



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di Laurea magistrale in Biotecnologie per
l'Alimentazione

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

**Studio della Distribuzione di Determinanti Genetici di
Resistenza Antibiotica in Isolati di *Escherichia coli* da
Molluschi Bivalvi del Veneto**

Relatore:

Prof. Leonardo Alberghini

Correlatore:

Dott. ssa Carmen Losasso

Dott. ssa Lisa Barco

Laureanda:

Elena Boschi

Matricola: n.:

1091541

ANNO ACCADEMICO 2016/2017

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1 Consumo dei Molluschi Bivalvi: i Rischi.....	1
1.1.1 Pericoli Biologici.....	1
1.1.2 Pericoli Chimici.....	3
1.2 Molluschi Bivalvi: Cenni Anatomici e Biologici.....	3
1.3 Prodotto Ittico Fresco: la Molluschicoltura in Veneto.....	4
1.3.1 Tecniche di Allevamento e Produzione.....	6
1.3.2 Centri di Depurazione.....	7
1.4 Cenni Legislativi.....	8
1.4.1 Natura dei Campioni Analizzati.....	9
1.5 Escherichia coli: Generalità ed Utilizzo come Bioindicatore.....	10
1.6 Il Fenomeno dell'Antibiotico-Resistenza.....	11
1.7 Microbial Source Tracking (MST).....	15
2. SCOPO DEL LAVORO.....	19
3. MATERIALI E METODI.....	20
3.1 Campioni.....	20
3.2 MPN-Most Probable Number.....	20
3.3 Isolamento dei Ceppi.....	22
3.4 MIC- Minima Concentrazione Inibente.....	22
3.5 Estrazione del DNA.....	25
3.6 PCR- Polymerase Chain Reaction.....	25
3.6.1 Corsa e Colorazioni.....	26
3.6.2 PCR per la ricerca di geni di Antibiotico Resistenza.....	27

3.7 Sequenziamento.....	35
3.8 PCR end-point per il Source Tracking.....	36
3.9 Georeferenziazione.....	38
4. RISULTATI.....	39
4.1 Isolamento dei Ceppi.....	39
4.2 Profili di Antibiotico-resistenza.....	43
4.2.1 Analisi Fenotipica dell' Antibiotico-resistenza.....	43
4.1.2 Analisi Genotipica dell' Antibiotico-resistenza.....	46
4.3 Source Tracking.....	57
5. DISCUSSIONE.....	59
6. CONCLUSIONI.....	66
7. BIBLIOGRAFIA.....	68

RIASSUNTO

È noto che gli ambienti acquatici sono potenzialmente a rischio di inquinamento microbiologico provocato dalle acque reflue che immettono nell'ambiente batteri fecali ed antibiotico-resistenti. In particolare la resistenza alle sostanze antimicrobiche è un problema di sanità pubblica, dal momento che la diffusione di ceppi multi resistenti e/o dei relativi determinanti genetici è prodromo della riduzione dell'efficacia delle terapie farmacologiche.

Partendo da queste considerazioni il presente lavoro ha avuto lo scopo di studiare la diffusione delle antibiotico-resistenze negli ambiti di pesca della Regione del Veneto, riferimento utilizzando *E.coli*, isolati da campioni di molluschi bivalvi derivanti dai piani di monitoraggio regionali e dai campionamenti ufficiali, quali indicatori.

Sono stati analizzati 196 campioni prelevati da Marzo a Giugno 2016. I campioni risultati positivi per la presenza di *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi (126) sono stati inclusi per le analisi successive. Un isolato di *Escherichia coli* per campione positivo è stato sottoposto a caratterizzazione per la presenza di antibiotico resistenze attraverso analisi fenotipiche (determinazione della minima concentrazione inibente) e genotipica (identificazione dei relativi geni per la resistenza agli antibiotici testati).

Infine gli isolati sono stati sottoposti ad indagine di *source tracking* con l'obiettivo di identificare le possibili fonti di contaminazione.

Un numero pari a 6 dei 196 (3%) campioni prelevati sono risultati non conformi per il superamento dei limiti relativi alla presenza di *E. coli* su 100 g di prodotto. In generale, dunque, il livello di contaminazione da *E. coli*, quale potenziale indicatore di contaminazione fecale è risultato piuttosto contenuto. I dati raccolti, inoltre, hanno permesso di verificare che i livelli di resistenza tra i ceppi di *E. coli* isolati dai campioni analizzati erano piuttosto contenuti dal momento che una quota pari al 57,9% dei ceppi considerati è risultato suscettibile con il 20,6% resistente ad un solo antibiotico. Tuttavia è importante sottolineare la presenza, negli isolati testati, di gruppi di geni coinvolti nelle resistenze agli antibiotici clinicamente rilevanti.

Sia nel caso degli indicatori di contaminazione fecale che della diffusione delle antibiotico resistenze negli ambiti di pesca considerati i risultati mostrano maggiore concentrazione negli ambiti lagunari. Infine i risultati derivanti dagli esperimenti di *source tracking* hanno permesso di identificare gli isolati di *E. coli* di origine avicola e di collocarli nei soli ambiti di pesca a pertinenza lagunare. Detti isolati sono risultati tutti resistenti ad uno o più antibiotici

suggerendo la possibilità per gli allevamenti avicoli che insistono nei territori confinanti di essere configurati quali “*hot-spot*” di contaminazione fecale nonché prodromi della diffusione di determinanti di antibiotico resistenza nell’ambiente.

In generale i risultati ottenuti dal presente studio permettono di concludere che il monitoraggio di batteri indicatori quale *E. coli*, può essere un valido strumento per approfondire l’esposizione delle comunità microbiche lagunari e marittime a pressioni selettive che selezionano positivamente batteri antibiotico resistenti ed i relativi determinanti genetici, fornendo dati utili per effettuare puntuali valutazioni del rischio di trasferimento di batteri antibiotico resistenti dall’ambiente all’uomo.

ABSTRACT

It is well known that aquatic environments are potentially at risk for microbial contamination due to the spreading of antibiotic-resistant bacteria of faecal origin *via* wastewater. Antibiotic-resistance is a public health problem since the spread of multi-resistant strains and/or their genetic determinants are considered prodromic of the reduction in effectiveness of drug based therapies. Based on the above mentioned considerations the aim of this work is to study the spreading of antibiotic-resistance among the Veneto Region areas designated to fishing, by using *E. coli* isolated from shellfish as indicator of faecal contamination.

A number of 196 samples arising from the regional monitoring plan and from the official sampling made by competent authority between March and June 2016 were analysed. Positive samples for the presence of *E.coli* β glucuronidase-positive (126) were used for subsequent analyses. Each strain isolated from each sample was characterised for antibiotic-resistance on the basis of their phenotype (determining the minimum inhibitory concentration) and genotype (identification of specific antibiotic-resistance genes). Finally, with the aim of identifying possible sources of contamination a source tracking analysis was performed.

A number of 6 out of the 196 samples (3%) resulted non-compliant, thus overcoming the fixed limits on the presence of *E. coli* in 100 g of final product. However results showed the presence of low level of contamination by *E. coli* as well as of antibiotic resistance among the *E. coli* isolated in the investigated areas. A percentage of 57.9% of strains were found pansusceptible and 20.6% were resistant to only one antibiotic. However it is important to emphasize the presence of genes involved in the resistance to clinically relevant antibiotics in the tested isolates. Moreover the highest concentration of *E. coli* was found in the lagoon areas. Finally the source tracking analysis enabled us to identify the *E. coli* isolates belonging to chicken and to place them in the lagoon fishing areas. These isolates were resistant to one or more antibiotics, suggesting a scenario where poultry farms located in the neighbouring territories could act as hot-spots of faecal pollution and spread of antibiotic-resistance in the environment.

The results of the present work support the conclusion that monitoring data on indicator bacteria, such as *E. coli*, could be a valuable tool to deep insight into the exposure of microbial communities residing into aquatic environments to selective pressures that fix in the environment antibiotic-resistant bacteria and the relative genetic determinants. In addition the collection of such data could be used to assess the risk of spread of antibiotic-resistant

bacteria from environment to humans.

1. INTRODUZIONE

1.1 Consumo dei Molluschi Bivalvi: i Rischi

I prodotti ittici e in particolare i molluschi bivalvi rappresentano una tipicità delle zone costiere della Regione del Veneto e il loro consumo è in aumento grazie all'apporto nutrizionale che li rende fortemente consigliati nell'ambito di diete bilanciate in ragione del loro basso contenuto calorico e della presenza di proteine facilmente digeribili (Losasso et al., 2015).

D'altra parte i prodotti ittici, in particolare i molluschi possono rappresentare un pericolo per la sicurezza alimentare e, dunque essere rischiosi per la salute dei consumatori. Tra i prodotti maggiormente a rischio vi sono i molluschi bivalvi che, essendo organismi filtratori, possono accumulare microrganismi patogeni e molecole di diversa natura derivanti dall'ambiente di allevamento.

1.1.1 Pericoli Biologici

I pericoli biologici associati al consumo di molluschi bivalvi consistono nella presenza di batteri patogeni e virus.

I batteri patogeni possono essere sia di origine fecale, come ad esempio *Salmonella*, sia risiedere nelle acque, come nel caso dei batteri appartenenti al genere *Vibrio*.

Per quanto concerne le infezioni batteriche, le principali sono provocate da:

- *Salmonella* spp.: batterio patogeno, Gram-negativo, a forma di bastoncino, mobile, anaerobio facoltativo, asporigeno, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*; con temperatura ottimale di crescita compresa tra i 37°C ed i 43°C ad un pH tra 7-7,5. *Salmonella* può essere presente nel tratto gastro-intestinale dei mammiferi dove provoca una gastroenterite, ma può venir ritrovata anche nelle acque, in particolare in quelle inquinate, dove la contaminazione è di origine fecale. Generalmente non persiste a lungo negli ambienti marini, poiché non tollera gli ambienti salini (Jay et al., 2005).
- *Vibrio*: batteri Gram-negativi, a forma di bastoncino ricurvo, aerobio/anaerobio facoltativo, con un unico flagello polare che ne assicura la mobilità, alofilo, privo di capsula; appartengono alla famiglia delle *Vibrionaceae*; sono microrganismi che

crescono a temperature ottimali di 19°-20°C con concentrazioni di NaCl del 2-4%; la crescita, però, può essere riscontrata anche a temperature attorno ai 10°C, nel caso in cui la concentrazione di NaCl sia del 3-7% e con un pH compreso tra 7,2-7,6; sono microrganismi propri dell'ambiente marino, causano gastroenteriti solitamente per l'ingestione di alimenti consumati crudi, soprattutto ostriche e vongole. Hanno destato interesse nelle autorità competenti solo negli ultimi tempi a causa di un aumento delle infezioni e per la presenza di molti ceppi multi-resistenti. Le specie più comunemente isolate dai molluschi, responsabili di malattia nell'uomo nei paesi industrializzati sono: *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus*. Sebbene il *Vibrio parahaemolyticus* sia causa di gastroenteriti, non tutti i ceppi isolati sono patogeni in quanto la patogenicità è determinata dalla presenza di geni specifici quali, ad esempio *tdh* e *trh*, responsabili della produzione di emolisine. *Vibrio vulnificus* invece può causare infezioni delle ferite se vengono a contatto con acqua di mare contaminata o con superfici contaminate; è in grado di causare una forma setticemica entrando attraverso il tratto gastro-intestinale, questa forma, però è più comune per soggetti immunodepressi. La crescente preoccupazione verso questi patogeni è da attribuire al progressivo riscaldamento delle acque marine, che determina ambienti più favorevoli alla loro sopravvivenza, e l'aumento del consumo di molluschi e prodotti ittici provenienti da aree geografiche dove tali microrganismi sono presenti in modo endemico (Baker-Austin et al., 2010; Jay et al., 2005).

Per quanto concerne i virus, invece, possono anch'essi essere di origine fecale. Essi sono in grado di persistere nell'ambiente per un periodo di tempo molto più lungo rispetto ai batteri. I virus, a differenza dei batteri, non sono in grado di replicarsi all'interno dell'animale, ma solo di accumularsi all'interno dello stesso. Inoltre, i virus non vanno a modificare l'aspetto e il gusto o l'odore degli alimenti che ne sono contaminati. Perché si scateni la malattia bastano poche particelle virali (Olalemi et al., 2016; Strubbia et al., 2016; Namsai et al., 2011).

I virus più comuni isolati nei molluschi sono:

- Virus dell'epatite A (HAV): è un virus a RNA appartenente alla famiglia dei Picornaviridae; causa una malattia che colpisce il fegato con comparsa di vomito, nausea, diarrea ed ittero; è un'infezione trasmessa per via oro-fecale ed è causata dal consumo di acqua o alimenti contaminati e non adeguatamente cotti; i molluschi bivalvi sono una fonte comune di infezione.
- Norovirus: è un virus a singolo filamento di RNA appartenente alla famiglia delle Caliciviridae, altamente infettivo, infatti per scatenare la patologia bastano una decina

di particelle virali; può persistere nell'ambiente per diverso tempo ed è presente spesso in ambiente marino; provoca una gastroenterite, la trasmissione avviene attraverso il consumo di alimenti infetti, ma anche via aerosol da persona a persona.

Dal momento che non è possibile ipotizzare un monitoraggio che tenga conto di tutti questi agenti, la legislazione attualmente in vigore prevede il monitoraggio della presenza di batteri indicatori di contaminazione fecale (nei paesi dell'unione europea l'*Escherichia coli*), al fine di ottenere una valutazione del rischio di contaminazione dei molluschi da parte di batteri e virus patogeni.

1.1.2 Pericoli Chimici

Tra i contaminanti più comuni legati ai molluschi ed ai prodotti ittici che possono essere trovati sono i metalli pesanti e le biotossine algali.

- **Metalli pesanti:** si tratta di metalli che possono essere presenti nell'ambiente marino e che possono dare effetti tossici se presenti a certe concentrazioni nell'alimento, per cui la legislazione alimentare ha definito dei limiti di concentrazione nel prodotto; in ambiente marino i metalli pesanti maggiormente ricercati legati ai prodotti ittici sono: cadmio (Cd), piombo (Pb) e mercurio (Hg).
- **Biotossine algali:** sono tossine prodotte da alghe che provocano tossinfezioni acute e croniche a carico del sistema digerente, con presenza di diarrea e vomito, mentre alcune possono andare ad intaccare il sistema nervoso, bloccando la trasmissione degli impulsi nervosi ai muscoli scheletrici e ai nervi periferici; il rischio maggiore è rappresentato dal consumo di molluschi bivalvi, in particolare cozze.

1.2 Molluschi Bivalvi: Cenni Anatomici e Biologici

I molluschi bivalvi sono organismi filtratori, costituiti da un guscio esterno formato da due valve, unite tramite una cerniera mobile ed un legamento, che racchiudono al loro interno l'animale. La conchiglia è costituita da più strati di conchiolina e carbonato di calcio, a cui l'animale si tiene ancorato per mezzo dei legamenti. Sulla superficie sono presenti delle linee trasversali e/o radiali di accrescimento, alcune specie hanno anche strutture accessorie, quali le spine. Quando i muscoli adduttori sono rilassati si ha l'apertura delle due valve, spesso speculari l'una all'altra. I muscoli adduttori, a seconda della specie considerata, possono avere dimensioni uguali, come nel caso delle vongole, o diverse, come nel caso dei mitili. Le due

metà sono tenute assieme da un legamento molto flessibile, presente nella zona dorsale della conchiglia, e permette all'animale di mantenere le valve socchiuse. La cerniera è posizionata all'interno della conchiglia nella zona dorsale, ed è costituita da dentelli che hanno funzione di permettere la corretta chiusura delle valve (Wilson, 1976).

All'interno della conchiglia l'animale è ricoperto da un mantello, diviso in due lobi, il quale racchiude gli organi vitali. Tra il mantello e gli organi ha sede, inoltre, la cavità palleale dove avviene la gametogenesi e dove sono presenti le branchie dette ctenidi.

Solitamente questi animali si affossano, come nel caso delle vongole, o usano il piede per rimanere attaccati al substrato, come nel caso dei mitili che rimangono ancorati grazie ai filamenti di bisso, prodotti dal piede (Cattaneo e Bernardi, 2010).

In caso di attacchi, o di ambiente poco favorevole questi molluschi utilizzano i sifoni per la fuga con movimenti di propulsione.

In entrambe le specie vi sono un sifone inalante ed uno esalante, il primo serve per introdurre l'acqua da cui traggono nutrimento per filtrazione attraverso le branchie, queste servono anche per gli scambi gassosi; il secondo ha funzione escretoria.

Per quanto riguarda la riproduzione, c'è la divisione in sessi e la fecondazione è esterna. Quando si ha la formazione dello zigote, questo matura a larva veliger, nella sua ultima fase sviluppa una sottile conchiglia trasparente, prima di maturare ed arrivare alla fase adulta.

1.3 Prodotto Ittico Fresco: la Molluschicoltura in Veneto

Le pratiche di acquacoltura sono differenti: la piscicoltura, riguarda i pesci ed in particolare tratta l'allevamento di trote; la crostaceicoltura, ovvero l'allevamento di crostacei; infine, la molluschicoltura, che tratta l'allevamento di molluschi bivalvi perlopiù mitili e vongole, più di rado ostriche o altri molluschi.

Quest'ultima è la più importante e legata al territorio veneto e negli ultimi anni si è assistito in tale ambito a grandi passi in avanti per quanto riguarda la coltura e le tecnologie utilizzate. La molluschicoltura in Veneto, in particolare la mitilicoltura, è una pratica ed una professione, molto antica e radicata nel territorio.

Le specie che hanno la maggior importanza commerciale sono il *Mytilus galloprovincialis* (la cozza mediterranea), *Venerupis philippinarum* (vongola filippina) e *Tapes decussatus* (vongola nostrana). Nel caso dei mitili, gli allevamenti sono localizzati lungo tutta la costa, mentre l'allevamento delle vongole è confinato solo in alcune zone.

Essendo i molluschi bivalvi degli organismi filtratori, in caso di acque contaminate, sia per

presenza di sostanze chimiche che per la presenza di batteri patogeni, si possono verificare fenomeni di bioaccumulo con conseguente aumento del rischio chimico o biologico (Turolla, 2008).

In tale ambito la normativa comunitaria ed europea ha fissato chiari limiti per classificare le aree di pesca ed allevamento dei molluschi al fine di garantire non soltanto una maggior igiene e sicurezza del prodotto offerto al consumatore, ma anche una migliore qualità del prodotto (Veneto Agricoltura, 2014).

Secondo quanto definito dall'allegato II del Regolamento (CE) 854/2004 l'Autorità Competente ha il compito di classificare le zone di produzione in cui autorizza la raccolta dei molluschi bivalvi in base all'appartenenza ad una delle categorie, aree A,B e C, in funzione del livello di contaminazione fecale. Nel primo caso, area di classe A, la pesca avviene in zone di mare aperto dove sono stazionati gli allevamenti e dove la qualità dell'acqua è alta. In questo caso i molluschi pescati vengono selezionati in base alla grandezza (se troppo piccoli vengono rimessi in acqua ad accrescersi), quindi confezionati e venduti, pertanto sono destinati al consumo umano diretto.

Nel secondo caso, aree di classe B, invece, i molluschi pescati, dopo una breve cernita fatta secondo la grandezza degli esemplari, vengono portati ai centri di depurazione, onde eliminare sostanze o elementi indesiderati che sono stati ingeriti durante l'ingrossamento. Nelle aree B l'acqua ha una qualità minore, per questo non è possibile la vendita diretta, ma è necessario un ulteriore trattamento del prodotto. Infine, le aree in classe C sono relative alle zone da cui i molluschi bivalvi vivi possono essere raccolti, ma possono essere immessi sul mercato soltanto previa stabulazione di lunga durata. In Tabella 1.1 sono mostrati i limiti di contaminazione fecale (livelli di contaminazione da *E. coli*) per determinare la classificazione dell'area di pesca dei molluschi bivalvi vivi.

AREA	<i>E. coli</i> MPN/100g	Trattamento richiesto dopo la raccolta	Normativa di riferimento
A	$\leq 230/100$ g e $230 \leq x \leq 700/100g^*$ di polpa e liquido intervalvare	Nessuno	Reg. CE 854/2004 - Reg. CE 853/2004 - Reg. 2073/2005 - Reg. 2285/2015*
B	$\leq 4600/100$ g di polpa e liquido intervalvare	Depurazione, stabulazione o trasformazione con metodi riconosciuti	Reg. CE 854/2004
C	$\leq 46000/100$ g di polpa e liquido intervalvare	Stabulazione o trasformazione con metodi riconosciuti	Reg. CE 854/2004

Tabella 1.1: limiti microbiologici per la classificazione delle aree di pesca

1.3.1 Tecniche di Allevamento e Produzione

Il ciclo produttivo inizia col reperimento del seme. Il seme può essere prodotto artificialmente in uno schiuditoio o, al contrario, raccolto in mare aperto dai banchi naturali. Fino a pochi anni fa la seconda opzione era quella più utilizzata, ora, in Veneto, le aziende producono anche il seme che viene utilizzato in allevamento. Per la riproduzione artificiale i riproduttori vengono spinti a produrre gameti attraverso diversi cicli termici e salini a cui vengono sottoposti. Infine le uova vengono fecondate e messe ad incubare in apposite vasche.

Dopo la schiusa le larve vengono spostate in vasche esterne nelle quali poi si svilupperà il mollusco vero e proprio che verrà poi messo a “ingrassare” in una delle zone di allevamento.

Per l'allevamento di cozze e vongole sono ancora utilizzati i metodi tradizionali, che sono però in via di rinnovamento. Vi sono due metodologie principali:

- Sistema a pali fissi: è un tipo di allevamento tipico delle zone lagunari e di concessioni (ovvero le zone di mare adibite all'allevamento dei molluschi) di modesta ampiezza. Sono caratterizzati dalla presenza di pali da 10-35 cm di diametro, infissi ad una profondità di 2 m nel fondale, emergenti di 1,5 m dal pelo dell'acqua, costituiti da legno di castagno, metallo o cemento ai quali sono appese reti tubolari contenenti i mitili dette reste.

