 2019;709:134815.
- Kaba HEJ, Kuhlmann E, Scheithauer S. Thinking outside the box: Association of antimicrobial resistance with climate warming in Europe - A 30 country observational study. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2020;223(1):151-8.
- Kakkar AK, Shafiq N, Singh G, Ray P, Gautam V, Agarwal R, *et al.* Antimicrobial Stewardship Programs in Resource Constrained Environments: Understanding and Addressing the Need of the Systems. *Frontiers in Public Health* 2020;8:140.
- Kampmeier S, Tönnies H, Correa-Martinez CL, Mellmann A, Schwierzeck V. A nosocomial cluster of vancomycin resistant enterococci among COVID-19 patients in an intensive care unit. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2020;9(1):154.
- Khan S, Beattie TK, Knapp CW. The use of minimum selectable concentrations (MSCs) for determining the selection of antimicrobial resistant bacteria. *Ecotoxicology* 2017;26(2):283-92.
- Kovacs-Nolan J, Mine Y. Egg yolk antibodies for passive immunity. *Annual Review of Food Science and Technology* 2012;3:163-82.
- Lalumera G, Calamari D, Galli P, Castiglioni S, Crosa G. Preliminary investigation on the environmental occurrence and effects of antibiotics used in aquaculture in Italy. *Chemosphere* (2004;54(5):661-8.
- Langford BJ, So M, Raybardhan S, Leung V, Westwood D, MacFadden DR, *et al.* Bacterial co-infection and secondary infection in patients with COVID-19: a living rapid review and meta-analysis. *Clinical Microbiology and Infection* 2020;26(12):P1622-9.
- Leonard AFC, Zhang L, Balfour AJ, Garside R, Hawkey PM, Murray AK, *et al.* Exposure to and colonisation by antibiotic-resistant *E. coli* in UK coastal water users: Environmental surveillance, exposure assessment, and epidemiological study (Beach Bum Survey). *Environment International* 2018;114:326-33.
- Levy S. Reduced antibiotic use in livestock: how Denmark tackled resistance. *Environmental Health Perspectives* 2014;122(6):A160-A165.
- Liao JF, Lee JC, Lin CK, Wei KC, Chen PY, Yang HW. Self-assembly DNA polyplex vaccine inside dissolving microneedles for high-potency intradermal vaccination. *Theranostics* 2017;7:2593-605.
- Lindberg RH, Björklund K, Rendahl P, Johansson MI, Tysklind M, Andersson BAV. Environmental risk assessment of antibiotics in the Swedish environment with emphasis on sewage treatment plants. *Water Research* 2007;41:613-9.
- Loos R, Marinov D, Sanseverino I, Napierska D, Lettieri T. *Review of the 1st Watch List under the Water Framework Directive and recommendations for the 2nd Watch List*. Luxembourg: Publications Office of the European Union; 2018. Disponibile all'indirizzo: [https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC111198/wl\\_report\\_jrc\\_2018\\_04\\_26\\_final\\_online.pdf](https://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC111198/wl_report_jrc_2018_04_26_final_online.pdf); ultima consultazione 19/02/2021.
- Loos R. *JRC Science and Policy Report. Analytical methods for possible WFD 1st watch list substances*. Luxembourg: Publications Office of the European Union, 2015. (Report EUR 27046 EN) Disponibile all'indirizzo: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/df560c01-0af5-4eff-b64e-262f678896b0>; ultima consultazione 19/02/2021.