Il sistema a pali fissi si divide a sua volta in due categorie: il modulo filare, adatto per fondali bassi, è costituito da due file parallele di pali distanti l'uno dall'altro 3-5 m; e il

modulo a riquadro, adatto a profondità maggiori, in cui, oltre ai pali verticali sono presenti due pali diagonali con la funzione di rafforzare l'impianto e aumentare la superficie d'attacco delle reste.¹

- Sistema a filari galleggianti (long-line): sono presenti in mare aperto con profondità di 10-30 m in concessioni che arrivano fino a 10 ettari, delimitate da boe con segnale luminoso. L'impianto è fissato al fondale grazie alla presenza di blocchi di cemento, o metallo, detti "corpi morti".

Un'ultima metodologia di allevamento dei mitili, di derivazione norvegese, che si sta testando, è quella delle *SmartUnits* che si basa su un impianto reticolare di corde appeso a dei grossi tubi di propilene per il sostenimento della biomassa, l'ormeggio è composto da una boa "jumper" finalizzata a tenere in tensione la catena legata al "corpo morto". Le *SmartUnits* oltre che a produrre mitili pronti per il commercio sono utili anche per la produzione del seme e per le alghe marine (Veneto Agricoltura, 2014).

Per quanto riguarda le vongole veraci, invece, l'allevamento avviene esclusivamente sul fondale che deve avere una buona ossigenazione e circolazione idrica per cui non devono essere presenti troppe alghe che rischiano mandare in anossia i molluschi, per la scarsa ossigenazione, o non permettere un adeguato nutrimento degli animali, per la scarsa circolazione dell'acqua compromettendo il raccolto. In questo caso, per l'ingrasso, gli esemplari vengono rilasciati manualmente nelle zone a loro destinate (Turolla, 2008).

1.3.2 Centri di Depurazione

Gli stabilimenti in cui avviene la depurazione sono detti Centri di Depurazione Molluschi (CDM). Nel caso dei mitili la fase di depurazione può avvenire in due modi: attraverso l'uso di un forte getto d'acqua contenente sostanze disinfettanti, o tramite la stabulazione, che solitamente avviene in zone di mare aperto. Nel caso delle vongole, invece queste vengono poste in ceste e successivamente immerse in vasche orizzontali dove i molluschi rimangono a contatto con l'acqua per circa una notte. L'acqua dovrebbe rimanere a 15°C (la temperatura ideale per l'attività metabolica del mollusco).

In entrambi i casi gli esemplari vengono lavati, per eliminare pseudofeci ed altri residui che potrebbero essere presenti sulla conchiglia, selezionati, quindi possono essere confezionati e venduti.

1 *N.B.1:Il Regolamento CE 2285/2015: modifica del 2017 per le aree di classe A 1/5 campioni: $230 \leq x \leq 700$ MPN/100g nessun campione $x > 700$ MPN/100g , tutti gli altri risultati ≤ 230 MPN/100 g.

Nei centri, o nelle zone di mare aperto in cui viene fatta la depurazione, è previsto un controllo sistematico dello stato igienico sanitario secondo un piano di sorveglianza periodico (Veneto Agricoltura, 2014; Turolla, 2008), per verificare che vengano mantenute le caratteristiche delle acque.

1.4 Cenni Legislativi

Al fine di garantire la salute del consumatore e di verificare l' idoneità delle acque in cui viene effettuata l'attività della molluschicoltura, l'UE ha adottato dei regolamenti per poter valutare la qualità del prodotto della pesca, in base a quanto prescritto, e accertare che i livelli riscontrati siano all'interno dei limiti stabiliti dalla legislazione vigente.

Tra i più importanti documenti che sono stati redatti a questo scopo vi è il "Pacchetto Igiene" che include i principali regolamenti nell'ambito della legislazione alimentare, andando a regolamentare non solo i campionamenti e le pratiche per quanto riguarda la coltura e l'allevamento, ma anche i limiti chimici e microbiologici, in base alla matrice alimentare presa in considerazione.

Per il campionamento e l'analisi dei molluschi bivalvi vivi nel "Pacchetto Igiene" bisogna far riferimento principalmente a 4 documenti:

- Reg. (CE) n° 852/2005, sull'igiene degli alimenti
- Reg. (CE) n° 853/2005, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale (OA)
- Reg. (CE) n° 854/2004, che stabilisce le norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano
- Reg. (CE) n° 2073/2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

In particolare, il Reg. (CE) n° 852/05 prescrive le norme generali di igiene che l'Operatore del Settore Alimentare (OSA) deve applicare per garantire la sicurezza degli alimenti, di cui è fatto diretto responsabile. Il regolamento definisce anche i criteri d'applicazione dei principi HACCP, che nel caso presente devono essere applicati durante le fasi di depurazione del prodotto, ma non durante la raccolta dello stesso (Cattaneo e Bernardi, 2010).

La sezione VII del Reg. (CE) n°853/05, prescrive i requisiti igienici e di stabulazione dei molluschi bivalvi vivi.

L'allegato II del Reg. (CE) n°854/04, dà le disposizioni per la classificazione delle zone di pesca e di stabulazione, e come deve essere effettuato il monitoraggio di tali zone da parte

dell'Autorità Competente; oltre che agli accorgimenti da attuare in seguito ai risultati delle analisi. I risultati ottenuti dalle analisi sono presi come punto d'inizio per istituire degli efficaci programmi di campionamento e monitoraggio.

Nell'allegato II del Reg. (CE) n° 2073/05, vengono riportati i limiti microbiologici, in termini di sicurezza alimentare per definire l'idoneità al consumo dei molluschi bivalvi, considerando che i prodotti sono immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità. Tali criteri riguardano l'assenza di *Salmonella* spp. in 25 g di prodotto, ed un massimo di 230 MPN/100g per *Escherichia coli*. Il Reg. (CE) n° 2285/2015 ha modificato, a partire dal 1 gennaio 2017, tale criterio di sicurezza alimentare per quanto concerne la quantificazione di *E. coli* in molluschi bivalvi immessi sul mercato per il consumo diretto. Il nuovo criterio di sicurezza alimentare prevede per molluschi immessi sul mercato, l'analisi di 5 unità campionarie per ciascun campione e di queste 5 unità campionarie nessuna deve avere un livello di contaminazione da *E. coli* superiore a 700 MPN/100g, 1 unità campionaria può avere un livello di contaminazione da *E. coli* compreso tra 230 MPN/100g e 700 MPN/100g e le rimanenti unità campionarie devono avere livelli di contaminazione da *E. coli* inferiore a 230 MPN/100g.

In aggiunta, come riportato in precedenza gli *E. coli*, quali indicatori di contaminazione fecale, vengono comunemente utilizzati nell'ambito del monitoraggio periodico per la classificazione delle aree di pesca/allevamento (Sestili et al., 2009).

Secondo le normative sopra descritte la responsabilità della qualità del prodotto e dei controlli è dell'OSA stesso il quale deve garantire l'idoneità del prodotto in base ai limiti previsti e, se reso necessario, effettuare i trattamenti per rendere idoneo il prodotto (depurazione, stabulazione, trattamento con calore). I trattamenti da effettuare sono modulati in base alla classificazione dell'area di pesca. Spetta comunque all'Autorità Competente effettuare la classificazione delle aree di produzione, come pure di verificare la conformità dei prodotti posti sul mercato.

Contrariamente all'approccio sopra descritto, adottato in Europa, negli Stati Uniti la conformità delle acque destinate alla pesca dei molluschi viene definita sulla base della concentrazione dei coliformi totali e degli *Escherichia coli* nei campioni di acqua (Lee e Reese, 2014).

1.4.1 Natura dei Campioni Analizzati

I campioni di molluschi oggetto d'indagine pervenuti in laboratorio potevano essere di due

tipologie: campioni prelevati alla distribuzione oppure pronti per essere commercializzati che facevano parte del Piano Regionale Integrato dei Controlli degli alimenti (PRIC). In aggiunta nell'ambito dello studio sono stati considerati campioni di molluschi prelevati nell'ambito dell'attività di monitoraggio delle aree di pesca e di allevamento (classificazione/monitoraggio degli ambiti).

Il piano regionale PRIC è mirato a verificare il rispetto dei criteri microbiologici e chimici in base alle normative comunitarie; del profilo microbiologico e chimico dell'alimento presente sul mercato; infine, di valutare l'efficacia dei piani di autocontrollo messi in atto dagli operatori del settore alimentare (OSA).

Le autorità competenti che effettuano il campionamento per il controllo ufficiale in questo contesto devono attenersi alle procedure previste dalla Legge n° 283/1962. I campioni devono quindi essere costituiti da 4-5 aliquote, ciascuna formata da 5 unità campionarie secondo quanto previsto dal Reg. (CE) n° 2073/2005. I campioni sono prelevati, per l'80% da stabilimenti di produzione o magazzini di vendita all'ingrosso, avendo cura di prelevare i prodotti pronti alla vendita, o comunque il più vicino possibile alla loro messa in commercio; mentre il 20% viene prelevato nei punti di vendita al dettaglio.

I punti di prelievo nel primo caso sono ripartiti tra le diverse ULSS presenti nel territorio regionale, tenendo in considerazione gli stabilimenti di produzione presenti sul territorio; nel caso del prelievo effettuato al dettaglio invece la ripartizione tiene conto anche la popolazione residente.

Per quanto riguarda i campioni prelevati nell'ambito del monitoraggio degli ambiti di pesca, questi vengono effettuati secondo un piano di monitoraggio annuale in rispetto delle disposizioni dettate dalle normative comunitarie, in particolare in base al Reg. (CE) n° 854/04 che descrive l'OSA come responsabile di tale attività, il quale deve collaborare con l'Autorità Competente per stabilire il piano di campionamento. Il campione viene effettuato in ogni ambito 1 volta al mese e viene prelevato nel punto in cui la concentrazione di *Escherichia coli* è più alta.

I campioni di molluschi prelevati in questi contesto devono venire analizzati entro le 24 ore dal prelievo per la quantificazione di *Escherichia coli* e devono essere rappresentativi della stazione di monitoraggio da cui vengono prelevati.

1.5 *Escherichia coli*: Generalità ed Utilizzo come Bioindicatore

Il genere *Escherichia* identifica un gruppo di batteri appartenente alla famiglia delle

Enterobacteriaceae. I batteri che ne fanno parte sono di forma bastoncellare, Gram-negativi, asporigeni, aerobi/anaerobi facoltativi, generalmente immobili, ma mobili se possiedono flagelli peritrichi, catalasi positivi e ossidasi negativi. La specie più comune e conosciuta del genere è *Escherichia coli*. Sono microrganismi ubiquitari residenti principalmente nel tratto gastrointestinale dei mammiferi di cui sono solitamente commensali.

L'*Escherichia coli* è uno degli indicatori di contaminazione fecale considerato sia negli alimenti che nell'ambiente. In particolare come descritto nell'allegato I del Reg. (CE) n° 2073/05, l'analisi attraverso la metodica MPN eseguita sull'animale stesso e il liquido intravalvare è condotta per stimare il livello di contaminazione fecale nei molluschi bivalvi. La misurazione dei livelli di contaminazione da *Escherichia coli* è utile per ottenere indicazioni sulla potenziale presenza di patogeni enterici umani (Strubbia et al., 2016). Sebbene non sia un microrganismo patogeno nell'ambito del suddetto regolamento l'identificazione oltre i limiti stabiliti viene considerata come superamento di un criterio di sicurezza alimentare, perchè appunto è indicatore della potenziale presenza di altri agenti patogeni (di origine batterica o virale) che possono rappresentare un rischio per il consumatore.

1.6 Il Fenomeno dell'Antibiotico-Resistenza

La scoperta degli antibiotici per trattare le infezioni batteriche è una delle scoperte scientifiche che hanno rivoluzionato il mondo della medicina. Tuttavia ben presto è emersa la consapevolezza dello sviluppo di forme di resistenza verso gli antibiotici da parte dei batteri e in particolar modo da parte di quelli patogeni (Davies e Davies, 2010) Gli antibiotici sono normalmente utilizzati negli allevamenti, compresa l'acquacoltura, a scopo profilattico e terapeutico (O'Neill, 2015; WHO, 1999). Nei paesi sviluppati si stima che il solo allevamento contribuisca per il 50-80% degli antibiotici consumati; l'agricoltura, gli animali d'affezione e l'acquacoltura per il 5%; e il trattamento delle infezioni umane per la restante parte (Cully, 2014). L'impiego di antibiotici in medicina umana e veterinaria determina un'importantissima pressione selettiva dal momento che circa il 30-90% degli antibiotici impiegati non sono metabolizzati e pertanto vengono rilasciati in forma inalterata (Sarmah et al., 2006; Alonso et al., 2001).

Sebbene gli antibiotici possano essere considerati in modo semplicistico dei contaminanti chimici ambientali, gli elementi genetici mobili che ne conferiscono resistenza possono essere trasferiti orizzontalmente anche tra batteri filogeneticamente lontani (Marinho et al., 2016).

La presenza di residui di antibiotici in ambiente acquatico può modificare gli equilibri ecologici delle comunità microbiche residenti e provocare una pressione selettiva a favore di batteri resistenti, che diventano prevalenti e possono diffondersi anche in altre nicchie ecologiche. La diffusione dell'antibiotico-resistenza nell'ambiente avviene non solo attraverso la contaminazione di fonti naturali, ma anche attraverso la catena alimentare, come pure attraverso il contatto tra uomo e animale.

L'antibiotico-resistenza può essere naturale, intrinseca del microrganismo, od acquisita, quest'ultima generalmente è provocata dall'esposizione all'antimicrobico. Il fenomeno può derivare da mutazioni cromosomiche a carico di geni chiave per la sensibilità al farmaco; oppure dalla presenza di plasmidi ed altri elementi trasponibili, quali gli integroni, recanti geni di resistenza in grado di essere trasferiti tra batteri (Van Hoek et al., 2011) attraverso il trasferimento orizzontale..

Un meccanismo, invece, più generale di resistenza agli antimicrobici è determinato dall'over-espressione di pompe d'efflusso (Canton, 2009), la cui sintesi è promossa dalla presenza nell'ambiente di sostanze quali solventi o metalli pesanti (Allen et al., 2010).

L'uso non regolamentato di questi principi attivi e la mancata, od insufficiente, depurazione delle acque reflue e degli scarichi industriali contribuisce al mantenimento nell'ambiente di batteri resistenti agli antibiotici (ARB, Antibiotic-Resistant Bacteria) e alla conseguente diffusione di geni di resistenza (ARG, Antibiotic-Resistant Genes) (Manaiia et al, 2016; Cheng et al., 2013). L'ambiente, in particolare quello acquatico, è noto essere un buon recettore di ARB e ARG, anche nelle nicchie più ristrette, come quelle costituite dalle acque potabili (Schwartz et al., 2003).

Il fenomeno dell'antibiotico resistenza è un problema di salute pubblica riconosciuto a livello mondiale. Enormi quantità di antibiotici non completamente metabolizzati dopo l'impiego in medicina umana, veterinaria e per altre applicazioni sono rilasciate continuamente nell'ambiente. Questa importante pressione selettiva ha portato ad una progressiva e allarmante disseminazione di batteri antibiotico-resistenti (Marinho et al., 2016). A tal proposito ogni anno circa 25.000 pazienti muoiono in Europa in seguito ad infezioni ospedaliere causate da batteri resistenti (ECDC, 2011).

Con l'obiettivo di ridurre il fenomeno sia l'EU che gli Stati Uniti d'America (USA) hanno implementato dei piani di azione concertati con i settori coinvolti nel mantenimento del fenomeno: medicina umana, medicina veterinaria e agricoltura.

In UE, è stato istituito un "Piano di Azione di Lotta ai Crescenti Rischi di Resistenza Antimicrobica (AMR)", il piano si divide in 8 punti chiave:

- Rafforzare la promozione dell'utilizzazione adeguata degli antimicrobici in tutti gli Stati Membri: prevede il miglioramento della sostenibilità dei piani di sorveglianza nazionali, l'accesso alle sostanze solo previa prescrizione e delle misure di controllo nelle strutture di assistenza sanitaria, oltre a perfezionare l'istruzione e la formazione degli operatori sanitari.
- Rafforzare il quadro regolamentare nel settore dei medicinali veterinari e dei mangimi: rendere in etichetta le avvertenze e i consigli per l'utilizzo e le restrizioni sull'utilizzo normale o "off-label" degli antimicrobici.
- Elaborare raccomandazioni sull'utilizzazione prudente di antimicrobici in medicina veterinaria.
- Rafforzare la prevenzione e il controllo delle infezioni presso strutture medico-sanitarie: prevede la pubblicazione di una relazione sui progressi ottenuti negli Stati Membri, la sorveglianza sulle infezioni nelle strutture e la preparazione del personale medico.
- Elaborazione di una nuova legislazione in materia di salute animale, che metterà in rilievo la prevenzione delle malattie, grazie ad una minore utilizzazione degli antibiotici e alla sostituzione delle attuali disposizioni in merito alla salute animale basate sul controllo delle malattie.
- Promuovere, nel quadro di un'azione per tappe, lavori di ricerca in comune e sforzi di messa a punto di nuovi antibiotici da mettere a disposizione dei pazienti: instaurare gli obiettivi, gli impegni e le modalità d'azione per la collaborazione a lungo termine con le industrie (pubbliche e private) per la sintesi di medicinali innovativi e di procedure accelerate per l'immissione sul mercato degli stessi.
- Promuovere gli sforzi per analizzare la necessità di disporre di nuovi antibiotici in medicina veterinaria: promuovere la ricerca di medicinali innovativi in medicina veterinaria.
- Favorire e/o rafforzare gli impegni multilaterali e bilaterali per la prevenzione e il controllo della resistenza antimicrobica in tutti i settori: cooperare con l'OMS e l'OIE per l'applicazione dei nuovi regolamenti riguardo la lotta all'antibiotico-resistenza e per la riduzione dell'inquinamento ambientale.

Oltre a questi obiettivi vi sono altre azioni che verrebbero svolte parallelamente quali migliorare i sistemi di sorveglianza della antibiotico-resistenza ed il consumo di antibiotici in medicina umana e veterinaria.

In USA, invece, è stata l'amministrazione Obama a varare un piano di azione ("National Action Plan for combating Antibiotic-Resistance Bacteria") articolato nei seguenti 5 punti:

- Rallentare la comparsa di batteri antibiotico-resistenti e prevenire la diffusione di infezioni date da microrganismi resistenti: utilizzare i vaccini ed assicurarsi che gli antibiotici siano utilizzati in maniera adeguata, "*the right antibiotic at the right time at the right dose for the right duration*".
- Rafforzare la sorveglianza sanitaria nazionale per combattere la resistenza: aumentare i controlli ed identificare i microrganismi resistenti con la realizzazione di un network dove vi sia la caratterizzazione dei ceppi resistenti.
- Sviluppo di test diagnostici per l'identificazione e la caratterizzazione dei batteri resistenti: necessario per identificare i ceppi resistenti e per formulare trattamenti efficaci e mantenere il controllo sulle resistenze.
- Spingere la ricerca di base e applicata, e lo sviluppo di nuovi antibiotici, terapie alternative e vaccini: c'è la necessità di investire sulla ricerca per la sintesi di nuovi farmaci per la cura delle malattie.
- Migliorare la collaborazione e le conoscenze tra gli enti internazionali per la prevenzione, sorveglianza, controllo dell'antibiotico-resistenza e la ricerca per lo sviluppo di nuovi antibiotici: essendo l'antibiotico-resistenza un problema internazionale enti quali FAO, OIE, WHO, devono collaborare tra loro per mantenere controllata e migliorare la situazione riguardo le antibiotico-resistenze.

La sorveglianza dell'antibiotico-resistenza è uno strumento essenziale per monitorare la diffusione di tale fenomeno e per comprendere come i meccanismi di resistenza si sviluppino e diffondano nei diversi ambienti. I dati di sorveglianza inoltre sono essenziali per intraprendere efficaci trattamenti terapeutici, per indirizzare le decisioni politiche e per valutare l'efficacia di eventuali strategie intraprese per combattere lo sviluppo dell'antibiotico-resistenza (Marinho et al., 2016).

Gli *Escherichia coli*, oltre ad essere utilizzati come indicatori di contaminazione fecale degli alimenti e in particolare dei molluschi, nell'ambito dello studio dell'antibiotico-resistenza vengono considerati come batteri indicatori. A causa della loro presenza ubiquitaria (nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali, nel suolo, sulle piante e nell'acqua), lo studio della resistenza antibiotica associata a tali microrganismi permette di identificare la diffusione di determinanti di resistenza legati alle fonti da cui tali indicatori sono isolati (Carattoli, 2008). La facilità di reperimento ed isolamento di tali microrganismi, li rende poi particolarmente

adatti per essere impiegati nell'ambito di monitoraggi dell'antibiotico-resistenza. Tali microrganismi diventano quindi indicatori della pressione selettiva e dell'evoluzione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza nell'ambiente (Radhouani et al., 2014).

L'esposizione agli antibiotici non è da attribuire esclusivamente ai trattamenti terapeutici in caso di malattia, ma anche all'impiego dei medesimi farmaci in veterinaria. A tal proposito, gli antibiotici impiegati in veterinaria, possono essere escreti direttamente nell'ambiente, oppure essere accumulati nei liquami, che poi trovano impiego come fertilizzanti e vengono sparsi nei terreni di coltura.

In Europa la Direttiva 2003/99/EC sul monitoraggio delle zoonosi e degli agenti zoonotici obbliga i Paesi Membri a raccogliere dati di antibiotico-resistenza a partire da isolati batterici ottenuti da animali destinati alla produzione di alimenti e dagli alimenti stessi. In aggiunta, la Decisione 2013/652/EU del 12 Novembre 2013 ha definito delle priorità per il monitoraggio dell'antibiotico-resistenza nella prospettiva della salute pubblica, stabilendo quindi una lista di specie batteriche, specie di interesse zootecnico e matrici alimentari da monitorare e individuando metodi armonizzati per condurre il monitoraggio e per riportare i dati di resistenza ottenuti.

Considerando la catena alimentare, e in particolare quella dei molluschi che rappresentano il target del presente studio, i batteri, inclusi quelli che possono veicolare geni di resistenza, possono accumularsi nell'animale grazie al loro peculiare meccanismo di nutrimento ovvero la filtrazione dell'acqua, che permette di concentrare i microrganismi al loro interno (Araud et al., 2016). Dal momento poi che i molluschi bivalvi si prestano al consumo crudi o poco cotti è possibile che tali prodotti alimentari rappresentino una fonte importante di acquisizione di batteri antibiotico-resistenti per i consumatori.

1.7 Microbial Source Tracking (MST)

Come precedentemente dettagliato la qualità microbiologica dei molluschi bivalvi è valutata attraverso la determinazione del livello di contaminazione da *E. coli* quale batterio indicatore di contaminazione fecale. Tuttavia una volta riscontrati campioni con contaminazione superiore rispetto ai criteri definiti dalla normativa vigente è essenziale identificare la fonte di contaminazione fecale, al fine di garantire la qualità delle acque destinate alla pesca dei molluschi a tutela della salute dei consumatori.

L'identificazione di un livello di indicatori fecali oltre i limiti stabiliti può essere indicativo di una fonte attiva di contaminazione, ma può essere determinato anche da una possibile

risospensione del sedimento. E' quindi essenziale identificare la probabile fonte di contaminazione per eliminarne in modo definitivo la causa.

L'aspetto più problematico dell'inquinamento fecale nei paesi sviluppati è che fonti solitamente non identificate sono le principali responsabili della contaminazione di importanti aree costiere o bacini idrici. Mentre sono ben definiti i criteri per stabilire la conformità microbiologica delle acque e dei molluschi in essi pescati/allevati, nel caso di rilevamento di situazioni non conformi relativi alla presenza di batteri indicatori di contaminazione fecale, la normativa non stabilisce chiaramente gli approcci da impiegare per identificare le potenziali fonti.

Il termine "*Microbial source tracking*" (MST) si riferisce ad una moderna disciplina della microbiologia ambientale applicata e si basa su di una serie di approcci metodologici differenti finalizzati ad identificare le potenziali fonti di contaminazione fecale delle acque, al fine di poter individuare la reale origine di una contaminazione fecale (Domingo et al., 2007). Dal momento che il superamento dei criteri microbiologici relativi alla presenza di *E. coli* come indicatori, comporta la temporanea chiusura dei relativi ambiti di pesca/allevamento, con un notevole impatto economico (Meschke e Boyle, 2007), l'identificazione della fonte di inquinamento diventa un pre-requisito essenziale per la gestione del problema e per la definitiva risoluzione (Domingo et al., 2007). Ancora più importante è l'impatto economico derivato dai problemi di sanità pubblica che possono essere generati dalla contaminazione fecale delle acque, basti pensare che è stato stimato che gli episodi gastroenterici causati dalla balneazione in acque costiere contaminate hanno un impatto economico annuo pari a 21.51 milioni di dollari a Los Angeles e in altre città del sud della California (Given et al., 2006).

Nonostante siano pubblicate chiare linee guida e conseguente legislazione che regola la qualità delle acque destinate alla balneazione e alla produzione di molluschi non è altrettanto regolamentata l'analisi delle fonti di inquinamento attraverso lo sviluppo di approcci di *source tracking*. La problematica dell'inquinamento fecale è molto pressante nei paesi in via di sviluppo, ma rimane un problema non trascurabile nemmeno nei paesi sviluppati che hanno strette regole per quanto riguarda la qualità delle acque.

Il MST si basa sull'assunzione che diversi sistemi intestinali selezionano specifiche popolazioni microbiche, *in primis* in relazione alle diete e ai sistemi digestivi che differiscono tra le diverse specie ospiti (Domingo et al., 2007). In qualsiasi ecosistema, la competizione per spazio e nutrienti, ha un ruolo determinante per determinare l'evoluzione del microbioma intestinale. Il sistema immunitario poi e l'impiego di antibiotici rappresentano poi altri due elementi importanti di selezione che possono influenzare il successo di determinati

“colonizzatori” enterici (Savage, 1977).

Obiettivo dell’analisi MST è quello di identificare la specie di origine di batteri contaminanti, quali per esempio i contaminanti fecali.

I primi metodi di MST utilizzavano batteri indicatori di contaminazione fecale (p.e. *E. coli* ed enterococchi). A tal proposito l’analisi di dati di caratterizzazione fenotipica e molecolare di tali microrganismi hanno messo in evidenza che vi sono sub-popolazioni di batteri indicatori che mostrano una distribuzione ospite-specifica (Johnson et al., 2004). In aggiunta, degli studi hanno messo in evidenza che i geni di virulenza (Scott et al., 2005) ed altri geni funzionali (Soule et al., 2006) dei batteri indicatori possono essere utilizzati come potenziali target per saggi di *source tracking*.

Gli approcci metodologici alla base del MST possono essere libreria-dipendente o libreria-indipendente.

L’approccio libreria-dipendente richiede di usufruire di una collezione di batteri fecali di origine nota, che vengono confrontati con quelli isolati dall’ambiente per particolari caratteri distintivi quali per esempio la resistenza agli antibiotici;

l’approccio libreria-indipendenti prevede l’identificazione di un target specie-specifico (Harwood et al., 2014).

Per quest’ultimo approccio sono state sviluppate diverse metodiche molecolari, basate sull’identificazione di geni specie specifici (Gomi et al., 2014), o di regioni conservate, come sequenze ripetitive (Deng et al., 2015; Dombek et al., 2000).

Alcuni studi hanno messo in evidenza come metodi libreria-dipendenti basati su librerie di *E. coli* possono esibire in sensibili quote di misclassificazione o nell’incapacità di classificare un consistente numero di fonti sconosciute (Stoeckel et al., 2004). Altre evidenze hanno dimostrato che aumentando la dimensione delle librerie diminuisce il numero di popolazioni che hanno una vera specificità d’ospite (Hamilton et al, 2006). A causa dei limiti legati a tali approcci, oltre che ai costi e ai lunghi tempi di analisi nell’ambito del MST sono stati sviluppate anche metodiche libreria-indipendente che non richiedono di caratterizzare ceppi batterici coltivati. Sono stati quindi sviluppati saggi basati sulla *polymerase-chain reaction* (PCR) che vanno ad indagare target specie-specifici. In alcuni casi le metodiche proposte possono essere eseguite direttamente sul DNA senza dover isolare e caratterizzare il ceppo batterico con conseguente risparmio di tempo e denaro.

Il MST rimane comunque una metodologia ancora piuttosto giovane e vi sono importanti questioni scientifiche da risolvere per permetterne l’applicazione in modo standardizzato e soprattutto per garantire la qualità e la comparabilità dei dati che vengono prodotti in tale

ambito. A tal proposito alcuni dei problemi principali che devono essere presi in esame riguardano la determinazione della stabilità e specificità dei target identificati, la mancanza di protocolli standardizzati, la mancanza di dati di performance che ci permettono di stabilire l'accuratezza dei metodi impiegati, i metodi di campionamento che devono essere comparabili (Domingo et al., 2007).

Ne consegue che il MST rappresenta un importante ambito di ricerca per le imponenti ripercussioni che può avere sia per l'economia legata alla balneazione, ma anche alla produzione di prodotti ittici, come pure per l'impatto in termine di sanità pubblica, ma è ancora una disciplina giovane con alcune carenze che devono essere colmate.

2. SCOPO DEL LAVORO

È noto che gli ambienti acquatici siano a rischio di inquinamento microbiologico derivante dalle acque reflue che immettono nell'ambiente batteri fecali ed antibiotico-resistenti (Conte et al., 2016; Hoa et al., 2011).

Tra le cause che stanno alla base della diffusione dei batteri antibiotico-resistenti, c'è lo scorretto utilizzo degli antibiotici in medicina umana e veterinaria (Makita et al., 2016; Clements et al., 2015; Campos et al., 2013; Cheng et al., 2013; Serrano Hernandez, 2005), unito ad un inadeguato trattamento delle acque reflue (Osinska et al., 2016; Manaia et al., 2016).

La resistenza alle sostanze antimicrobiche è un problema di sanità pubblica, data la diffusione di ceppi multi resistenti e/o dei relativi determinanti genetici cui consegue la riduzione dell'efficacia delle terapie farmacologiche (Heuer et al., 2009). La diffusione di determinanti genetici di antibiotico resistenza è particolarmente favorito negli ambienti acquatici e marini (Davies e Davies, 2010; Liu et al., 2016) e da qui le resistenze possono essere trasferite ai microrganismi patogeni ed infine all'uomo tramite la catena alimentare (WHO, 2006; WHO, 1999), attraverso il consumo dei prodotti di acquacoltura.

Partendo da questo presupposto, il presente studio ha lo scopo di valutare la diffusione e la frequenza delle antibiotico-resistenze negli ambiti di pesca dei molluschi della costa della Regione del Veneto, attraverso uno studio fenotipico e genotipico dell'antibiotico resistenza, utilizzando il batterio *Escherichia coli* quale indicatore.

Il secondo obiettivo della tesi è stato quello di identificare la specie di origine degli isolati oggetto di studio allo scopo di identificare eventuali "hot-spots" di contaminazione fecale e di diffusione di geni di resistenza

Diversi studi hanno infatti dimostrato che è possibile associare i batteri enterici alla specie di provenienza attraverso la ricerca di markers genetici specie-specifici. (Deng et al., 2015; Gomi et al., 2014; Mauffret et al., 2013; Fu et al., 2011; Ma et al., 2011; Dombek et al., 2000) e intervenire di conseguenza per ridurre la diffusione di batteri contaminanti e di geni di antibiotico resistenza nell'ambiente.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Campioni

I campioni per il presente studio derivano dall'attività svolta presso il laboratorio "Controlli ufficiali", dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve). I campioni erano sia campioni ufficiali prelevati nell'ambito del piano regionale di controllo alimenti (PRIC), sia campioni di monitoraggio, prelevati dai diversi ambiti di pesca appartenenti alla zona lagunare ed alla costa della Regione del Veneto.

Lo studio è stato condotto su campioni di molluschi bivalvi e nello specifico in cozze (*Mytilus galloprovincialis*) e vongole (*Venerupis philippinarum*, *Tapes decussatus*).

Il periodo di raccolta dei campioni è stato di circa tre mesi, da Marzo fino a Giugno 2016.

3.2 MPN-Most Probable Number

La metodica dell'MPN è un metodo microbiologico quantitativo che permette di stimare il più probabile livello di contaminazione di uno specifico microrganismo all'interno di un alimento.. Nello specifico, il presente studio ha valutato la concentrazione di *Escherichia coli*. L'analisi microbiologica è stata svolta, seguendo le indicazioni per la numerazione di *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi previste dalla ISO 16649:3 del 2015 basata sulla tecnica del Most Probable Number (MPN), quindi del numero più probabile di *E. coli* che è stato espresso in 100 g di prodotto (MPN/100g) come previsto dalla normativa vigente.

L'analisi si articola nella seguenti fasi:

- 1 Lavaggio: i molluschi sono lavati sotto acqua corrente e spazzolati in modo da eliminare residui di fango, incrostazioni e parassiti presenti sulle valve; quindi viene effettuato un ultimo lavaggio con acqua distillata sterile
- 2 Prelievo del campione: sono presi in esame solo gli esemplari chiusi (un minimo di 10 individui), quindi sono aperti con un bisturi sterile e il contenuto (corpo e liquido intravalvare) viene posto all'interno di un sacchetto sterile per stomacker, fino a raggiungere un peso di 75-100 g,
- 3 Omogeneizzazione del campione in stomacker per 1-2 minuti circa
- 4 Preparazione della diluizione madre: allestire una diluizione 1:10 (10^{-1}), corrispondente a 10 g di molluschi omogenati aggiunti a 90 ml di ST (Soluzione Tamponata) sterile

- 5 Preparazione delle diluizioni successive: a partire dalla soluzione madre, utilizzando il brodo di coltura l'MMGB (Minerals modified Glutamate Broth), allestire le diluizioni successive:
 - o 10^0 : 5 provette contenenti 10 ml di MMGB a doppia concentrazione, seminare ogni provetta con $10 \pm 0,2$ ml di diluizione 10^{-1} ;
 - o 10^{-1} : 5 provette contenenti 10 ml di MMGB a singola concentrazione, seminare ciascuna provetta con $1 \pm 0,1$ ml di diluizione 10^{-1} ;
 - o 10^{-2} : per fare la diluizione 1:100 (10^{-2}): 1 ml di diluizione 10^{-1} + 9 ml di ST sterile; 5 provette contenenti 10 ml di MMGB a singola concentrazione, seminare ogni provetta con $1 \pm 0,1$ ml di diluizione 10^{-2} ;
- 6 Utilizzare una provetta di MMGB a singola concentrazione non inoculata come controllo negativo.
- 7 Incubare le provette a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 h.
- 8 Nel caso in cui si sospetti una contaminazione molto elevata è necessario allestire ulteriori diluizioni.
- 9 Al termine della fase di incubazione si considerano positive tutte quelle provette che presentano colorazione gialla e tutte quelle che mostrano un minimo viraggio di colore rispetto al controllo negativo. Si considerano, invece, negative le provette delle diluizioni che non hanno mostrato alcun cambiamento di colore del terreno.
- 10 Si procede con la semina in TBX entro 4 ore dalla lettura di tutte le provette risultate positive. La semina deve permettere di ottenere colonie isolate. Qualora non sia possibile seminare entro le 4 ore previste, si possono conservare le provette in frigo, fino a 48 ore. Le piastre di TBX vengono incubate capovolte a $44^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ per 22 ± 2 h.

Si considerano positive le piastre che presentano colonie di colore blu o blu-verde; sono da considerare negativi i campioni per cui si ottengono tutte le colonie di colore differente oppure se vi è assenza di crescita.

Per il calcolo dell'MPN si considera il numero di provette confermate positive dalle piastre TBX per ciascuna diluizione. Il codice così ottenuto, indicativo delle provette positive per diluizione, viene immesso nel calcolatore MPN e il risultato ottenuto è espresso come MPN/100g. In caso di risultati negativi, questi si esprimono come ≤ 18 MPN/100g.

3.3 Isolamento dei Ceppi

Per i campioni in cui l'MPN è risultato positivo e quindi è stato possibile stimare un livello di contaminazione superiore a 18 MPN/100g si è proceduto con l'isolamento dei ceppi di *Escherichia coli* secondo il seguente protocollo.

- Da una delle piastre di TBX si è prelevata una colonia isolata blu o verde-blu, quindi si è proceduto con l'isolamento in terreno McC (MacConkey), selettivo per *Escherichia coli*; le piastre sono state incubate a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 h
- Dalla piastra di McC è stata prelevata una colonia tipica che è stata piastrata in terreno AT e stemperata nel brodo colturale TTM, le provette sono state incubate a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 h. Le colonie di *E. coli* in McC crescono con colore rosa intenso con fondo fucsia
- Per confermare biochimicamente le colonie sospette di *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi si è proceduto aggiungendo al TTM circa 1 ml di reattivo di Kovacs, che, in caso di positività, virava da giallo a fucsia. I ceppi non ascrivibili a *E. coli* sono stati eliminati, mentre al contrario, i ceppi confermati come *E. coli* sono stati stoccati in latte a -20°C per la successiva analisi MIC.

In Tabella 3.1 sono stati riportati i terreni utilizzati per le analisi di quantificazione e isolamento di *E. coli* e le condizioni di incubazione.

Tipo di Determinazione	Substrato Colturale	Temperatura °C	Tempo (Ore)
<i>Escherichia coli</i>	MMGB (Minerals Modified Glutamate Broth)	37	24
<i>Escherichia coli</i>	TBX (Tryptone Bile X-Gluc, Oxoid)	44	24
<i>Escherichia coli</i>	McC (MacConkey; Oxoid)	37	24
<i>Escherichia coli</i>	TTM (Tryptone Triptofane Medium)	37	24
<i>Escherichia coli</i>	AT (Agar Triptosio, Oxoid)	37	24

Tabella 3.1: terreni di coltura per le analisi

3.4 MIC- Minima Concentrazione Inibente

Questa metodica permette di stimare la concentrazione minima di un antibiotico (in mg/l), che permette la completa inibizione della crescita batterica. Per eseguire tale analisi sono state utilizzate le piastre commerciali Sensititre™ EUVSEC (TREK Diagnostics Systems, Thermo

Scientific) a 96 pozzetti con 14 antibiotici a concentrazioni scalari. In Figura 3.1 è riportata una piastra rappresentativa degli antibiotici testati, mentre in Figura 3.2 è mostrati un esempio della piastra per MIC.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	SMX 1024	TMP 32	CIP 8	TET 64	MERO 16	AZI 64	NAL 128	CHL 128	TGC 8	COL 16	AMP 64	GEN 32
B	SMX 512	TMP 16	CIP 4	TET 32	MERO 8	AZI 32	NAL 64	CHL 64	TGC 4	COL 8	AMP 32	GEN 16
C	SMX 256	TMP 8	CIP 2	TET 16	MERO 4	AZI 16	NAL 32	CHL 32	TGC 2	COL 4	AMP 16	GEN 8
D	SMX 128	TMP 4	CIP 1	TET 8	MERO 2	AZI 8	NAL 16	CHL 16	TGC 1	COL 2	AMP 8	GEN 4
E	SMX 64	TMP 2	CIP 0.5	TET 4	MERO 1	AZI 4	NAL 8	CHL 8	TGC 0.5	COL 1	AMP 4	GEN 2
F	SMX 32	TMP 1	CIP 0.25	TET 2	MERO 0.5	AZI 2	NAL 4	FOT 1	TGC 0.25	TAZ 2	AMP 2	GEN 1
G	SMX 16	TMP 0.5	CIP 0.12	CIP 0.03	MERO 0.25	MERO 0.06	FOT 4	FOT 0.5	TAZ 8	TAZ 1	AMP 1	GEN 0.5
H	SMX 8	TMP 0.25	CIP 0.06	CIP 0.015	MERO 0.12	MERO 0.03	FOT 2	FOT 0.25	TAZ 4	TAZ 0.5	POS CON	POS CON

Azitromicina (AZI)
 Ampicillina (AMP)
 Cefotaxime (FOT)
 Ceftazidime (TAZ)
 Cloramfenicolo (CHL)
 Ciprofloxacina (CIP)
 Colistina (COL)
 Gentamicina (GEN)
 Meropenem (MERO)
 A. nalidixico (NAL)
 Sulfametossazolo (SMX)
 Tetraciclina (TET)
 Tigeciclina (TGC)
 Trimetoprim (TMP)

Figura 3.1: Piastra Sensititre™ mostrante gli antibiotici a diluizioni scalari

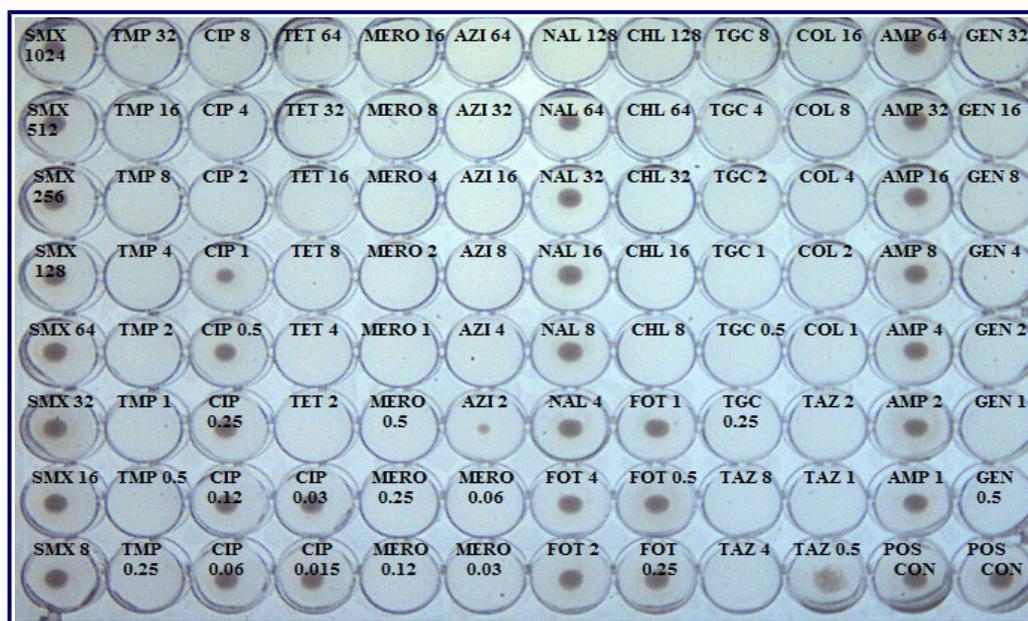


Figura 3.2: Piastra Sensititre™ dopo l'incubazione ceppo 2246

L'analisi prevede i seguenti passaggi:

- Semina in una provetta di AT, da incubare a $37^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 24 ± 2 h, in modo da avere una coltura fresca
- Prelievo di un'ansata di patina batterica che va stemperata in una provetta contenente 4 ml di acqua distillata, quindi viene vortexata

- Prelievo di 1 ml di sospensione che viene trasferita in una cuvetta per eseguire la determinazione dell'OD allo spettrofotometro (SmartSpec Plus, Biorad) alla lunghezza d'onda di 625 nm. L'OD della sospensione dev'essere compreso tra 0,08-0,13
- Trasferimento di 10 µl di sospensione batterica in 11 ml di brodo CAMHB-TES (Cation Adjusted Mueller Hinton Broth with TES, Biomedical Service/Oxoid Thermo Scientific), e mescolamento per inversione. L'inoculo così ottenuto è di circa 1×10^5 ufc/mL
- Con l'utilizzo di un inoculatore automatico, in ogni pozzetto della piastra inoculo di 50 µl di brodo, e chiusura della piastra un film protettivo e incubazione a $37^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 h
- Lettura dei risultati mediante lettore VIZION (TREK, Diagnostic Systems, Thermo Scientific) per valutare la crescita del microorganismo

Con l'aiuto del programma SWINE è stato possibile interpretare i risultati relativi alla crescita nei pozzetti in base ai valori *cut-off* epidemiologici, al fine di classificare il microorganismo come sensibile (S) o resistente (R) nei confronti di ciascun antibiotico. Nell'ambito dello studio sono stati impiegati i valori di *cut-off* epidemiologici forniti da EUCAST (European Committee on antimicrobial susceptibility testing) ed aggiornati nel sistema VIZION con frequenza annuale (<http://www.eucast.org>).

Per *cut-off* si intende il valore medio di MIC che indica la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita batterica di una popolazione di batteri appartenenti ad una data specie.

Interpretazione dei risultati:

- Se il valore di MIC osservato per il ceppo in esame è \leq al *cut-off* indicato per quella molecola allora il ceppo è definito SENSIBILE a tale molecola e il valore di MIC è riportato come valore numerico;
- Se il valore di MIC osservato per il ceppo in esame è $>$ del *cut-off* indicato per quella molecola, allora il ceppo è definito RESISTENTE a tale molecola ed il valore di MIC è riportato come valore numerico;
- Se per la molecola non è stato identificato alcun valore di *cut-off*, allora il valore MIC per tale molecola è considerato come NON INTERPRETABILE e di seguito il valore MIC è riportato come valore numerico

I valori *cut-off* considerati per *Escherichia coli* sono rappresentati in Tabella 3.2.