- Ma L, Li AD, Yin XL, Zhang T. The prevalence of integrons as the carrier of antibiotic resistance genes in natural and man-made environments. *Environmental Science & Technology* 2017;51(10):5721-8.
- Majumder MAA, Rahman S, Cohall D, Bharatha A, Singh K, Haque M, *et al.* Antimicrobial stewardship: fighting antimicrobial resistance and protecting global public health. *Infection and Drug Resistance* 2020;13:4713-38.
- Manaia CM, Rocha J, Scaccia N, Marano R, Radu E, Biancullo F, *et al.* Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: tackling the black box. *Environment International* 2018;115:312-24.
- Marquardt RR, Jin LZ, Kim JW, Fang L, Frohlich AA, Baidoo SK. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 1999;23:283-8.
- Marquardt RR, Li S. Antimicrobial resistance in livestock: advances and alternatives to antibiotics. *Animal Frontiers* 2018;8(2):30-37.
- Martín-Maldonado B, Vega S, Mencía-Gutiérrez A, Lorenzo-Rebenaque L, de Frutos C, González F, *et al.* Urban birds: An important source of antimicrobial resistant *Salmonella* strains in Central Spain. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 2020;72:101519.
- Mentor ABL, Canarie MF, Kilgore PE, Gladzdzin J-D, Fénélon N, Manise P, *et al.* Antibiotics and antimicrobial resistance in the COVID-19 era: Perspective from resource-limited settings. *International Journal of Infectious Diseases* 2021;104:250-4.
- Miarov O, Tal A, Avisar D. A critical evaluation of comparative regulatory strategies for monitoring pharmaceuticals in recycled wastewater. *Journal of Environmental Management* 2020;254:109794.
- Michael I, Rizzo L, McArdell CS, Manaia CM, Merlin C, Schwartz T, *et al.* Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research* 2013;47:957-95.
- Migliore L, Brambilla G, Cozzolino S, Gaudio L, 1995a. Effects of Sulphadimethoxine for agriculture on plants (*Panicum miliaceum*, *Pisum sativum* and *Zea mays*). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 1995;52:103-10.
- Migliore L, Lorenzi C, Civitareale C, Laudi O, Brambilla G. La Flumequina e gli ecosistemi marini: emissione con l'acquacoltura e tossicità su Artemia. In: Ravera O e Anelli A (Ed.) *S.I.T.E./Atti 16*, Parma: Edizioni Zara;1995b. p. 365-68.
- Migliore L, Brambilla G, Casoria P, Civitareale C, Cozzolino S, Gaudio L. Effect of Sulphadimethoxine contamination on barley (*Hordeum distichum* L., Poaceae, Liliopsida). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 1996;60:121-8.
- Migliore L, Civitareale C, Brambilla G, Cozzolino S, Casoria P, Gaudio L. Effect of Sulphadimethoxine on cosmopolitan weeds (*Amaranthus retroflexus* L., *Plantago major* L., *Rumex acetosella* L.). *Agriculture, Ecosystems & Environment* 1997;65(2):163-8.
- Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of Flumequine used in intensive aquaculture on the aquatic weed, *Lythrum salicaria* L. *Chemosphere* 2000;40:741-50.
- Migliore L, Cozzolino S, Fiori M. Phytotoxicity to and uptake of enrofloxacin in crop plants. *Chemosphere* 2003;52(7):1233-44.
- Migliore L, Godeas F, De Filippis SP, Mantovi P, Bonazzi G, Barchi D, Testa C, Rubattu N, Brambilla G. Hormetic effect(s) of tetracyclines as environmental contaminant on *Zea mays*. *Environmental Pollution* 2010;158(1):129-34.
- Migliore L, Rotini A, Thaller MC. Low doses of Tetracycline trigger the *E. coli* growth: a case of hormetic response. *Dose Response* 2013;11(4):550-7.
- Ministero della Salute. *Piano Nazionale di Contrasto dell'Antimicrobico-Resistenza (PNCAR) 2017-2020*. Roma: Ministero della Salute; 2017. Disponibile all'indirizzo:

- [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2660\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2660_allegato.pdf); ultima consultazione 17/02/2021.
- Ministero della Salute. *Relazione contenente i risultati dei controlli ufficiali svolti in attuazione del piano nazionale residui*. Roma: Ministero della Salute; 2019. Disponibile all'indirizzo: [http://www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_pubblicazioni\\_2959\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2959_allegato.pdf); ultima consultazione 17/02/2021.
- Morris DE, Cleary DW, Clarke SC. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:1041.
- Mughini-Gras L, Dorado-García A, van Duijkeren E, van den Bunt G, Dierikx CM, Bonten MJM, *et al.*, Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing  $\beta$ -lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. *The Lancet Planetary Health* 2019;3(8):E357-E369.
- Mulholland RH, Wood R, Stagg HR, Fischbacher C, Villacampa J, Simpson CR, *et al.* Impact of COVID-19 on accident and emergency attendances and emergency and planned hospital admissions in Scotland: an interrupted time-series analysis. *Journal of the Royal Society of Medicine* 2020;113(11):444-53.
- Nappier S, Liguori K, Ichida AM, Stewart JR, Jones KR. Antibiotic Resistance in Recreational Waters: State of the Science. *International Journal Environmental Research Public Health* 2020;17(21):8034.
- Naylor NR, Lines J, Waage J, Wieland B, Knight GM. Quantitatively evaluating the cross-sectoral and One Health impact of interventions: A scoping review and case study of antimicrobial resistance. *One Health* 2020;11:100194
- Naylor NR, Zhu N, Hulscher M, Holmes A, Ahmad R, Robotham JV. Is antimicrobial stewardship cost-effective? A narrative review of the evidence. *Clinical Microbiology and Infection* 2017;23(11):806-11.
- Nieuwlaat R, Mbuagbaw L, Mertz D, Burrows L, Bowdish DME, Moja L, *et al.* COVID-19 and Antimicrobial Resistance: Parallel and Interacting Health Emergencies. *Clinical Infectious Diseases* 2020;16:ciaa773.
- Nori P, Szymczak W, Puius Y, Sharma A, Cowman K, Gialanella P, *et al.* Emerging co-pathogens: New Delhi metallo-beta-lactamase producing *Enterobacteriales* infections in New York City COVID-19 patients. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2020;56(6):106179.
- Norwegian Veterinary Institute. *Use of Antibiotics in Norwegian Aquaculture - on behalf of Norwegian Seafood Council*. Oslo: Norwegian Veterinary Institute; 2016. (Report 22).
- Osservatorio Nazionale sull'impiego dei Medicinali. *L'uso degli antibiotici in Italia. Rapporto Nazionale 2019*. Roma: Agenzia Italiana del Farmaco, 2020. Disponibile all'indirizzo: [https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1283180/Rapporto\\_Antibiotici\\_2019.pdf/0b3d4536-8aa7-e59c-a0a5-add457abe48d](https://www.aifa.gov.it/documents/20142/1283180/Rapporto_Antibiotici_2019.pdf/0b3d4536-8aa7-e59c-a0a5-add457abe48d); ultima consultazione 17/02/2021.
- Österberg J, Wingstrand A, Nygaard Jensen A, Kerouanton A, Cibin V, Barco L, *et al.* Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs in organic and conventional farming in four European countries. *PLoS ONE* 2016;11(6):e0157049.
- Österblad M, Norrdahl K, Korpimäki E, Huovinen P. How wild are wild mammals? *Nature* 2001;409:37-8.
- Pallecchi L, Bartoloni A, Paradisi F, Rossolini GM. Antibiotic resistance in the absence of antimicrobial use: mechanisms and implications. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 2008;6(5):725-32.
- Pan M, Chu LM. Fate of antibiotics in soil and their uptake by edible crops. *Science of the Total Environment* 2017;599-600:500-12.
- Pelfrene E, Botgros R, Cavaleri M. Antimicrobial multidrug resistance in the era of COVID-19: a forgotten plight? *Antimicrobial Resistance & Infection Control* 2021;10:21.