Antibiotico	Valore cut-off (mg/l)
Azitromicina (AZI)	n.d.
Ampicillina (AMP)	>8
Cefotaxime (FOT)	>0,25
Ceftazidime (TAZ)	>0,5
Cloramfenicolo (CHL)	>16
Ciprofloxacina (CIP)	>0,064
Colistina (COL)	>2
Gentamicina (GEN)	>2
Meropenem (MERO)	>0,125
Ac. nalidixico (NAL)	>16
Sulfametoxazolo (SMX)	>64
Tetraciclina (TET)	>8
Tigeciclina (TGC)	>1
Trimetoprim (TMP)	>2

Tabella 3.2: valori cut-off per *Escherichia coli*, da EUCAST

3.5 Estrazione del DNA

Il DNA relativo ai ceppi di *E. coli* è stato estratto tramite bollitura a partire da una coltura pura. Sotto la cappa a flusso laminare viene stemperata un'ansata di coltura, contenente 4 colonie, in 300 µl di acqua demineralizzata sterile, il volume è portato a 99°C per 15 min in agitazione (400 rpm) e centrifugato per 5 min a 12000 rpm. Infine il surnatante viene prelevato e conservato a -20°C per le successive analisi.

3.6 PCR- Polymerase Chain Reaction

Tramite la reazione a catena della polimerasi, PCR, e con l'utilizzo di primer specifici per un pannello di determinanti genici di resistenza agli antibiotici sono state verificate confermate a livello genotipico le resistenze antibiotiche identificate a livello. La stessa tecnica è stata utilizzata per il source tracking, ovvero per investigare l'origine dei ceppi isolati dai molluschi.

La Master Mix per le reazioni di amplificazione sono state allestite con:

- MgCl₂ (Applied Biosystems™);
- Buffer Taq Gold (Applied Biosystems™);
- Primers specifici (Eurofins Genomics);
- dNTPs (nucleotidi A, T, C, G - Applied Biosystems™);
- Acqua demineralizzata sterile per portare a volume
- Taq Gold (Applied Biosystems™);
- DNA estratto

In ogni sessione analitica, assieme ai campioni in esame sono stati amplificati un controllo positivo, quando presente, ed uno negativo. La reazione è stata svolta nel termociclatore GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems™).

Conclusa la reazione i campioni sono stati caricati su un gel di agarosio Nusieve™ 3:1 (Agarose, Lonza, Rockland, USA) al 2% diluito in tampone TBE 1X (Biorad).

3.6.1 Corsa e Colorazioni

Sono stati utilizzati due tipi di colorante, infatti, oltre alla classica colorazione in etidio bromuro è stata provata anche quella del Midori Green, una colorazione meno tossica, facente funzione di loading buffer e che permette di visualizzare direttamente le bande al transilluminatore. Il loading buffer permette al DNA di precipitare all'interno del pozzetto e di renderlo visibile durante la corsa.

- Corsa con l'utilizzo del bromuro d'etidio: in ogni pozzetto sono caricati 8 µl di amplificato, uniti a 3 µl di loading buffer, al termine della corsa il gel è stato immerso in una soluzione di bromuro d'etidio 0,1 µg/mL per 30 minuti, quindi visualizzato al transilluminatore UV (Gel Doc™ XR+, BIORAD).

- Corsa con Midori Green Direct (Nippon Genetics Europe GmbH): in ogni pozzetto sono stati caricati 8 µl di amplificato, uniti a 1 µl di Midori Green, al termine della corsa il gel è stato subito visualizzato al transilluminatore UV (Gel Doc™ XR+, BIORAD).

Il gel in entrambi i casi è stato fatto correre ad un voltaggio costante di 110V per 60 minuti. Il marker di peso molecolare utilizzato nelle corse elettroforetiche è stato il DNA ladder 100 bp (Invitrogen, Biolife Technologies). La colorazione in etidio bromuro è stata fatta in assenza del secondo colorante, il Midori Green.

L'immagine è stata catturata con l'apposito software Image™ Lab.

3.6.2 PCR per la ricerca di geni di Antibiotico Resistenza

Per ogni antibiotico di cui si è osservata la resistenza fenotipica attraverso il saggio MIC nel ceppo batterico isolato sono state fatte PCR simplex e multiplex per valutare la presenza di specifici determinanti genici di resistenza. Per ogni antibiotico sono stati scelti i geni che si possono ritrovare più comunemente in caso di resistenza. Nello specifico, sono stati ricercati i geni *tetA*, *tetB*, *tetG* (Ng et al. 1999) per la resistenza alla Tetraciclina; i geni *bla_{TEM}*, *bla_{PSE}* e *bla_{OXA}* (Guerra et al., 2001; Guerra et al., 2000) rappresentano le principali famiglie geniche correlate alla resistenza ad Ampicillina; i geni *sul1*, *sul2*, *sul3* (Chu et al., 2001, Suhartono et al. 2016) sono, invece, associati alla resistenza al Sulfometoxazolo; i geni *catA1*, *cmlA1* e *floR*, sono associati alla resistenza al Cloramfenicolo (Alonso et al., 2016); le mutazioni del gene *gyrA* e i geni plasmidici *qnrAm*, *qnrBm* e *qnrSm* sono alla base delle resistenze ad Acido Nalidixico e Ciprofloxacina; i geni *dfrA1-like*, *dfrA5-14* sono correlati alla resistenza antibiotica a Trimetoprim (Suhartono et al., 2016, Seputiene et al., 2010; Guerra et al., 2000); infine i geni *ctx-MU* sono responsabili per le resistenze a Cefotaxime e Cefotazidina (Rodriguez et al., 2009; Baquero et al., 2008). Parallelamente all'analisi dei campioni sono stati amplificati anche dei ceppi per controllo positivo, per verificare l'efficienza della reazione e per controllare l'altezza delle bande.

Nelle tabelle di seguito sono mostrate le concentrazioni e le quantità dei reagenti delle Mix per le diverse molecole.

Multiplex PCR Tetraciclina			
tetA (210 bp)-tetG (500 bp)-tetB (600 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	1 µM	1 µl
Primer tetA fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer tetA rv	10 µM	1 µM	5 µl
Primer tetG fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer tetG rv	10 µM	1 µM	5 µl
Primer tetB fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer tetB rv	10 µM	1 µM	5 µl

Taq Gold	5 U/μl	2,5 U	0,5 μl
H₂O			4.5 μl
DNA			5 μl
Volume Totale			50 μl

Profilo termico: 95°C per 5' 30cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 30") 72°C per 5'

Tabella 3.3: Concentrazioni e quantità per i target per la resistenza alla Tetraciclina

Multiplex PCR Ampicillina			
tem (503 bp)-pse (419 bp)-oxa (708 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 μl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 μl
dNTPs	10 μM	200 μM	1 μl
Primer tem fw	10 μM	1 μM	5 μl
Primer tem rv	10 μM	1 μM	5 μl
Primer pse fw	10 μM	1 μM	5 μl
Primer pse rv	10 μM	1 μM	5 μl
Primer oxa fw	10 μM	1 μM	5 μl
Primer oxa rv	10 μM	1 μM	5 μl
Taq Gold	5 U/μl	2,5 U	0,5 μl
H₂O			4.5 μl
DNA			5 μl
Volume Totale			50 μl

Profilo termico: 95°C per 5' 30cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 30") 72°C per 5'

Tabella 3.4: Concentrazioni e quantità per i target di resistenza all'Ampicillina

Multiplex PCR Cloramfenicolo catA1 (623 bp)-cmlA1 (435 bp)- floR (868 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	400 µM	1 µl
Primer catA1 fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer catA1 rv	10 µM	1 µM	5 µl
Primer cmlA1 fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer cmlA1 rv	10 µM	1 µM	5 µl
Primer floR fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer floR rv	10 µM	1 µM	5 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			3,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5' 30 cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 40") 72°C per 5'

Tabella 3.5: Concentrazioni e quantità per i target di resistenza al Cloramfenicolo

Simplex PCR per Sulfametoxazolo Sul1 (436 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	2,5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	0,5 µl
Primer sul2 fw	10 µM	1 µM	2,5 µl
Primer sul2 rv	10 µM	1 µM	2,5 µl
Taq Gold	5 U/µl	1,5 U	0,3 µl
H₂O			12,2 µl
DNA			2,5 µl
Volume Totale			25 µl

Profilo termico: 95°C per 5' 30 cicli:(95°C per 30"; 65°C per 30"; 72°C per 30") 72°C per 5'

Tabella 3.6: Concentrazioni per la PCR simplex per il target di resistenza *sul1* per il Sulfometoxazolo

Simplex PCR per Sulfametoxazolo			
Sul2 (707 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	2,5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	0,5 µl
Primer sul2 fw	10 µM	1 µM	2,5 µl
Primer sul2 rv	10 µM	1 µM	2,5 µl
Taq Gold	5 U/µl	1,5 U	0,3 µl
H₂O			12,2 µl
DNA			2,5 µl
Volume Totale			25 µl

Profilo termico: 95°C per 5' 30 cicli:(95°C per 30"; 58°C per 30"; 72°C per 30") 72°C per 5'

Tabella 3.7: Concentrazioni per la PCR simplex per i target di resistenza *sul2* per il Sulfometoxazolo

Simplex PCR per Sulfametoxazolo			
Sul3 (789 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	2,5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	0,5 µl
Primer sul2 fw	10 µM	1 µM	2,5 µl
Primer sul2 rv	10 µM	1 µM	2,5 µl
Taq Gold	5 U/µl	1,5 U	0,3 µl
H₂O			12,2 µl
DNA			2,5 µl
Volume Totale			25 µl

Profilo termico: 95°C per 5' 30 cicli:(95°C per 30"; 51°C per 30"; 72°C per 30") 72°C per 5'

Tabella 3.8: Concentrazioni per la PCR simplex per il target di resistenza *sul3* per il Sulfometoxazolo

Simplex PCR per Trimetoprim dfrA1-like (473 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1 µl
Primer dfrA1-like fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer dfrA1-like rv	10 µM	1 µM	5 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			24,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30 cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 30"); 72°C per 5'

Tabella 3.9: Concentrazioni e quantità il target di resistenza *dfrA1-like* per il Trimetoprim

Simplex PCR per Trimetoprim dfrA5-14 (379 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1 µl
Primer dfrA5-14 fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer dfrA5-14 rv	10 µM	1 µM	5 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			24,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30 cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 30"); 72°C per 5'

Tabella 3.10: Concentrazioni e quantità per il target di resistenza *dfrA5-14* per il Trimetoprim

Simplex PCR per Trimetoprim dfrA12 (462 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1 µl
Primer dfrA12 fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer dfrA12 rv	10 µM	1 µM	5 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			24,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 30"); 72°C per 5'

Tabella 3.11: Concentrazioni e quantità il target di resistenza *dfrA12* per il Trimetoprim

Simplex PCR per Trimetoprim dfrA7-17 (345 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1 µl
Primer dfrA7-17 fw	10 µM	1 µM	5 µl
Primer dfrA7-17 rv	10 µM	1 µM	5 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			24,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 30"); 72°C per 5'

Tabella 3.12: Concentrazioni e quantità il target di resistenza *dfrA7-17* per il Trimetoprim

Simplex PCR per Ciprofloxacina e Ac. Nalidixico gyrA (334 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1,2 µl
Primer gyrA fw	20 µM	1 µM	2,5 µl
Primer gyrA rv	20 µM	1 µM	2,5 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,3 µl
H₂O			29,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30 cicli (95°C per 30"; 55°C per 30"; 72°C per 30"); 72°C per 5'

Tabella 3.13: Concentrazioni e quantità per i target di resistenza per Ciprofloxacina e Ac. Nalidixico

Multiplex PCR per Ciprofloxacina e Ac. Nalidixico qnrAm (580 bp)- qnrBm (264 bp)- qnrSm (428 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	1,5 mM	3 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1 µl
Primer qnrAm fw	10 µM	0,2 µM	1 µl
Primer qnrAm rv	10 µM	0,2 µM	1 µl
Primer qnrBm fw	10 µM	0,2 µM	1 µl
Primer qnrBm rv	10 µM	0,2 µM	1 µl
Primer qnrSm fw	10 µM	0,2 µM	1 µl
Primer qnrASm rv	10 µM	0,2 µM	1 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			29,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 10'; 35 cicli (95°C per 1'; 54°C per 1'; 72°C per 1'); 72°C per 10'

Tabella 3.14: Concentrazioni e quantità per i target di resistenza per Ciprofloxacina e Ac. Nalidixico

Simplex PCR per Cefotaxime e Cefotazidime ctx-MU (462 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	2,5 µl
MgCl ₂	25 mM	2 mM	2 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	0,5 µl
Primer ctx-MU fw	10 µM	1 µM	2,5 µl
Primer ctx-MU rv	10 µM	1 µM	2,5 µl
Taq Gold	5 U/µl	1,5 U	0,3 µl
H ₂ O			12,2 µl
DNA			2.5 µl
Volume Totale			25 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30cicli (95°C per 30"; 60°C per 30"; 72°C per 30"); 72°C per 5'

Tabella 3.15: Concentrazioni e quantità per i target di resistenza per Cefotaxime e Cefotazidime

Nelle Figure 3.3 e 3.4 sono mostrati due esempi di corsa in gel.

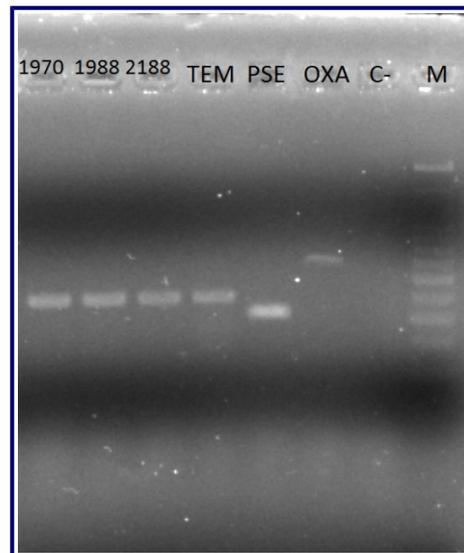


Figura 3.3: analisi in gel in elettroforesi per i ceppi 1970, 1988, 2188 e rispettivi positivi per la resistenza all'Ampicillina, *bla_{tem}* (503 bp), *bla_{pse}* (419 bp), *bla_{oxa}* (708 bp)

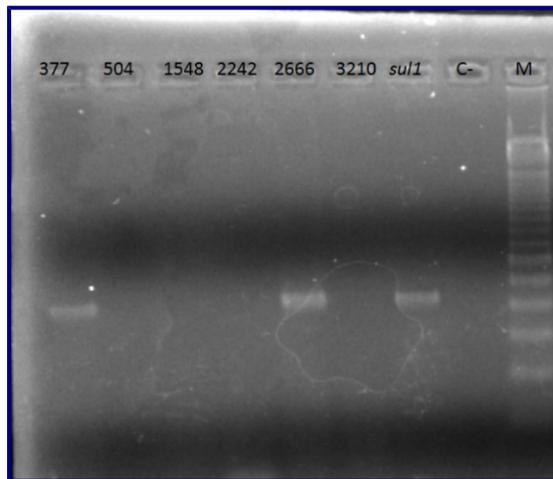


Figura 3.4: analisi dei ceppi 377, 504, 1548, 2187, 2242, 2528, 2666, 2746, 3027, 3210, 3696, per l'analisi della resistenza al Sulfometoxazolo con il gene *sul1*(436 bp)

3.7 Sequenziamento

Per la resistenza a fluorochinoloni e chinoloni (Ciprofloxacina e Ac. Nalidixico) è stato amplificato il gene *gyrA*. Successivamente alla reazione di PCR il gene è stato sequenziato per verificare la presenza, nella regione di interesse, di una o più mutazioni che determinano la resistenza all'antibiotico.

Si tratta di mutazioni che riguardano una sola base (SNP) che portano alla sostituzione di un amminoacido nella proteina.

All'interno della catena proteica la sostituzione può riguardare la posizione 83, dove sarà presente la leucina (Leu) al posto della serina (Ser) e la posizione 87, con un'asparagina (Asn) al posto dell'acido aspartico (Asp) (Eaves et al., 2004).

Il sequenziamento degli amplificati è stato svolto previa procedura di purificazione, che comporta la rimozione dei dNTPs e dei primers non incorporati attraverso l'utilizzo del MinElute PCR Purification Kit (Qiagen).

Il sequenziamento è stato poi svolto con l'utilizzo del sequenziatore automatico ABI PRISM™ 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems). I cromatogrammi ottenuti sono stati analizzati con i software dedicati (Sequencing Analysis 5.2 e SeqScape v2.5, Applied Biosystems). Le sequenze ottenute sono state confrontate una per volta in BLAST con la sequenza di riferimento presente in GeneBank® (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) per identificare eventuali mutazioni; quindi le sequenze sono state tradotte nel frammento proteico con l'aiuto di EMBOSS Transeq (www.ebi.ac.uk/Tools/st/emboss_transeq). Infine, le sequenze amminoacidiche sono state allineate con il programma MultiAlin

(multialin.toulouse.inra.fr/multialin/) con la sequenza della proteina *gyrA* NC_003197.1 di riferimento depositata inGeneBank®.

3.8 PCR end-point per il Source Tracking

Per ogni ceppo di *Escherichia coli* si è ricercata l'origine.

Per lo studio di *source tracking* è stata ricercata la specie del pollo essendo nota da letteratura la specificità dei primers (Gomi et al., 2014). Sono state considerate due regioni target specie-specifiche elencate nella Tabella 3.16.

Regione Target	Specie	Grandezza frammento (bp)
Ch2	Pollo	203
Ch7	Pollo	200

Tabella 3.16: sequenze target di ogni specie considerata con la relativa grandezza del prodotto di amplificazione

Per verificare la specificità delle regioni target considerate nell'ambito dello studio sono stati utilizzati 10 ceppi di *E. coli* dal pollo, tra quelli presenti nella ceppoteca del laboratorio. Da questi ceppi si è estratto il DNA quindi è stata svolta la PCR end-point per ogni regione. I ceppi di origine nota sono stati utilizzati anche come controllo positivo nelle PCR per i ceppi di origine ignota.

Quindi si è proceduto con la reazione di amplificazione per ogni ceppo isolato. Nelle Tabelle 3.17 e 3.18 le mastermix utilizzate per discriminare l'origine.

Simplex PCR per Pollo			
CH2 (203 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1 µl
Primer CH2 fw	50 µM	1 µM	1 µl
Primer CH2 rv	50 µM	1 µM	1 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			32,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30 cicli (95°C per 30"; 53°C per 30"; 72°C per 2'); 72°C per 10'

Tabella 3.17: Concentrazioni e quantità per il target d'origine CH2 di pollo

Simplex PCR per Pollo			
CH7 (191 bp)			
Reagenti	Concentrazione Iniziale	Concentrazione finale	Quantità per Campione
Buffer Taq Gold	10X	1X	5 µl
MgCl₂	25 mM	2 mM	4 µl
dNTPs	10 µM	200 µM	1 µl
Primer CH2 fw	50 µM	1 µM	1 µl
Primer CH2 rv	50 µM	1 µM	1 µl
Taq Gold	5 U/µl	2,5 U	0,5 µl
H₂O			32,5 µl
DNA			5 µl
Volume Totale			50 µl

Profilo termico: 95°C per 5'; 30 cicli: (95°C per 30", 52°C per 30", 72°C per 2'); 72°C 10'

Tabella 3.18: Concentrazioni e quantità per il target d'origine CH7 di pollo

Nelle Figure 3.5 e 3.6, a titolo esemplificativo sono mostrate le corse in gel degli amplificati di origine nota insieme a 7 campioni di origine ignota utilizzando il primer CH2.

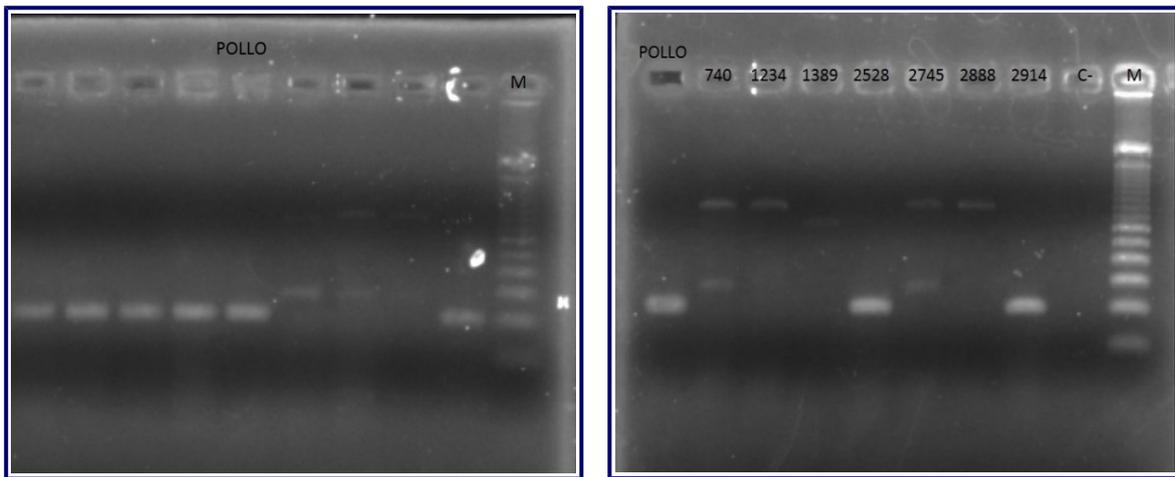


Figura 3.5 e 3.6: corsa in gel per gli amplificati dai campioni noti di pollo (prima immagine) insieme a 7 campioni ignoti e un campione di origine nota (seconda immagine)

3.9 Georeferenziazione

In collaborazione con il laboratorio GIS all'IZS delle Venezie è stato possibile georeferenziare i dati ottenuti dalle sperimentazioni all'interno delle mappe recanti gli ambiti di pesca presenti sulla costa Veneta, grazie all'ausilio del sistema *ArcGis*.

Il sistema è stato utilizzato anche per ulteriori informazioni concernenti lo studio di *source-tracking*.

Il sistema *ArcGis* ha come parte fondamentale il modulo *ArcMap*, un'applicazione che consente la visualizzazione dei dati e la produzione di mappe e possiede gli strumenti per effettuare l'analisi spaziale, modellazione e l'elaborazione di dati geografici.

4. RISULTATI

4.1 Isolamento dei Ceppi

Tra Marzo e Giugno 2016 sono stati analizzati 196 campioni di molluschi bivalvi vivi (cozze e vongole) dai diversi ambiti di pesca sulla costa veneta. Per lo studio di antibiotico-resistenza sono stati presi in considerazione solo i campioni che hanno mostrato la presenza di *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi all'analisi MPN, ovvero 126 campioni da cui sono stati isolati altrettanti ceppi di *E. coli*.

La maggior parte dei ceppi è stata isolata da campioni prelevati alla produzione (allevamento e pesca) nell'ambito dei piani di monitoraggio (118), mentre i rimanenti (8) sono stati isolati in campioni prelevati al dettaglio nell'ambito del programma di monitoraggio regionale degli alimenti (PRIC).

Nella zona costiera considerata sono presenti in totale 101 ambiti di pesca: 91 nelle zone lagunari e 10 in mare aperto. Tra gli ambiti considerati solo 26 (7 in mare aperto, 19 nelle aree lagunari) hanno mostrato positività per la presenza di *Escherichia coli*.

In abella 4.1 sono riportati tutti i campioni analizzati per ambito, i campioni positivi e negativi per *E.coli*, e i valori massimi di MPN/100g riscontrati in ogni ambito che ha presentato positività all'analisi microbiologica; mentre in Figura 4.1 è riportata una mappa di riferimento in cui sono indicati tutti gli ambiti di pesca presenti nella regione Veneto*².

2 *N.B.2: la divisione delle AULSS presentate in mappa risalgono a dicembre 2016



Figura 4.1: Ambiti di pesca presenti nella costa del Veneto

Ambito	Tot campioni esaminati	N° Campioni Positivi	Valori MPN /100 g	N° Campioni Negativi
12L018	3	3	230	0
12L046	5	5	5400	0
12L051	5	5	9200	0
12L052	9	6	490	3
12L053	9	4	110	5
12L054	10	10	1300	0
12L056	4	4	1100	0
12L057	5	4	5400	1
13L001	3	2	170	1
14L001	5	3	130	2
14L002	5	0	-	5
14L003	5	2	1400	3
14L004	6	5	1100	1
14L005	6	3	16000	2
14L006	8	8	790	0
14L007	7	6	>18000	1
14L008	5	4	3500	1
14L009	5	5	1100	0
14L010	6	6	2800	0
10M001	4	1	130	3
10M002	3	3	330	0
10M003	4	2	78	2
12M001	9	2	130	7
12M002	1	0	-	1
12M003	31	14	940	17
14M001	6	5	1300	1
-	27	12	1700	14
	196			70

Tabella 4.1: Ambiti di pesca con il rispettivo numero di campioni prelevati, campioni positivi per presenza di *E. coli* e il valore più elevato di MPN/100g trovato nell'ambito; giallo= aree B; azzurro= aree A; viola= area non conosciuta; rosso= valori superiori al limite consentito nell'area

I limiti microbiologici variano a seconda dell'area in cui sono stati raccolti/pescati gli esemplari, come descritto nel capitolo dell'introduzione.

Nel presente studio sono stati considerati 19 ambiti classificati come B e 7 come A. Dei campioni rimanenti non si conosce la classificazione dell'area di origine.

I valori di MPN più alti sono stati riscontrati nelle aree lagunari, 5 delle quali hanno un livello di inquinamento fecale superiore al limite (4600 MPN/100g); nelle aree di mare aperto l'inquinamento fecale è risultato essere inferiore, nonostante ciò due ambiti hanno dimostrato

di superare il limite consentito di 230 MPN/100g

In Figura 4.2 sono mostrati tutti gli ambiti di pesca oggetto d'indagine e il numero di ceppi di *E. coli* isolati da ciascun ambito.

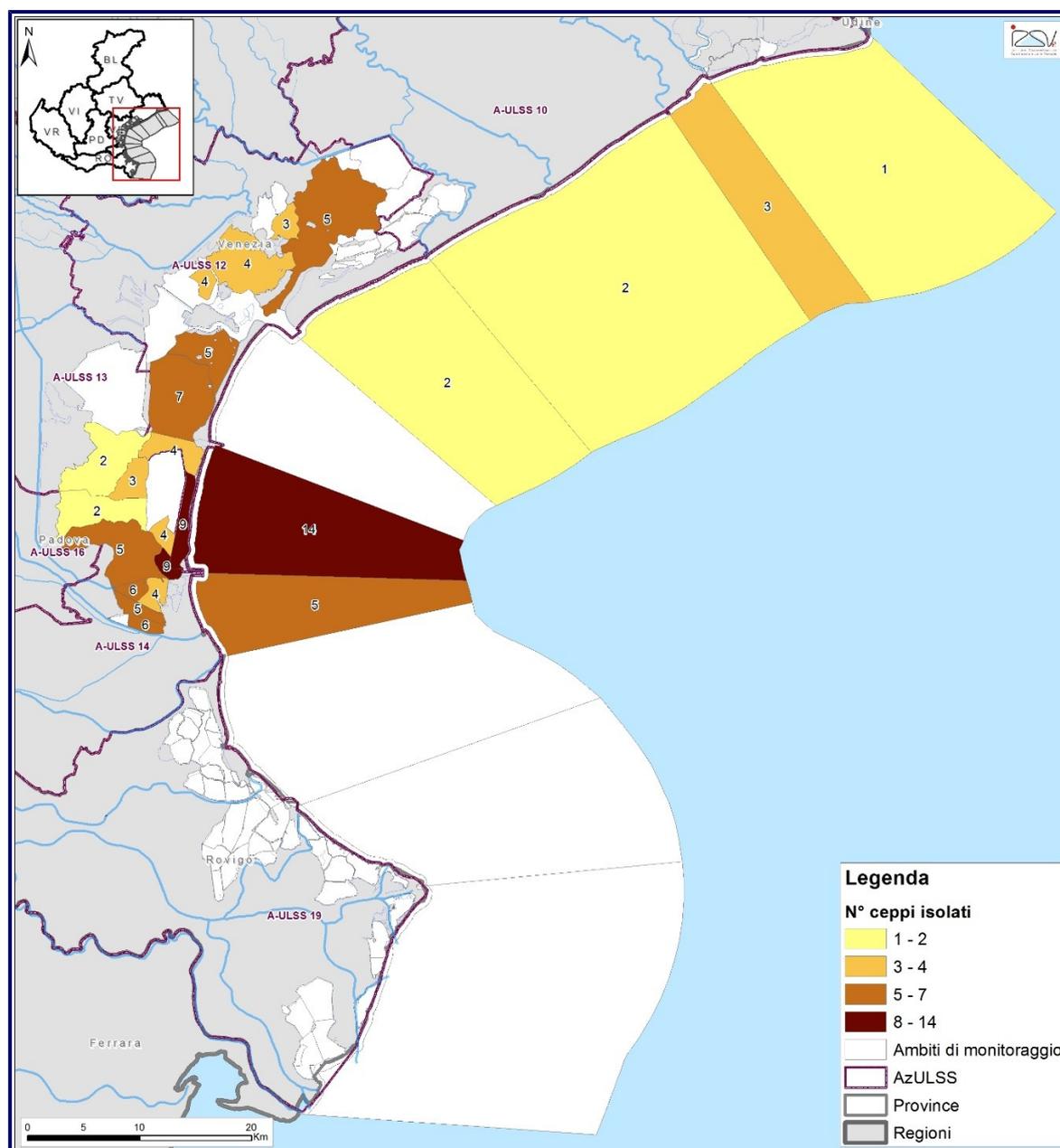


Figura 4.2: mappa rappresentante tutti gli ambiti di pesca lungo la zona della regione Veneto e i ceppi di *E. coli* isolati da ciascun ambito

I livelli maggiori di contaminazione da *E. coli* sono state riscontrate negli ambiti lagunari, in particolare nei seguenti: 14L007, 14L005 e 12L051.

4.2 Profili di Antibiotico-resistenza

4.2.1 Analisi Fenotipica dell'Antibiotico-resistenza

In Tabella 4.2 è riportato il numero di isolati sensibili per ambito, il numero dei resistenti sul totale coi rispettivi i profili di antibiotico resistenza.

AMBITO	N° CAMPIONI	PROFILO FENOTIPICO	AR/TOT isolati
12L018	1	SENSIBILE	2/3
	1	SULF	
	1	CIPRO-AC.NAL-TRIM	
12L046	4	SENSIBILE	1/5
	1	AMP-TET	
12L051	3	SENSIBILE	2/5
	1	AMP-CIPRO-AC.NAL-TET	
	1	SULF	
12L052	3	SENSIBILE	4/7
	1	AMP-SULF-TET-TRIM	
	1	TET	
	1	SULF	
	1	AMP-CLORA-CIPRO-SULF-TRIM	
12L053	2	SENSIBILE	2/4
	1	AMP-CIPRO-AC.NAL-SULF-TRIM	
	1	AMP-SULF-TET-TRIM	
12L054	5	SENSIBILE	5/10
	1	TET	
	1	AMP-CIPRO-AC.NAL-SULF-TET	
	1	AMP-SULF-TET-TRIM	
	1	CIPRO-AC.NAL	
	1	SULF	
12L056	3	SENSIBILE	1/4
	1	AMP-SULF	
12L057	1	CIPRO-AC.NAL	1/4
	3	SENSIBILE	
13L001	1	AMP-SULF-TET-TRIM	2/2
	1	CLORA-CIPRO-SULF	
14L001	1	SULF -TET	1/3
	2	SENSIBILE	
14L003	2	SENSIBILE	0/2
14L004	1	AMP-CIPRO-AC.NAL- TET	3/5
	1	AMP-CIPRO-AC.NAL-SULF	
	1	AMP-SULF	
14L005	1	SENSIBILE	3/4
	1	AMP	

	1	AMP-TRIM	
	1	SULF	
14L006	3	SENSIBILE	5/8
	1	CIPRO-AC.NAL	
	1	AMP-TET	
	3	SULF	
14L007	5	SENSIBILE	1/6
	1	SULF	
14L008	1	SENSIBILE	3/4
	1	AMP-CEFO-CIPRO-AC.NAL-SULF-TET	
	1	SULF	
	1	SULF	
14L009	4	SENSIBILE	1/5
	1	SULF	
14L010	1	SENSIBILE	5/6
	1	AMP	
	1	AMP-CEFO-CEFT-CIPRO-AC.NAL-SULF	
	1	AMP-CEFO-CEFT-SULF-TRIM	
	2	SULF	
10M001	1	AMP	1/1
10M002	2	SENSIBILE	1/3
	1	AMP-CEFO-CEFT-CIPRO-AC.NAL-SULF-TRIM	
10M003	2	SENSIBILE	0/2
12M001	2	SENSIBILE	0/2
12M003	12	SENSIBILE	2/14
	1	AMP-SULF-TRIM	
	1	CIPRO-AC.NAL	
14M001	2	SENSIBILE	3/5
	1	TET	
	1	SULF	
	1	CEFO-CIPRO-AC.NAL	
-	8	SENSIBILE	3/12
	1	AMP-CEFO-CEFT-CLORA-CIPRO-SULF-TET	
	1	SULF	
	1	SULF-TET	
	1	AMP- TRIM	

Tabella 4.2: Profili fenotipici di AR degli isolati di *E. coli* per ambito; nella colonna a destra è indicato il numero di ceppi AR sul totale dei ceppi isolati per ambito

Su 126 ceppi di *E.coli* isolati i risultati mostrano:

- 73 ceppi sensibili a tutti gli antibiotici testati
- 26 resistenti a un singola famiglia antibiotica
- 27 ceppi resistenti a più antibiotici (2 o più)

Sul totale di 126 isolati sono state riscontrate resistenze a quasi tutti gli antibiotici, a parte 4 (escludendo l'azitromicina) sui 14 presenti in piastra, ovvero: colistina, gentamicina, meropenem e tigeciclina.

La resistenza al sulfometoxazolo è risultata essere la più comune, essendo stata riscontrata in 34 isolati. Di questi quasi la metà (16) presentava la singola resistenza all'antibiotico, mentre gli altri possedevano anche ulteriori resistenze.

La resistenza al trimetoprim, è stata riscontrata in 12 isolati. In 9 casi è stata riscontrata la presenza della resistenza al trimetoprim unitamente a quella al sulfometoxazolo, molecola usata in associazione in farmacopea.

Insieme a quelle all'antibiotico sopracitato, le resistenze più comuni riscontrate sono state quelle all'ampicillina (25 isolati, 3 di questi presentavano la singola resistenza all'antibiotico); alla tetraciclina, (16 isolati di cui 3 presentavano la singola resistenza alla sostanza) e ai fluorochinoloni (ciprofloxacina ed ac. nalidixico, (17 isolati)). In 6 isolati sono state osservate le resistenze alle cefalosporine (cefotaxime e cefotazidime); mentre solo 3 di questi erano risultati resistenti al cloramfenicolo.

Nel caso dei ceppi in cui sono state riscontrate le resistenze a cefalosporine e cloramfenicolo non vi sono ceppi che presentano la resistenza alle singole sostanze, ma fanno parte di ceppi che possiedono profili di multiresistenza.

Gli isolati che presentavano multiresistenza, (a due o più famiglie antibiotiche), hanno mostrato dei profili comuni, raffigurati in Tabella 4.3.

PROFILI AR COMUNI	AMBITO	ID CAMPIONI	N° CAMPIONI
AMP-SUL	12L056	3606	2
	14L004	2887	
AMP-TET	12L046	1970	2
	14L006	2746	
AMP-TRIM	14I005	2592	2
	-	4053	
SUL-TET	14L001	740	2
	-	3696	
AMP-SUL-TET-TRIM	12L052	1635	4
	12L053	2666	
	12L054	1557	
	13L001	377	
AMP-CIPRO-AC.NAL-TET	12L051	2528	2
	14L004	1688	

Tabella 4.3: Profili di AR ricorrenti nello studio con il rispettivo ambito e ID del campione

4.1.2 Analisi Genotipica dell'Antibiotico-resistenza

Attraverso la tecnica PCR e l'utilizzo di primer specifici è stato possibile valutare la presenza dei geni specifici responsabili delle specifiche resistenze, i risultati sono descritti nelle Figure seguenti.

Fluorochinoloni

Le resistenze ai fluorochinoloni, nel presente caso ciprofloxacina ed ac. nalidixico sono solitamente determinate dalle mutazioni SNP in posizione 83 ed 87 nella catena amminoacidica codificata dal gene *gyrA*, e/o dalla presenza dei geni plasmidici *qnr*.

Infatti, se presenti si ha: in posizione 83 un residuo di leucina al posto di uno di serina ed in posizione 87 un residuo di asparagina al posto di uno di acido aspartico.

In Figura 4.3 è stato riportato l'allineamento delle sequenze proteiche dei campioni analizzati e le sostituzioni amminoacidiche nelle due posizioni chiave, ove presenti.

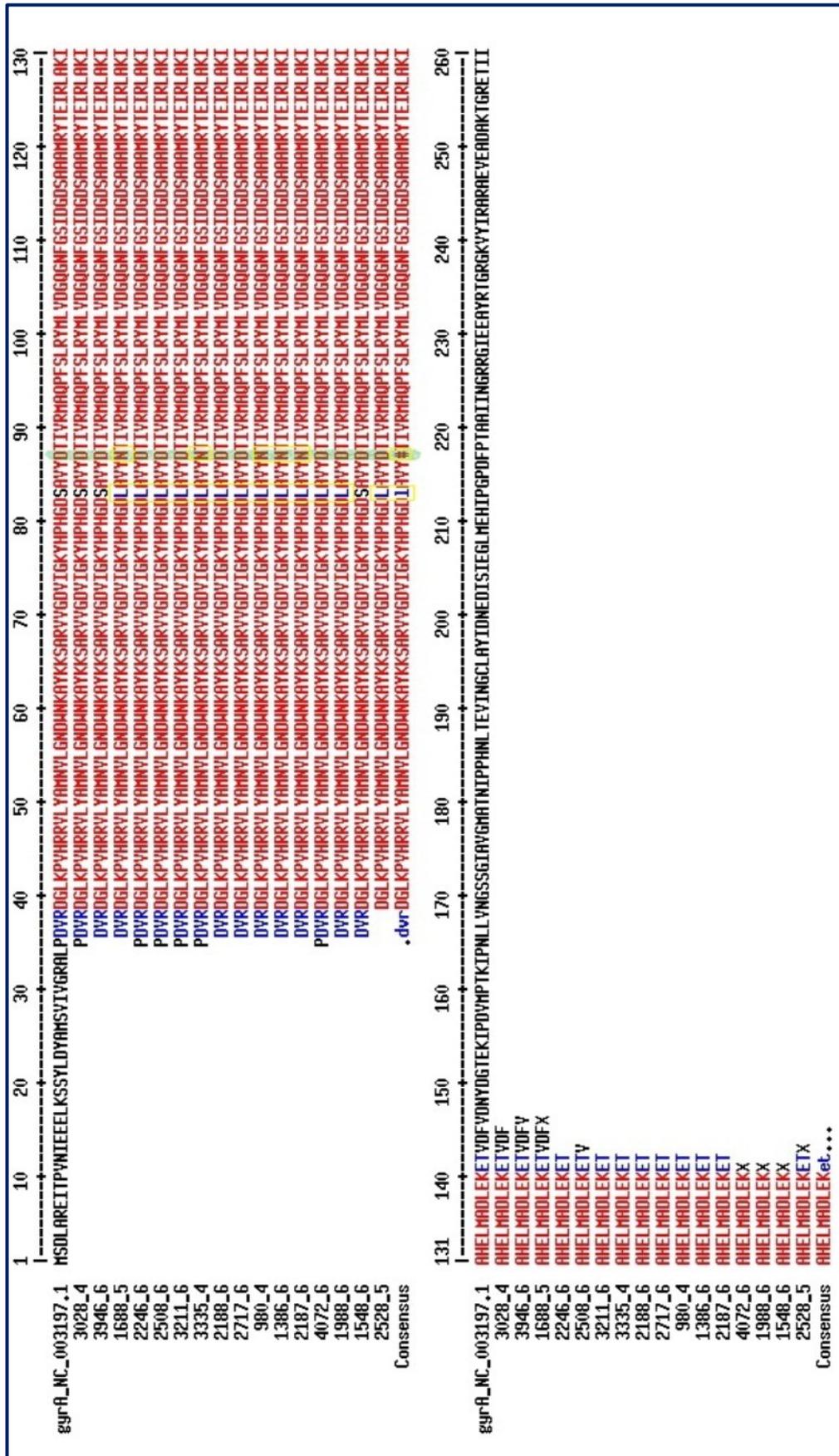


Figura 4.3: allineamento delle catene amminoacidiche della *gyrA* con MultiAlin, sulle colonne colorate nei riquadri gialli sono mostrate le posizioni in cui sono presenti le mutazioni

Dei 16 campioni, 5 presentavano entrambe le mutazioni, 8 possedevano solo la mutazione in posizione 83, 3 non presentavano alcuna mutazione.

Inoltre, 10 campioni su 16 hanno mostrato avere uno o più geni *qnr*.

Il gene riscontrato più comunemente è stato *qnrS*. Dei 13 isolati che presentavano una o entrambe le mutazioni oggetto di studio, solo 8 possedevano i geni *qnr*; come indicato in Tabella 4.4.

Ambito di monitoraggio	N° isolati	Classificazione della zona di mare ai sensi del Reg(CE) 854/04	CIPROFLOXACINA e AC. NALIDIXICO	
			<i>gyrA</i>	<i>qnr</i>
12L018	3335	B	Ser83 → Leu; Asp87 → Asn	NEG
12L051	2528	B	Ser83 → Leu	NEG
12L052	3946	B	Wild type	<i>qnrAm</i> , <i>qnrSm</i>
12L053	1988	B	Ser83 → Leu	<i>qnrSm</i>
12L054	1386	B	Ser83 → Leu; Asp87 → Asn	<i>qnrSm</i>
	2717	B	Ser83 → Leu	NEG
12L057	980	B	Ser83 → Leu; Asp87 → Asn	<i>qnrAm</i>
13L001	1548	B	Wild type	<i>qnrSm</i>
14L004	1688	B	Ser83 → Leu; Asp87 → Asn	<i>qnrBm</i> , <i>qnrSm</i>
	2188	B	Ser83 → Leu	<i>qnrSm</i>
14L006	2508	B	Ser83 → Leu	NEG
14L008	2187	B	Ser83 → Leu; Asp87 → Asn	<i>qnrBm</i> , <i>qnrSm</i>
14L010	2246	B	Ser83 → Leu	<i>qnrSm</i>
10M002	3340	A	Wild type	NEG
12M003	4072	A	Ser83 → Leu	NEG
14M001	3211	A	Ser83 → Leu	NEG
-	3028	B	Wild type	<i>qnrSm</i>

Tabella 4.4: Campioni divisi per ambito, relative sostituzioni amminoacidi che di *GyrA* e la presenza dei geni

qnr

Ampicillina

In Figura 4.4 è rappresentata la distribuzione degli isolati resistenti all'ampicillina tra gli ambiti di pesca oggetto di studio. Come si evince dalla mappa mentre il gene *bla_{TEM}* è diffusamente presente negli isolati positivi (17/25 isolati), indipendentemente dall'ambito di pesca, gli isolati recanti i geni *bla_{OXA}* (1/25 isolati) e *bla_{PSE}* (2/25) sono stati localizzati solo in due ambiti. Infine è stato possibile identificare un ambito in cui tutti gli isolati fenotipicamente resistenti non recavano alcuno dei tre geni di resistenza ricercati.