- Porretta AD, Baggiani A, Arzilli G, Casigliani V, Mariotti T, Mariottini F, *et al.* Increased risk of acquisition of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing carbapenem-resistant *Enterobacterales* (NDM-CRE) among a cohort of COVID-19 patients in a teaching hospital in Tuscany, Italy. *Pathogens* 2020;9(8):635.
- Posteraro B, Torelli M, Vella A, Leone PM, De Angelis G, De Carolis E, *et al.* Pan-echinocandin-resistant *Candida glabrata* bloodstream infection complicating COVID-19: a fatal case report. *Journal of Fungi (Basel)* 2020;6(3):163.
- Pruden A, Pei R, Storteboom H, Carlson KH. Antibiotic resistance genes as emerging contaminants: studies in northern Colorado. *Environmental Science & Technology* 2006;40(23):7445-50.
- Rawson TM, Ming D, Ahmad R, Moore LSP, Holmes AH. Antimicrobial use, drug-resistant infections and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 2020b;18:409-10.
- Rawson TM, Moore LSP, Zhu N, Ranganathan N, Skolimowska K, Gilchrist M, *et al.* Bacterial and fungal co-infection in individuals with coronavirus: A rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clinical Infectious Diseases* 2020a;71(9):2459-68.
- ReAct. *Action on Antibiotic Resistance. Shortages and AMR – why should we care? Four consequences of antibiotic shortages.* ReAct group; 2020. Disponibile all'indirizzo: <https://www.reactgroup.org/news-and-views/news-and-opinions/year-2020/shortages-and-amr-why-should-we-care-4-consequences-of-antibiotic-shortages/>; ultima consultazione 17/02/2021.
- Reichmuth AM, Oberli MA, Jeklenec A, Langer R, Blankschtein D. mRNA vaccine delivery using lipid nanoparticles. *Therapeutic Delivery* 2016;7:319-34.
- Reverter M, Sarter S, Caruso D, Avarre J-C, Combe M, Pepey E, *et al.* Aquaculture at the crossroads of global warming and antimicrobial resistance. *Nature Communications* 2020;11(1):1870.
- Riva F, Castiglioni S, Fattore E, Manenti A, Davoli E, Zuccato E. Monitoring emerging contaminants in the drinking water of Milan and assessment of the human risk. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 2018;221(3):451-7.
- Rizzo L, Manaia C, Merlin C, Schwartz T, Dagot C, Ploy MC, Michael I, Fatta-Kassinos D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: a review. *Science Total Environment* 2013;447:345-60.
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere* 2006;65:725-59.
- Sokolski M, Gajewski P, Zymlinski R, Biegus J, Berg JMT, Bor W, *et al.* Impact of coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak on acute admissions at the emergency and cardiology departments across Europe. *The American Journal of Medicine* 2020; in press. <https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.08.043>
- Stebbing ARD. A theory for growth hormesis. *Mutation Research* 1998;403:249-58.
- Stevens MP, Doll M, Pryor R, Godbout E, Cooper K, Bearman G. Impact of COVID-19 on traditional healthcare-associated infection prevention efforts. *Infection Control & Hospital Epidemiology* 2020;41(8):946-7.
- Stockholm County Council. *Environmentally classified pharmaceuticals.* Stockholm: Stockholm County Council; 2012. Disponibile all'indirizzo: [https://noharm.org/sites/default/files/lib/downloads/pharmaceuticals/Envir\\_Classified\\_Pharmaceuticals\\_2012.pdf](https://noharm.org/sites/default/files/lib/downloads/pharmaceuticals/Envir_Classified_Pharmaceuticals_2012.pdf); ultima consultazione 17/03/2021.
- Subirats J, Di Cesare A, Della Giustina SV, Fiorentino A, Eckert EM, Rodriguez-Mozaz S, Borrego CM, Corno G. High-quality treated wastewater causes remarkable changes in natural microbial communities and int11 gene abundance. *Water Research* 2019;167:114895.