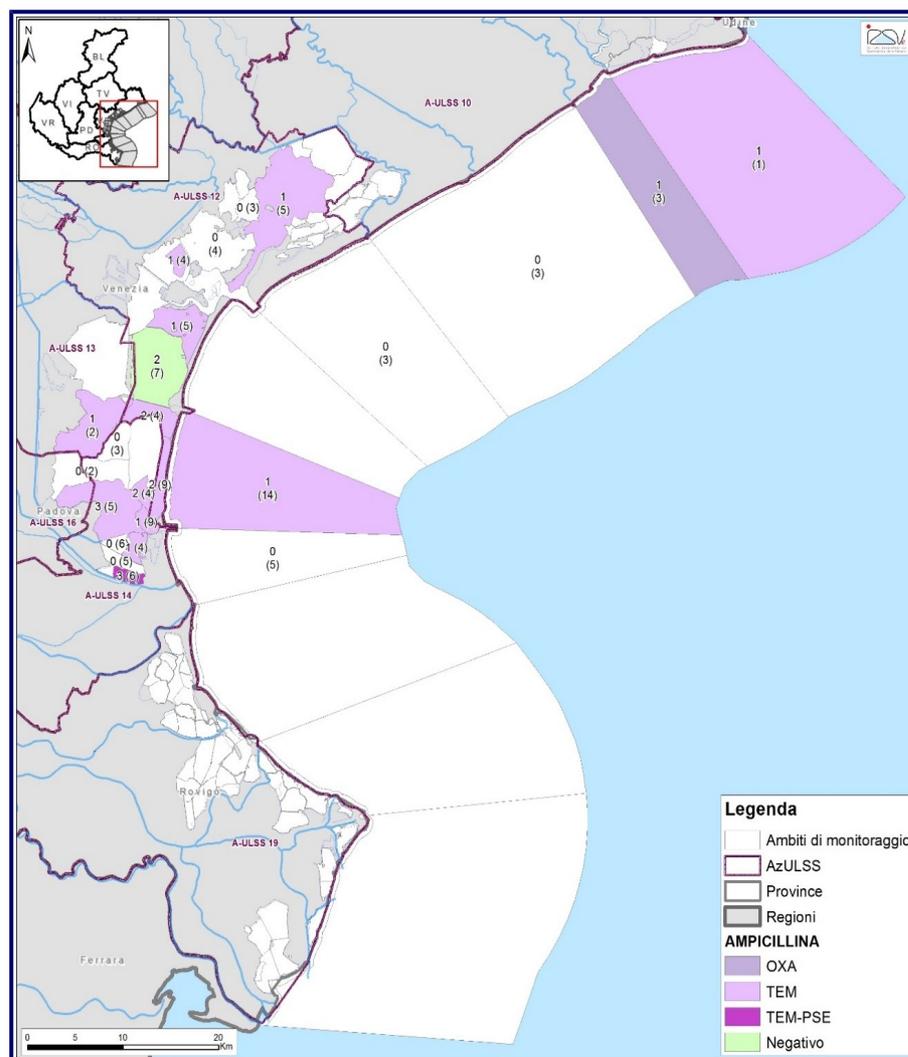


Figura 4.4: Mappa di resistenza all'Ampicillina, numero dei ceppi positivi in MIC sui totali isolati per ambito (numero tra parentesi)

La resistenza per questo antibiotico è diffusa e non si ritrova solo negli ambiti lagunari, ma anche in mare aperto, anche in ambiti distanti dalla laguna. La mappa mostra la distribuzione dei geni presenti in ogni ambito, i negativi sono presentati solo nel caso in cui tutti i ceppi isolati dall'ambito considerato siano risultati negativi all'analisi molecolare. In Tabella 4.5 sono mostrati gli isolati divisi per ambito con i rispettivi risultati ottenuti in PCR.

Ambito di monitoraggio	N° isolati	Classificazione della zona di mare ai sensi del Reg(CE) 854/04	AMPICILLINA
12L046	1	B	bla _{TEM}
12L051	1	B	bla _{TEM}
12L052	2	B	NEG
12L053	1	B	NEG
	1	B	bla _{TEM}
12L054	2	B	bla _{TEM}
12L056	1	B	bla _{TEM}
13L001	1	B	bla _{TEM}
14L004	1	B	NEG
	2	B	bla _{TEM}
14L005	2	B	bla _{TEM}
14L006	1	B	bla _{TEM}
14L008	1	B	bla _{TEM}
14L010	2	B	bla _{TEM}
	1	B	bla _{PSE}
10M001	1	A	bla _{TEM}
10M002	1	A	bla _{OXA}
12M003	1	A	bla _{TEM}
-	1	B	bla _{PSE}
	1	-	NEG

Tabella 4.5: Campioni divisi per ambito con i rispettivi risultati ottenuti in analisi in PCR

Sulfamidici

In Figura 4.5 è mostrata la distribuzione delle resistenze nei diversi ambiti.

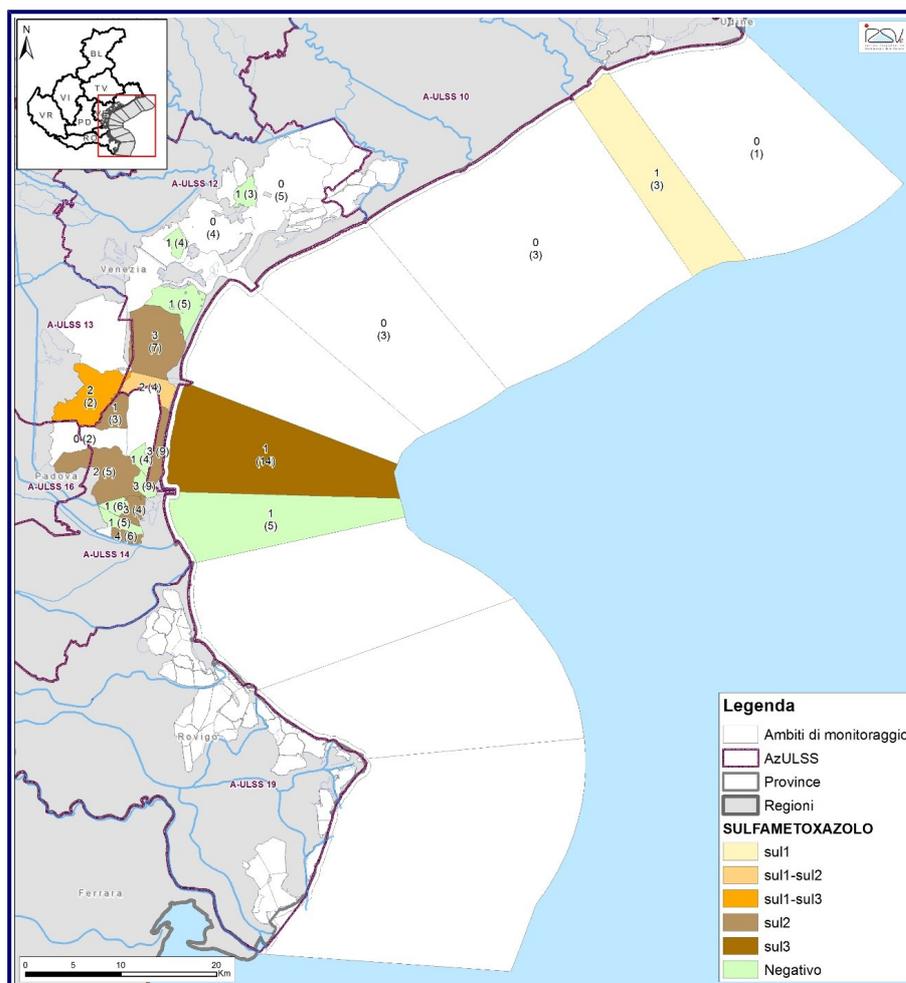


Figura 4.5: Mappa di resistenza al Sulfometoxazolo, numero dei ceppi positivi in MIC sui totali isolati per ambito (numero tra parentesi)

Nonostante parte dei campioni sia risultata negativa all'analisi molecolare, vi sono molti isolati che mostrano uno o più geni di resistenza a questa classe di antibiotici. Gli isolati risultati positivi si distribuivano in modo disomogeneo tra la laguna e il mare con maggiore concentrazione negli ambiti lagunari. In Tabella 4.5 sono mostrati i risultati dell'analisi molecolare relativi agli isolati, suddivisi per ambito.

Ambito di monitoraggio	N° isolati	Classificazione della zona di mare ai sensi del Reg(CE) 854/04	SULFAMETOXAZOLO
12L018	1	B	NEG
12L051	1	B	NEG
12L052	2	B	sul2
	1	B	NEG
12L053	1	B	sul2
	1	B	sul1
12L054	2	B	sul2
	1	B	NEG
12L056	1	B	NEG
13L001	1	B	sul1
	1	B	sul3
14L001	1	B	sul2
14L004	1	B	sul2
	1	B	NEG
14L005	1	B	NEG
14L006	3	B	NEG
14L007	1	B	NEG
14L008	1	B	sul2
	2	B	NEG
14L009	1	B	NEG
14L010	3	B	sul2
	1	B	NEG
10M002	1	A	sul1
12M003	1	A	sul3
14M001	1	A	NEG
-	1	B	sul2
	1	B	sul3

Tabella 4.5: risultati dell'analisi molecolare per il sulfometoxazolo, gli isolati sono divisi per ambito

Dai risultati dell'analisi molecolare emerge che 16 isolati su 34 che fenotipicamente risultavano resistenti erano invece negativi all'analisi molecolare. Il gene ritrovato più frequentemente è stato *sul2*, presente in 12 isolati. Come mostrato in Tabella 4.5 in un numero minore di campioni sono stati identificati, anche gli altri due geni oggetto di studio: *sul1* (3 isolati), e *sul3* (3 isolati).

Tetracicline

Per tutti i ceppi risultati fenotipicamente resistenti è stato possibile identificare il corrispettivo gene di resistenza. La mappa riportata in Figura 4.6 mostra la distribuzione nei vari ambiti degli isolati recanti i geni di resistenza ricercati. In uno degli ambiti è stata riscontrata la

presenza simultanea di due geni di resistenza (*tetA-tetB*).

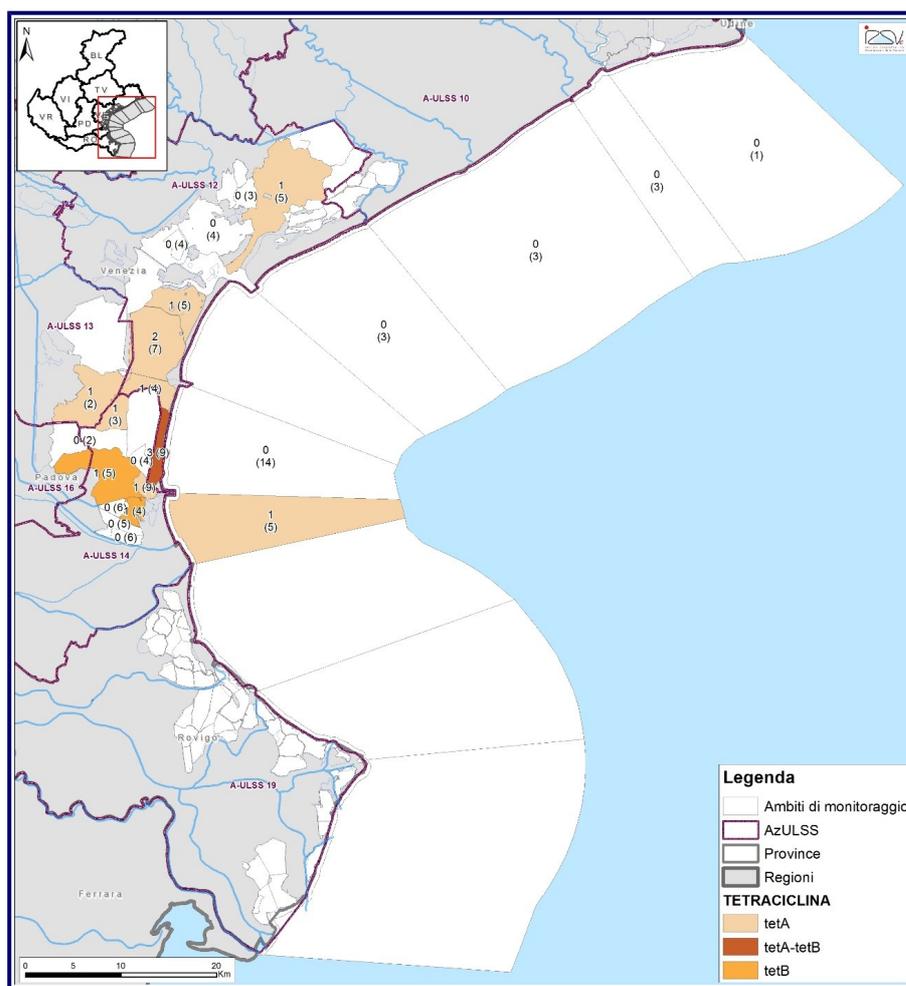


Figura 4.6: Mappa di resistenza alla Tetraciclina, numero dei ceppi positivi in MIC sui totali isolati per ambito (numero tra parentesi)

Le aree in cui sono stati isolati più frequentemente isolati portatori di geni per la resistenza alla tetraciclina sono risultate quelle lagunari, in aggiunta è stata identificata un'area di mare aperto con isolati positivi. In Tabella 4.6 sono mostrati gli esiti dell'analisi molecolare, i ceppi sono divisi per ambito di pesca. Il gene ritrovato più frequentemente è stato *tetA* (10 isolati), seguito da *tetB* (4 isolati).

Ambito di monitoraggio	N° isolati	Classificazione della zona di mare ai sensi del Reg(CE) 854/04	TETRACICLINA
12L046	1	B	tetA
12L051	1	B	tetA
12L052	2	B	tetA
12L053	1	B	tetA
12L054	2	B	tetB
	1	B	tetA
13L001	1	B	tetA
14L001	1	B	tetA
14L004	1	B	tetB
14L006	1	B	tetA
14L008	1	B	tetB
14M001	1	A	tetA
-	1	B	tetA
	1	B	tetB

Tabella 4.6: risultati dell'analisi molecolare per la tetraciclina, gli isolati sono divisi per ambito

Trimetoprim

In Figura 4.7 è mostrata la distribuzione delle resistenze al trimetoprim negli ambiti di pesca considerati.

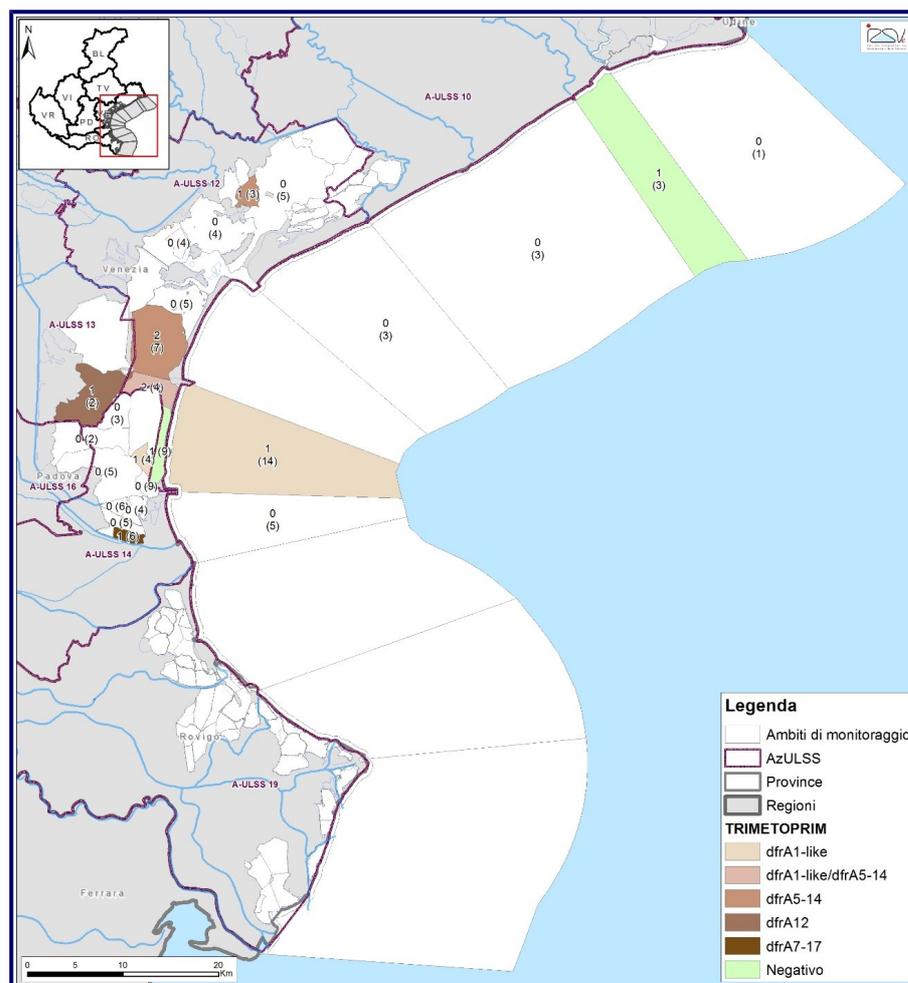


Figura 4.7: Mappa di resistenza al Trimetoprim, numero dei ceppi positivi in MIC sui totali isolati per ambito (numero tra parentesi)

Su un totale di 12 campioni positivi per l'analisi fenotipica 3 non hanno mostrato positività per i geni ricercati. Questi ultimi sono stati localizzati in tre diverse aree di pesca. .

In Tabella 4.7 sono mostrati i risultati dell'analisi molecolare.

I geni di resistenza più comunemente riscontrati sono stati *dfrA5-14* (3 isolati) e *dfrA1-like* (3 isolati). Altri geni di resistenza specifici ritrovati sono stati *dfrA7-17* (1 isolato) e *dfrA12* (1 isolato).

Ambito di monitoraggio	N° Isolati	Classificazione della zona di mare ai sensi del Reg(CE) 854/04	TRIMETOPRIM
12L018	1	B	dfrA5-14
12L052	2	B	dfrA5-14
12L053	1	B	dfrA1-like
	1	B	dfrA5-14
12L054	1	B	NEG
13L001	1	B	dfrA12
14L005	1	B	dfrA1-like
14L010	1	B	dfrA7-17
10M002	1	A	NEG
12M003	1	A	dfrA1-like
-	1	-	NEG

Tabella 4.7: risultati dell'analisi molecolare per il trimetoprim, gli isolati sono divisi per ambito

Cefalosporine

Fanno parte degli antibiotici β -lattamici ad ampio spettro nel presente studio sono stati presi in considerazione le molecole cefotaxime e cefotazidime. In Tabella 4.8 sono mostrati i risultati dell'analisi molecolare.

Ambito di monitoraggio	N° Isolati	Classificazione della zona di mare ai sensi del Reg(CE) 854/04	CEFOTAXIME-CEFOTAZIDIME
14L008	1	B	NEG
14L010	2	B	ctx-MU
10M002	1	A	NEG
14M001	1	A	NEG
-	1	B	ctx-MU

Tabella 4.8: risultati dell'analisi molecolare per le cefalosporine, gli isolati sono divisi per ambito

Un totale di 3 isolati avevano la presenza per uno di questi, i 3 restanti sono risultati negativi ai geni di resistenza testati.

Cloramfenicolo

Un totale di 3 isolati è stato identificato come positivo al cloramfenicolo. In Tabella 4.9 sono rappresentati gli isolati con i rispettivi geni di resistenza.

Ambito di monitoraggio	N° Isolati	Classificazione della zona di mare ai sensi del Reg(CE) 854/04	CLORAMFENICOLO
12L052	1	B	cmlA1
13L001	1	B	cmlA1
-	1	B	floR

Tabella 4.9: risultati dell'analisi molecolare per cloramfenicolo, gli isolati sono divisi per ambito

Con l'obiettivo di investigare l'origine degli isolati e risalire alle fonti di contaminazione fecale ambientale, si è proceduto con l'identificazione di geni specifici che potessero ricondurre gli isolati oggetto di studio alla specie animale di appartenenza, secondo il modello del *source tracking*

4.3 Source Tracking

Un totale di 8 ceppi di *E. coli* su 126 testati sono risultati pollo derivanti da pollo. Inoltre, come è possibile vedere in Figura 4.8, gli ambiti in cui si sono identificati isolati associati al pollo sono tutti appartenenti alla zona lagunare e contigui, (nei riquadri rossi).

In Tabella 4.10 sono presenti i ceppi con i rispettivi ambiti.

AMBITO	N° CAMPIONI ORIGINE POLLO	CAMPIONE
12L051	2	2528, 3882
12L052	1	2175
12L054	1	2914
13L001	1	1548
14L008	1	3294
14L010	2	2246, 3739

Tabella 4.10: ambito di pesca, e numero dei campioni identificati come provenienti dal pollo

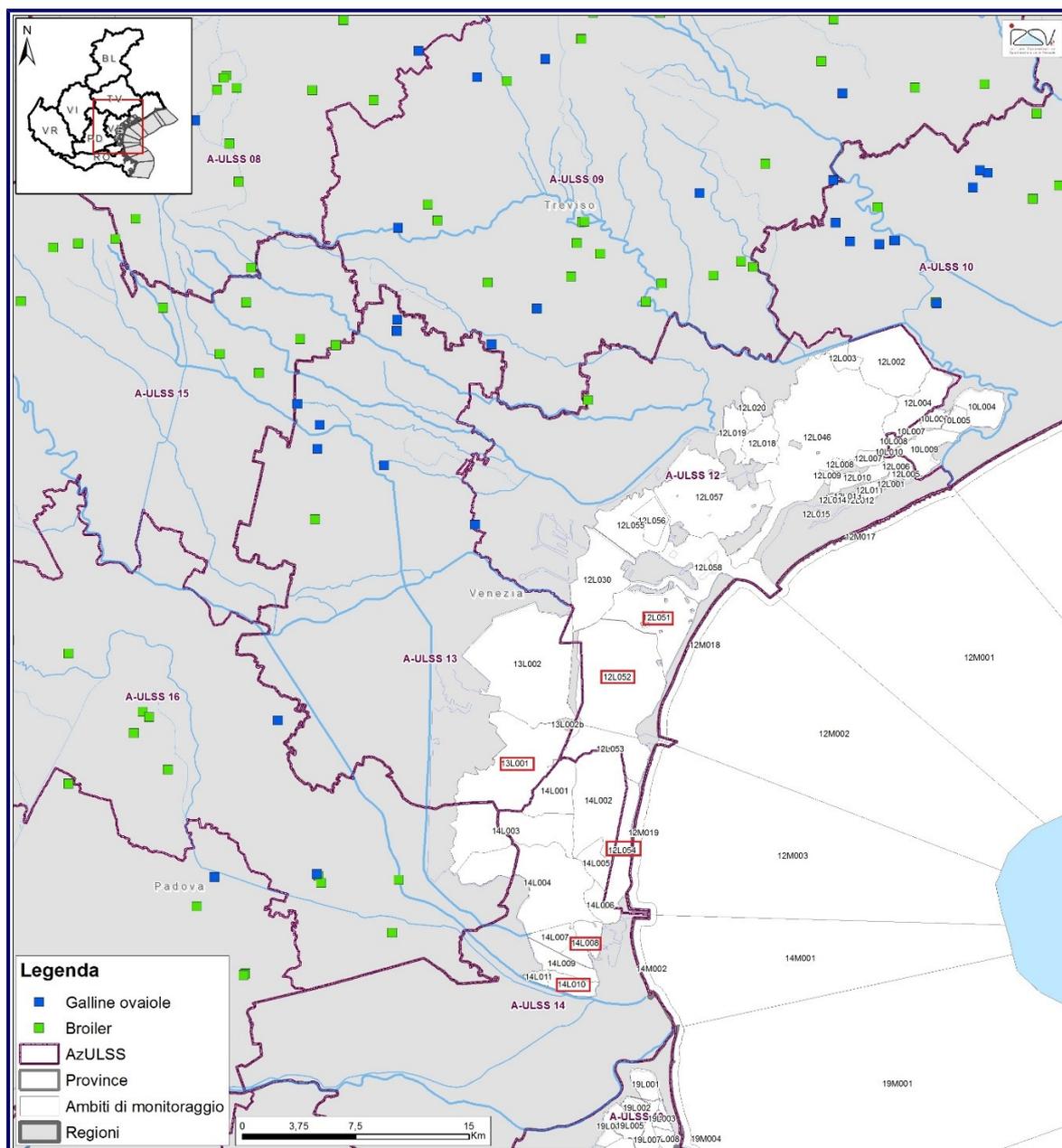


Figura 4.8: mappa rappresentante gli allevamenti di polli e galline ovaiole in Veneto, i riquadri rossi sottolineano gli ambiti da cui provengono i ceppi identificati

Degli 8 ceppi risultati provenienti dal pollo, 3 di questi sono risultati multi-resistenti, dalle analisi svolte in precedenza, 3 resistenti solo al sulfometoxazolo, mentre gli ultimi due non possedevano alcuna resistenza.

5. DISCUSSIONE

Il presente lavoro di tesi ha riguardato la caratterizzazione delle resistenze agli antibiotici negli ambiti di pesca della Regione del Veneto, utilizzando il batterio *Escherichia coli* isolato da molluschi (cozze e vongole) quale organismo indicatore e l'individuazione delle relative fonti di contaminazione, ponendo particolare attenzione alla fonte avicola dal momento che la zona considerata risulta particolarmente vocata a tale produzione zootecnica.

In 126 dei 196 campioni di molluschi esaminati (64.8%) è stato possibile quantificare *E. coli*, dal momento che il livello di contaminazione stimato risultava superiore a 18 MPN/100g (limite inferiore di rilevabilità del microrganismo secondo il metodo analitico impiegato). Per i rimanenti 70 campioni analizzati non è stato isolato *E. coli*.

Il livello di contaminazione per stabilire la conformità del campione stesso varia in funzione dello scopo del campionamento e delle caratteristiche dell'ambito in cui il campione è stato prelevato.

I campioni oggetto di analisi sono stati prelevati in differenti contesti e la normativa di riferimento sulla base della quale si definiscono i livelli soglia di contaminazione, è altrettanto diversa.

In particolare, per i campioni prelevati nell'ambito del monitoraggio delle aree di pesca la normativa relativa (Reg. (CE) n° 854/2004) stabilisce criteri differenti in base alla classificazione dell'area stessa come area A, B, o C. Il criterio da applicare invece al prodotto prelevato al commercio è definito nel Reg. (CE) n° 2073/2005.

Indipendentemente dalla normativa di riferimento 6 dei 196 (3%) campioni prelevati sono risultati non conformi per superamento dei limiti relativi alla presenza di *E. coli* su 100g di prodotto.

In generale, dunque, il livello di contaminazione da *E. coli*, quale potenziale indicatore di contaminazione fecale è risultato piuttosto contenuto. Dal momento che nell'ambito della legislazione europea, la qualità microbiologica dei molluschi bivalvi viene stabilita sulla base del livello di contaminazione di questo microrganismo indicatore, i dati raccolti permettono di confermare che la qualità microbiologica dei molluschi (cozze e vongole) allevati e raccolti negli ambiti di pesca considerati risulta soddisfacente. Dal momento che i molluschi possono essere consumati crudi o poco cotti, aspetto che contribuisce ad incrementare il rischio potenziale derivante da tali alimenti per il consumatore (Campos et al., 2017), il basso livello di contaminazione da *E. coli* rilevato costituisce un fattore estremamente importante per la

salute pubblica.

Va tuttavia sottolineato che mentre per alcuni patogeni come ad esempio *Salmonella* (Strubbia et al., 2016) o *Arcobacter* (Leoni et al., 2016), la loro presenza risulta associata a elevati livelli di contaminazioni da *E. coli*, per altri microrganismi patogeni, quali ad esempio gli agenti virali, la letteratura scientifica non ha dimostrato associazione tra la presenza e il livello di contaminazione da *E. coli* e il patogeno stesso (Winterbourn et al., 2016; Campos et al., 2017). La mancanza di correlazione tra gli *E. coli* indicatori e gli agenti virali, quali ad esempio il norovirus è imputabile a diversi fattori, tra cui la loro diversa resistenza ambientale. A tal proposito gli *E. coli* sembrano essere meno resistenti rispetto ad esempio al norovirus (Strubbia et al., 2016). Pertanto il monitoraggio attualmente in corso in Europa per i molluschi bivalvi, basato sulla valutazione periodica della contaminazione da *E. coli* nei molluschi prelevati nei diversi ambiti e nel prodotto finito pronto per il consumo, potrebbe non essere indicativo della presenza o meno nel prodotto di alcuni patogeni enterici.

Analizzando in dettaglio gli ambiti dove sono stati riscontrati i livelli di contaminazione da *E. coli* più elevati, è evidente che gli indicatori di contaminazione fecale risultano superiori nelle zone lagunari rispetto al mare aperto.

Uno studio recente (Campos et al., 2017) ha messo in evidenza che il livello di contaminazione da *E. coli* delle acque costiere è strettamente correlato al livello di piovosità. Tale fenomeno è da attribuire all'aumento dei flussi fluviali che si verificano in seguito ad abbondanti piogge, condizione che quindi può determinare un incremento del trasferimento di contaminanti dalle valli fluviali al mare. Le evidenze scientifiche a tal proposito hanno dimostrato che le contaminazioni microbiche indotte dalle precipitazioni possono persistere nei molluschi fino ad una settimana dall'evento piovoso. Un altro fattore molto importante che può influenzare il livello di contaminazione da *E. coli* è la temperatura dell'acqua, e, in seguito all'incremento della temperatura dell'acqua, infatti, si può assistere ad un aumento della proliferazione di *E. coli* (Jin et al., 2016). È importante tenere in considerazione tali aspetti quando vengono interpretati i dati di contaminazione microbiologica da batteri indicatori. Nell'ambiente lagunare la temperatura dell'acqua, come le possibili fonti di contaminazione, dati ad esempio dall'afflusso di acque fluviali, e dal superiore livello di urbanizzazione delle aree limitrofe, con conseguente incremento degli scarichi di origine urbana e industriale, possono spiegare i livelli di contaminazione da *E. coli* superiori rispetto ai dati riscontrati in mare aperto.

Per quanto riguarda la diffusione delle resistenze agli antibiotici negli ambiti di pesca considerati i risultati evidenziano una disomogenea distribuzione delle antibiotico-resistenze.

Come nel caso della contaminazione fecale, i dati ottenuti, mostrano che anche le antibiotico-resistenze si concentrano prevalentemente negli ambiti lagunari. Certamente la tipologia ambientale di questi ambiti, caratterizzati da minore presenza di correnti marine (Stange et al., 2016; Liu et al., 2016; Gouromelon et al., 2007) può rappresentare un fattore di rischio per la concentrazione di determinanti (biologici o chimici) di antibiotico resistenze, derivanti probabilmente dalle zone di dilavamento idrico interne al territorio oggetto di studio. La concentrazione in laguna, più che in mare aperto, di batteri resistenti indicatori del fenomeno dell'antibiotico resistenza, può essere attribuita anche alla pressione selettiva esercitata in questo ambiente da residui di farmaci e/o di comunità microbiche antibiotico resistenti derivanti dalle vicine aree ad elevata attività antropica, in cui sono presenti presidi ospedalieri, industrie chimico-farmaceutiche e allevamenti di animali da reddito e impianti di acquacoltura, note per influenzare la persistenza di batteri antibiotico resistenti o determinanti genetici di antibiotico resistenza in ambiente acquatico (Di Cesare et al. 2015; Campos et al., 2013; Cheng et al., 2013; Suzuki e Hoa, 2012; Serrano Hernandez, 2005). I farmaci, inclusi gli antibiotici, infatti, sono eliminati solo parzialmente dagli impianti di depurazione con la conseguente possibilità per i residui di raggiungere le acque superficiali e quelle sotterranee dove questi possono interagire con le comunità microbiche ivi residenti (Ng et al., 1999; Hirsch et al., 1999; Czekalski et al., 2012). Il tasso di diffusione dei residui di antibiotici nell'ambiente è stato quantificato in vari ambienti acquatici e impianti per il trattamento delle acque e la correlazione tra le attività umane quali l'urbanizzazione e l'allevamento e la quantità di residui rilasciati nell'ambiente è stato ampiamente dimostrato (Benami et al., 2016; McArdell et al., 2003).

Tuttavia, la conoscenza dei livelli di abbondanza di batteri antibiotico-resistenti e della loro distribuzione spazio-temporale negli ambienti acquatici è ancora molto scarsa e questo contribuisce a renderne difficile la valutazione del rischio per i consumatori.

A sostegno delle precedenti considerazioni i risultati derivanti dagli esperimenti di *source tracking* hanno permesso di collocare gli isolati di *E. coli* di origine avicola nei soli ambiti di pesca a pertinenza lagunare. Detti isolati sono risultati tutti resistenti ad uno o più antibiotici suggerendo la possibilità per gli allevamenti avicoli che insistono nei territori confinanti di essere configurati quali "hot-spot" di contaminazione fecale nonché prodromi della diffusione di determinanti di antibiotico resistenza nell'ambiente.

I farmaci ad azione battericida o batteriostatica attualmente in uso nella farmacopea umana e in quella veterinaria, che possono dunque essere rilasciati nell'ambiente, sono raggruppabili nelle seguenti tre categorie, sulla base del loro meccanismo di azione: antibiotici che agiscono

contro la sintesi della membrana e della parete batterica (β -lattamici), antibiotici che interferiscono con il corretto svolgimento della sintesi proteica (tetracicline), e antibiotici che interferiscono con la sintesi degli acidi nucleici (fluorochinoloni) (Sengupta et al., 2013). Questi gruppi di antibiotici sono considerati tra i principali responsabili dell'emergenza e del mantenimento di nuove resistenze tra le comunità batteriche naturali e rappresentano un rischio per la salute umana (McArdell et al., 2003).

In linea generale, i dati raccolti permettono di confermare che i livelli di resistenza tra i ceppi di *E. coli* isolati dai campioni di vongole e cozze sono piuttosto contenuti. A tal proposito merita di essere ribadito che 57,9% dei ceppi considerati è risultato pansuscettibile e il 20,6% resistente ad un solo antibiotico. Tuttavia, è importante sottolineare che i risultati del presente studio hanno mostrato la presenza di gruppi di geni coinvolti nelle resistenze agli antibiotici clinicamente rilevanti negli isolati considerati. Questo è in accordo con quanto riportato in studi precedenti che si erano focalizzati su comunità microbiche di ambienti acquatici (D'Costa et al., 2006; Pruden et al., 2006). Questi ambienti diventano di grande interesse per la salute pubblica per il fatto che per le loro caratteristiche chimico-fisiche favoriscono gli scambi genetici orizzontali tra microrganismi promuovendo la rapida diffusione di suddette resistenze potenzialmente anche a batteri patogeni per l'uomo (Conte et al., 2016; Lupo et al., 2012).

Inoltre l'ambiente acquatico, e in particolare quello marino, conferiscono stabilità chimico-fisica ai residui dei farmaci grazie all'interazione che gli stessi possono stabilire con i sedimenti ivi sospesi e in cui l'accumulo può permanere per molto tempo (Clements et al., 2015; Gao et al., 2012; Heuer et al., 2009). Nel caso delle resistenze riscontrate ai fluorochinoloni quasi tutti gli isolati analizzati presentavano una o entrambe le mutazioni del gene *gyrA*, di origine cromosomica, spesso associate alla presenza uno o più geni *qnr*, di origine plasmidica e potenzialmente trasferibile ad altri microrganismi indipendentemente dalla natura chimico-fisica dell'ambiente.

Oltre alle resistenze alle classi antibiotiche di primario impatto per la salute umana, i risultati del presente studio hanno evidenziato che la resistenza più comunemente riscontrata è stata quella al sulfometoxazolo, un antibiotico utilizzato principalmente in ambito umano. Queste resistenze sono di grande interesse per la salute pubblica per il fatto che alcuni dei geni in esse coinvolti tra cui *sul1*, *sul2* e *sul3*, oggetto del presente studio, sono noti persistere nell'ambiente anche più a lungo dei residui derivanti dal sulfometoxazolo stesso (Fu et al., 2011; Akiyama e Savin, 2010). In associazione alla resistenza al sulfometoxazolo è stato documentata la resistenza al trimetoprim. Questo dato è in accordo con quanto osservato in

altri studi (Hu et al., 2016; Suhartono et al., 2016; Akiyama e Savin, 2010) ed è spiegabile per il fatto che i due antibiotici sono utilizzati in combinazione a scopi terapeutici (Kemper, 2008) avvalorando l'ipotesi di una pressione selettiva nell'ambiente mediata da residui di origine nosocomiale veicolati in ambiente dalle acque reflue. (Carroll et al., 2009).

Tuttavia alcuni degli isolati analizzati, pur presentando resistenza al sulfometoxazolo non hanno mostrato evidenza della presenza dei geni di resistenza testati. In questo caso è possibile ipotizzare l'utilizzo da parte del microrganismo di meccanismi aspecifici di resistenza, quali l'espressione di pompe di efflusso (Mao et al., 2015; Lupo et al., 2012; Allen et al., 2010). Questi sistemi permettono ai microrganismi di sopravvivere in ambienti contaminati da vari agenti antimicrobici, tra i quali antibiotici e metalli pesanti, e sono ascritti tra i meccanismi che favoriscono l'acquisizione di stabili co-resistenze (resistenze contemporanee a più agenti mediata da un medesimo meccanismo molecolare) (Conficoni et al. 2016).

La diffusione di batteri resistenti agli antibiotici negli ambienti acquatici è un fenomeno in crescente aumento (Corno et al., 2014; Cabello, 2006), e di conseguenza e in aumento il rischio di sviluppo di resistenze agli antibiotici clinicamente importanti in questi ambienti nel prossimo futuro.

Il presente studio rappresenta uno dei primi tentativi di studio della diffusione delle antibiotico resistenze in ambiente marino nella Regione del Veneto.

La valutazione della diffusione dei determinanti di antibiotico resistenza nelle comunità microbiche naturali, infatti, è metodologicamente molto complessa e, ad oggi, estremamente dispendiosa. Allo stesso modo valutare la concentrazione sub letale complessiva di antibiotici a cui una comunità batterica naturale è esposta risulta pressoché impossibile, dal momento che le diverse specie batteriche facenti parte di una comunità e le relative sottospecie possono avere sensibilità diverse a diversi antibiotici. Inoltre, la sensibilità delle diverse specie che compongono una comunità può cambiare nel tempo e nello spazio a seguito della modifica dei parametri ecologici, della composizione della comunità, e della sua storia evolutiva. In questo contesto i risultati ottenuti dal presente studio permettono di concludere che il monitoraggio di batteri indicatori quale *E. coli*, può essere un valido strumento per approfondire l'esposizione delle comunità microbiche lagunari e marittime a pressioni selettive che selezionano positivamente batteri antibiotico resistenti e i relativi determinanti genetici, fornendo dati utili per effettuare puntuali valutazioni del rischio di trasferimento di batteri antibiotico resistenti dall'ambiente all'uomo.

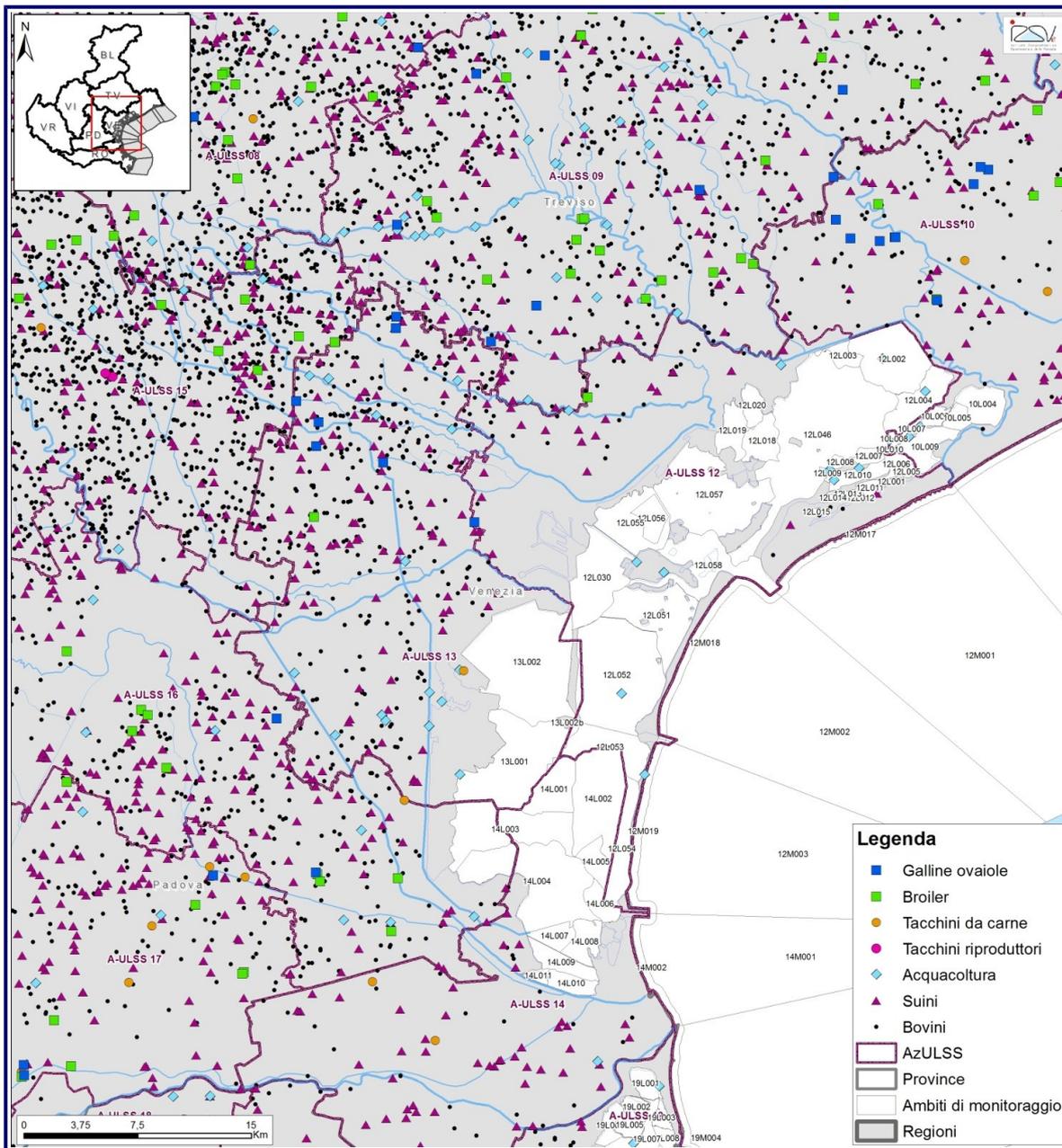


Figura 5.2: Distribuzione dei diversi allevamenti in Veneto

Nell'immagine sovrastante sono presentate anche gli allevamenti di acquacoltura insieme ai diversi allevamenti presenti vicino alla costa e nell'entroterra Veneto che possono aver contribuito alla disseminazione delle resistenze.

Non si è stati in grado di ottenere risultati per l'identificazione di altre specie, ma grazie alle informazioni sull'utilizzo dei diversi antibiotici in ambito animale e umano ottenute da Kemper (2008) è possibile supporre la provenienza del ceppo in base all'antibiotico trovato e in base alla zona in cui il ceppo stesso è stato isolato.

Molti autori hanno proposto tecniche alternative con cui sono stati ottenuti buoni risultati, tra

cui il fingerprinting, o lo sviluppo di PCR real-time ed end-point per geni specie specifici sempre seguiti dal sequenziamento, o lo studio del ribotipo partendo dai ceppi di origine nota, per poi confrontare il profilo ottenuto con i campioni raccolti (Mauffret et al., 2013; Scott et al., 2003; Dombek et al., 2000).

L'analisi di *source tracking*, condotta nell'ambito del presente studio di tesi, rappresenta uno dei primi tentativi di indagare le potenziali fonti di contaminazione fecale nelle acque del territorio regionale. Come è possibile evidenziare dalla mappa sopra riportata la concentrazione di allevamenti con differenti indirizzo zootecnico è molto importante nel territorio regionale, senza considerare le potenziali fonti di contaminazione di origine umana, ad esempio le aziende ospedaliere e non da ultimo le industrie. Ne consegue che le potenziali fonti di contaminazione fecali sono innumerevoli, pertanto dovrebbe essere promosso lo sviluppo della disciplina del *source tracking*, ad esempio investendo nell'identificazione di efficaci metodi analitici. I dati forniti da tali approfondimenti risultano infatti essenziali per identificare delle potenziali cause di situazioni di non conformità, condizione essenziale per gestire la problematica e per trovarne definitiva risoluzione. Tuttavia, le notevoli difficoltà, rilevate nell'ambito del presente studio di tesi per quanto riguarda la parte relativa allo studio di *source tracking*, dimostrano che deve essere ancora fatto del lavoro al fine di sviluppare protocolli standardizzati che permettano di ottenere dati di qualità relativi alle potenziali fonti di contaminazione e soprattutto dati che possano essere comparabili.