- Tang KL, Caffrey NP, Nóbrega DB, Cork SC, Ronksley PE, Barkema HW, *et al.* Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet Health* 2017;1(8):e316-e327.
- Tavazzi S, Mariani G, Comero S, Ricci M, Paracchini B, Skejo H, *et al.* *JRC technical report. Water Framework Directive. Watch list method. Analytical method for the determination of compounds selected for the first Surface water watch list. Validation report, according to ISO 17025 requirements.* European Union; 2016. (EUR 27813 EN).
- Thaller MC, Migliore L, Marquez C, Tapia W, Cedeño V, Rossolini GM, Gentile G. Tracking acquired antibiotic resistance in commensal bacteria of Galápagos land iguanas: no man, no resistance. *PLoS ONE* 2010;5(2): e8989.
- Thiele-Bruhn S. Pharmaceutical antibiotic compounds in soils - a review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* 2003;166:145-67.
- Tiri B, Sensi E, Marsiliani V, Cantarini M, Priante G, Vernelli C, *et al.* Antimicrobial stewardship program, covid-19, and infection control: spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in ICU COVID-19 patients. What did not work? *Journal of Clinical Medicine* 2020;9:2744.
- Tyrrell C, Burgess CM, Brennan FP, Walsh F. Antibiotic resistance in grass and soil. *Biochemical Society Transactions* 2019;47(1):477-86.
- United Nations. *Political Declaration of the High-level Meeting of the General Assembly on Antimicrobial Resistance, A/71/L.2.* 22 September 2016. Disponibile all'indirizzo: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/events/UNGA-meeting-amr-sept2016/en/>; ultima consultazione: 17/03/20219.
- Usman U, Farooq M, Hannac K. Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. *Science of the Total Environment* 2020;745:141053.
- Van Boeckel, Pires J, Silvester R, Zhao C, Song J, Criscuolo NG, Gilbert M, Bonhoeffer S, Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low- and middle-income countries. *Science* 2019;365:6459.
- Wang D, Lin Z, Wang T, Ding X, Liu Y. An analogous wood barrel theory to explain the occurrence of hormesis: A case study of sulfonamides and erythromycin on *Escherichia coli* growth. *PLoS One* 2017;12(7): e0181321.
- WHO. *Antibacterial agents in clinical development.* Geneva: World Health Organization; 2019. Disponibile all'indirizzo: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/330420/9789240000193-eng.pdf?ua=1>; ultima consultazione 28/01/2021.
- WHO. *Antibacterial products in clinical development for priority pathogens.* Geneva: World Health Organization; 2019. Disponibile all'indirizzo: [https://www.who.int/research-observatory/monitoring/processes/antibacterial\\_products/en/](https://www.who.int/research-observatory/monitoring/processes/antibacterial_products/en/); ultima consultazione 28/01/2021.
- Wilton P, Smith R, Coast J, Millar M. Strategies to contain the emergence of antimicrobial resistance: a systematic review of effectiveness and cost effectiveness. *J Health Services Res & Policy* 2002;7(2):111-7.
- Wistrand-Yuen E, Knopp M, Hjort K, Koskiniemi S, Berg OG, Andersson DI. Evolution of high-level resistance during low-level antibiotic exposure. *Nature Communications* 2018;9:1599.
- World Health Organization. *Global Action Plan on Antimicrobial Resistance.* WHO Library Cataloguing in Publication Data, 2015. Disponibile all'indirizzo: <https://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/global-action-plan/en/>; ultima consultazione 16/02/2021.
- Xu L, Zhang H, Xiong P, Zhu O, Liao C, Jiang G. Occurrence, fate, and risk assessment of typical tetracycline antibiotics in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment* 2021;753:141975.

Yokoyama H, Peralta RC, Diaz R, Sando S, Ikemori Y, Kodama Y. Passive protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins against experimental enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in neonatal piglets. *Infection and Immunity* 1992;60:998–1007.

Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, Fanelli R. Presence of therapeutic drugs in the environment. *Lancet* 2000;355(9217):1789-90.

Zuccato E, Castiglioni S, Bagnati S, Melis M, Fanelli R. Source, occurrence and fate of antibiotics in the Italian aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 2010;179:1042-1048.

*Serie Rapporti ISTISAN  
numero di marzo 2021*

*Stampato in proprio  
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

*Roma, marzo 2021*