Questo studio rappresenta un valido esempio di come a partire dai dati che vengono raccolti nell'ambito dell'attività routinaria di sorveglianza dei molluschi bivalvi, realizzata secondo gli approcci previsti dalla normativa vigente, sia possibile condurre approfondimenti che permettano di ottenere dati importanti per valutare l'effettiva qualità microbiologica dei molluschi bivalvi e del potenziale rischio che questi possono rappresentare per i consumatori. I dati raccolti permettono di confermare che nell'ottica della razionalizzazione delle risorse si potrebbe ipotizzare di rimodulare i piani di campionamento periodico, concentrando le frequenze dei campionamenti in aree più a rischio, quali possono essere gli ambienti lagunari, che sono anche le aree che sono di particolare interesse in termini di antibiotico resistenza.

Il modello di monitoraggio integrato proposto nel presente studio, che a partire da isolati di *E. coli*, ha permesso di ottenere dati di qualità microbiologica dei molluschi, livelli di resistenza e caratterizzazione dei relativi determinanti e studio delle potenziali fonti, rappresenta un valido esempio di come utilizzando un unico batterio indicatore come *E. coli* è possibile raccogliere dati di estrema rilevanza per ambiti differenti della salute pubblica.

6. CONCLUSIONI

Il presente lavoro era finalizzato a ottenere indicazioni sul potenziale livello di contaminazione fecale dei molluschi (cozze e vongole) allevate e pescate nella costa veneta, indagare i livelli e i profili di antibiotico resistenza e infine indagare la fonte di contaminazione fecale.

Nell'ambito del presente studio il batterio indicatore *Escherichia coli*, che al momento viene usato, nell'ambito della normativa vigente, per stabilire la qualità microbiologica dei molluschi bivalvi, è stato utilizzato anche per ottenere altre informazioni quali il livello di antibiotico resistenza e per condurre esercizi di *source tracking*, che sono aspetti altrettanto importanti per valutare la qualità microbiologica di tali prodotti e delle zone in cui sono pescati e quindi per valutarne la sicurezza per i consumatori.

I dati raccolti nel presente studio di tesi permettono di confermare che:

- I livelli di contaminazione da *E. coli* nelle cozze e vongole venete sono piuttosto contenuti, indice quindi di elevata qualità microbiologica
- I livelli di contaminazione da *E. coli* sono risultati decisamente superiori nei campioni di molluschi prelevati nelle zone lagunari, rispetto a quelli pescati in mare aperto
- Gli ambienti lagunari sono stati associati anche a livelli superiori di antibiotico resistenza
- Allo stesso modo, l'analisi di *source tracking*, che si è focalizzata sull'identificazione di potenziali fonti di contaminazione di origine avicola, dal momento che la regione oggetto di studio è particolarmente vocata all'allevamento avicolo, ha permesso di identificare nell'ambiente lagunare dei ceppi di *E. coli* di origine avicola. Tra tutti i ceppi di *E. coli* isolati quelli per i quali sono stati rilevati target ascrivibili al pollo sono stati identificati in ambiti di pesca limitrofi e in tutti i casi di origine lagunare.
- La presenza di altre tipologie di allevamento (tacchini, suini, bovini), nelle vicinanze delle aree con maggiore livello di contaminazione fecale e più elevati livelli di antibiotico resistenza, ha permesso di ipotizzare la presenza di altri possibili *hot spots*, quali potenziali fonti di contaminazione fecale.
- I livelli di antibiotico resistenza dei ceppi di *E. coli* isolati dai molluschi della costa veneta risultano piuttosto contenuti. Tuttavia, in alcuni casi sono state identificate resistenze verso antibiotici che hanno un ruolo importante nel trattamento di infezioni umane quali ad esempio i fluorochinoloni. A tal proposito sono state identificate, come

determinanti di resistenza, anche elementi di natura plasmidica, che rappresenta un ulteriore elemento di gravità per la conseguente trasferibilità della resistenza.

In conclusione i dati raccolti nell'ambito del presente studio confermano l'importanza di promuovere misure finalizzate a diminuire la disseminazione di residui di antibiotici nell'ambiente, ma anche per prevenire l'insorgenza di microrganismi sempre più resistenti alle sostanze antibiotiche.

Uno dei provvedimenti più importanti che si potrebbero promuovere per contenere tale problematica potrebbe essere innanzitutto la diminuzione dell'impiego degli antibiotici sia per quanto riguarda la veterinaria (compresa l'acquacoltura), che la medicina umano. Inoltre si dovrebbe insistere, come scritto sul "National Action Plan for combating Antibiotic-Resistant Bacteria" (2015), sulla ricerca per sintetizzare, o trovare sostanze alternative agli antibiotici. L'attenzione deve essere posta non solo sul loro utilizzo, ma anche sul loro corretto smaltimento. Come precedentemente detto uno dei rischi maggiori è anche il trattamento delle acque reflue.

Il rischio maggiore è, però, quello che si ha durante la filiera produttiva quindi c'è la necessità di programmare un piano di sorveglianza che abbia come obiettivo principale verificare la presenza di geni di antibiotico-resistenza nell'ambiente, in modo da tenere sotto controllo il problema del trasferimento orizzontale tra microrganismi nella catena alimentare e il successivo rischio per il consumatore (Van et al., 2008).

Il modello di sorveglianza integrata proposto nel presente studio, ha permesso, a partire dagli isolati di *E. coli* raccolti nell'ambito del monitoraggio delle aree di raccolta dei molluschi, secondo quanto previsto dalla normativa vigente, di approfondire altri importanti aspetti in termini di salute pubblica quale l'antibiotico resistenza, e l'analisi delle fonti di contaminazione. Tale modello garantisce l'ottimizzare della raccolta di dati che interessano differenti ambiti della sanità pubblica.

Il monitoraggio della qualità microbiologica dei molluschi bivalvi dovrebbe tenere conto non solo dei livelli di contaminazione da *E. coli*, come previsto dall'attuale normativa, ma, in particolar modo nelle aree più a rischio, come possono essere gli ambienti lagunari, anche l'analisi dei profili di resistenza antibiotica e l'analisi delle potenziali fonti di contaminazione.

7. BIBLIOGRAFIA

- Akiyama T., Savin M.C., *Population of Antibiotic-resistant Coliform Bacteria change rapidly in a Wastewater Effluent dominated Stream*, Sci. Total Environ., vol. 408, p. 6192-6201, 2010
- Allen H.K., Donato J., Wang H.H., Cloud-Hansen K.A., Davies J., Handelsman J., *Call of th Wild: Antibiotic Resistance Genes in natural Environments*, Nature Rev. Microbiol., p. 1-9, 2010
- Alonso A., Sanchez P., Martinez J.L., *Environmental Selection of Antibiotic Resistance Genes*, Environ. Microbiol., vol. 3, p. 1-9, 2001
- Alonso C.A., Gonzàlez-Barrio D., Tenorio C., Ruiz-Fons F., Torres C., *Antimicrobial Resistnace in faecal Escherichia coli Isolates from Farmed red Deer and wild small Mammals. Detection of a Multiresistant E. coli producing Extended-spectrum Beta-Lactamase*, Comp. Imm. Microbiol. Infect. Dis., vol.45, p.34-39, 2016
- Araud E., DiCaprio E., Ma Y., Lou F., Gao Y., Kingsley D., Hughes J.H., Li J., *Thermal Inactivation of Enteric Viruses and Bioaccumulation of Enteric Foodborne Viruse in Live Oysters (Crassostrea virginica)*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 82, p. 2086-2099, 2016
- Baker-Austin C., Stockley L., Rangdale R., Martinez-Urtaza J., *Environmental occurrence and clinical impact of Vibrio vulnificus and Vibrio parahaemolyticus: a European perspective*, Environ. Microbiol. Report, vol. 2, p. 7-18, 2010
- Baquero F., Martinez J.L., Canton R., *Antibiotics and Antibiotic-Resistance in Water Environments*, Curr. Opin. Biotech. vol. 19, p. 260-265, 2008
- Baucheron S., Tyler S., Boyd D., Mulvey M.R., Chaslus-Dancla E., Cloeckaert A., *AcrAB-TolC Directs Efflux-mediated Multidrug Resistance in Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104*, Antimicrob. Agents and Chemother., vol. 48, p. 3729-3735, 2004
- Benami M., Gillor O., Gross A., *Potential microbial Hazards from Greywater Reuse and associated Matrices: a Review*, Water Res., vol. 106, p. 183-195, 2016

- Cabello F.C., *Heavy use of prophylactic Antibiotics in Acquaculture: a growing Problem for Human and Animal Health and for the Environment*, Environ. Microbiol., vol. 8, p. 1137-1144, 2006
- Campos C.J.A., Acornley R., Morgan O.C., Kershaw S., *Trends in the Levels of Escherichia coli in commercially harvested Bivalve Shellfish from England and Wales, 1999-2008*, Mar. Pollut. Bull., vol. 67, p. 223-227, 2013
- Campos C.J.A., Kershaw S., Morgan O.C., Lees D.N., *Risk Factors for Norovirus Contamination of Shellfish Water Catchments in England and Wales*, Int. J. Food Microbiol., vol. 242, p. 318-324, 2017
- Canton R., *Antibiotic-Resistance Genes from the Environment: a Perspective through newly identified Antibiotic-Resistance Mechanisms in the Clinical Setting*, European Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis., vol. 15, p. 20-25, 2009
- Carroll S.P., Dawes L., Hargreaves M., Goonetilleke, *Faecal Pollution Source Identification in an Urbanising Catchment using Antibiotic Resistance Profiling, Discriminant Analysis and Partial Least Squares Regression*, Water Res., vol. 43, p. 1237-1246, 2009
- Cattaneo P. e Bernardi C., *Food In, Collezione di Studi sull'Ispezione degli Alimenti di Origine Animale*, Università degli Studi di Milano, vol. 1, 2010
- Cheng W., Chen H., Su C., Yan S., *Abundance and Persistence of Antibiotic Resistance Genes in Livestock Farms: a Comprehensive Investigation in Eastern China*, Environ. Int., vol. 61, p. 1-7, 2013
- Chu C., Chiu C., Wu W., Chu C., Liu T., Ou J.T., *Large Drug Resistance Virulence Plasmids of Clinical Isolates of Salmonella enterica Serovar Choleraesuis*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 45, p. 2299-2303
- Clements K., Quilliam R.S., Jones D.L., Wilson J., Malham S.K., *Spatial and temporal Heterogeneity of Bacteria across an intertidal Shellfish Bed: Implications for Regulatory Monitoring of Faecal Indicator Organisms*, Sci. Total Environ., p. 1-9, 2015
- Conficoni D., Losasso C., Cortini E., Di Cesare A., Cibir V., Giaccone V., Corno G.,

- Ricci A., *Resistance to Biocides in Listeria monocytogenes collected in Meat Processing Environments*, Front. Microbiol., vol. 7, p. 1-9, 2016
- Conte D., Palmeiro J.K., da Silva Nogueira K., de Lima T.M.R., Cardoso M.A., Pontarolo M., Pontes Degaut F.L., Dalla-Costa L.M., *Characterization of CTX-M enzymes, quinolone resistance determinants, and antimicrobial residues from hospital sewage, wastewater treatment plant, and river water*, Ecotox. and Environ. Safe., vol. 136, p. 62-69, 2016
 - Corno G., Coci M., Giardina M., Plechuk S., Campanile F., Stefani S., *Antibiotics promote Aggregation within bacterial aquatic Communities*, Front. Microbiol., vol. 5, p. 1-9, 2014
 - Cully M., *Public Health: the Politics of Antibiotics*, Nature, vol. 509, p. 16-17, 2014
 - Czekalski N., Berthold T., Caucci S., Egli A., Burgmann H., *Increased Levels of Multiresistance Bacteria and Resistance Genes after Wastewater Treatment and their Dissemination into Lake Geneva, Switzerland*, Front. Microbiol., vol. 3, p. 1-18, 2012
 - D'Costa V.M., McGrann K.M., Hughes D.W., Wright G.D., *Sampling the Antibiotic Resistome*, Science, vol. 311, p. 374-377, 2006
 - Davies J. e Davies D., *Origins and Evolution of Antibiotic Resistance*, Microbiol. Mol. Biol. Rev., vol. 74, p. 417-433, 2010
 - Deng D., Zhang N., Xu D., Zheng G., *Polymorfism of Glucosyltransferase Gene (ycjM) in Escherichia coli and its use for Tracking Human Fecal Pollution in Water*, Sci. Total Environ., vol. 537, p. 260-267, 2015
 - Di Cesare A., Eckert E.M., 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*, Mol. Eco., vol. 24. p. 3888-3900, 2015
 - Dipartimento di Prevenzione U.O. Igiene Alimenti di o.a., IZS Sezione di La Spezia, Arpal, *Piano di Monitoraggio Sorveglianza dei Molluschi Bivalvi-Produzione, Depurazione, Commercializzazione secondo le Linee Guida Comunitarie*, 2008
 - Dombek P.E., Johnson L.K., Zimmerley S.T., Sadowsky M.J., *Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR to Differentiate Escherichia coli Isolates from Human and Animal Sources*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 66, p. 2572-2577, 2000

- Domingo J.W., Bambic D.G., Edge T.A., Wuertz S., *Quo Vadis Source Tracking? Towards a strategic Framework for environmental Monitoring fecal Pollution*, Water Res., vol. 41, p. 3539-3552, 2007
- Eaves D. J., Randall L., Gray D.T., Buckley A., Woodward M.J., White A.P., Piddock L.J.V., *Prevalence of Mutations within the Quinolone Resistance-Determining Region *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *pare* and Association with Antibiotic-Resistance in Quinolone-Resistant *Salmonella enterica**, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 48, p. 4012-4015, 2004
- European Center for Prevention and Disease Control (ECDC), *Relazione sulla Sorveglianza: Sorveglianza della Resistenza Antimicrobica in Europa*, 2011
- Field K. e Samadpour M., *Fecal Source Tracking, the Indicator Paradigm, and Managing Water Quality*, Water Res., vol. 41, p. 3517-3538, 2007
- Fu L., Shuai J., Wang Y., Ma H., Li J., *Temporal Genetic Variability and Host Sources of *Escherichia coli* associated with Fecal Pollution from Domesticated Animals in the Shellfish Culture Environment of Xiangshan Bay, East China Sea*, Environ. Pollut., vol. 159, p. 2808-2814, 2011
- Gao P., Mao D., Luo Y., Wang L., Xu B., Xu L., *Occurrence of Sulfonamide and Tetracycline-Resistant Bacteria and Resistance Genes in Aquaculture Environment*, Water Res., vol. 46, p. 2355-2364, 2012
- Gillings M.R., Paulsen I.T., Tetu S.G., *Genomics and the Evolution of Antibiotic Resistance*, Ann. N. Y. Academy Sci., p. 1-16, 2016
- Given S., Pendetlon L.H., Boehm A.B., *Regional Public Health Cost estimates of Contaminated Coastal Waters: a Case Study of Gastroenteritis at Southern California Beaches*, Environ. Sci.Tech., vol. 40,p. 4851-4858, 2006
- Gomi R., Matsuda T., Matsui Y., Yoneda M., *Faecal Source Tracking in Water by Next-generation Sequencing Technologies Using Host-Specific *Escherichia coli* Genetic Markers*, Environ. Sci.Tech., vol. 48, p. 9616-9623, 2014
- Gouromelon M., Caprais M.P., Ségura R., Le Mennec C., Lozach S., Piriou J.Y., Rincé A., *Evaluation of Two Library-Independent Microbial Source Tracking Methods to*

- Identify Sources of Fecal Contamination in French Estuaries*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 73, p. 4857-4866, 2007
- Guerra B., Soto S., Cal S., Mendoza M.C., *Antimicrobial Resistance and Spread of Class 1 Integrons among Salmonella Serotypes*, Antimicrobial and Chemotherapy, vol.43, p. 2166-2169, 2000
 - Guerra B., Soto S., Arguelles J.M., S., Mendoza M.C., *Multidrug Resistance is mediated by large Plasmids carrying a Class 1 Integron in the emergent Salmonella enterica Seritype*, Antimicrob. Agents Chemother., vol. 45, p. 1305-1308, 2001
 - Hamilton M.Y., Yan T., Sadowsky M.J., *Development of Goose- and Duck-specific DNA Markers to determine Sources of Escherichia coli in Waterways*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 72, p. 4012-4019, 2006
 - Harwood V.J., Staley C., Badgley B.D., Borges K., Korajkic A., *Microbial Source Tracking Markers for Detection of Fecal Contamination in Environments Waters: Relationships between Pathogens and Human Health Outcomes*, Microbiol. Rev., vol.38, p.1-40, 2014
 - Heuer O.E., Kruse H., Grave K., Collignon P., Karunasagar I., Angulo F.J., *Human Health Consequences of Use of Antimicrobial Agents in Aquaculture*, Food Safety, vol. 49, p. 1248-1253, 2009
 - Hirsch R., Ternes T., Haberer K., Kratz K., *Occurrence of Antibiotics in the Aquatic Environment*, Sci. Total Environ., vol. 225, p. 109-118
 - Hoa P.T.P., Managaki S., Nakada N., Takada H., Shimizu A., Anh D.H., Viet P.H., Suzuki S., *Antibiotic Contamination and Occurrence of Antibiotic-resistant Bacteria in Aquatic Environments of Northern Vietnam*, Sci. Total Environ., vol. 409, p.2894-2901, 2011
 - Hu L., Chen G., Kong Q., Gao L., Chen X., Ye Y., Li J., *Increase in the Prevalence of Resistance Determinants to Trimetoprim/Sulfomethoxazole in Clinical Stenotrophomonas maltophilia Isolates in China*, Plos One, vol. 11, p. 1-9, 2016
 - Jay J.M., Loesser M.J., Golden D.A., *Modern Food Microbiology-Seventh Edition*, Springer, 2005
 - Jin L., Li T., Liu H., Zhu J., *Investigation in the Differences of accumulating*

- Escherichia coli* in three types of Shellfishes Specie, involving in the environmental Factors, Mar. Pollut. Bull., vol. 109, p. 81-86, 2016
- Johnson L.K., Brown M.B., Carruthers E.A., Ferguson J.A., Dombek P.E., Sadowsky M.J., *Sample size, library composition and genotypic diversity influence accuracy of determining sources of fecal pollution among natural population of Escherichia coli from different animals*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 70, p. 4478-4485, 2004
 - Kemper N., *Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment*, Ecol. Indic., vol. 8, p. 1-13, 2008
 - Khan S., Beattie T.K., Knapp C.W., *Relationship between Antibiotic- and Disinfectant-Resistance Profiles in Bacteria harvested from Tap Water*, Chemosphere, vol. 152, p. 132-141, 2016
 - Lee R.J. e Reese R.A., *Relating the Bivalve Shellfish harvesting Area Classification Criteria in the United States and European Union Programmes*, J. Water Hea., vol. 12, p. 280-287, 2014
 - Leoni F., Chierichetti S., Santarelli S., Talevi G., Masini L., Bartolini C., Rocchegiani E., Haouet M.N., Ottaviani D., *Occurrence of Arcobacterspp. and Correlation with the bacterial Indicator of Faecal Contamination Escherichia coli in Bivalve Molluscs from the Central Adriatic, Italy*, Int. J. of Food Microbiol., vol. 245, p. 6-12, 2017
 - Liu X., Zhang H., Li L., Fu C., Tu C., Huang Y., Wu L., Tang J., Luo Y., Christie P., *Levels, Distributions and Sources of Veterinary Antibiotics in the Sediments of the Bohai Sea in China and Surrounding Estuarines*, vol. 109, p. 597-602, 2016
 - Losasso C., Bille L., Patuzzi I., Lorenzetto M., Binato G., Dalla Pozza M., Ferrè N., Ricci A., *Possible Influence of natural Events on Heavy Metals Exposure from Shellfish Consumption: a Case Study in the North-East of Italy*, Front. Pub. Hea., vol. 3, p. 1-7, 2015
 - Lupo A., Coyne S., Beredonk T.U., *Origin and Evolution of Antibiotic Resistance: the Common Mechanisms of Emergence and Spread in Water Bodies*, Front. Microbiol., vol. 3, p. 1-13, 2012
 - Ma H., Fu L., Li J., *Differentiation of Fecal Escherichia coli from Human, Livestock*

- and Poultry Sources by rep-PCR DNA Fingerprinting on the Shellfish Culture Area of East China Sea*, *Curr. Microbiol.*, vol. 62, p. 1423-1430, 2011
- Ma Y., Li M., Wu M., Li Z., Liu X., *Occurrences and regional Distributions of 20 Antibiotics in Water Bodies during Groundwater Recharge*, *Sci. Total Environ.*, vol. 518-519, p. 498-506, 2015
 - Makita K., Goto M., Ozawa M., Kawanishi M., Koike R., Asai T., Tamura Y., *Multivariable Analysis of the Association between Antimicrobial Use and Antimicrobial Resistance in Escherichia coli isolated from Apparently Healthy Pigs in Japan*, *Microb. Drug Resist.*, vol. 22, p. 28-39, 2016
 - Manaia C.M., Macedo G., Fatta-Kassinos D., Nunes O.C., *Antibiotic-Resistance in Urban Aquatic Environments: can it be controlled?*, *Appl. Microb. Biotech.*, vol. 100, p. 1543-1557, 2016
 - Mao D., Yu S., Risz M., Luo Y., Yang F., Li F., Hou J., Mu Q., Alovarez P.J.J., *Prevalence and Proliferation of Antibiotic Resistance Genes in two Municipal Wastewater Treatment Plants*, *Water Res.*, vol. 85, p. 458-466, 2015
 - Marinho C.M., Santos T., Goncalves A., Poeta P., Igrejas G., *A Decade-long Commitment to Antimicrobial-Resistance Surveillance in Portugal*, *Front. Microbiol.*, vol. 7, p. 1-14, 2016
 - Mauffret A., Mieszkin S., Morizur M., Alfiansah Y., Lozach S., Gourmelon M., *Recent Innovation in microbial Source Tracking using bacterial real-time PCR Markers in Shellfish*, *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 68, p. 21-29, 2013
 - McArdell C.S., Molnar E., Suter M.S., Giger W., *Occurrence and Fate of Macrolide Antibiotics in Wastewater Treatment Plant and in the Glatt Valley Watershed, Switzerland*, *Env. Sci. Technol.*, vol. 15, p. 5479-5486, 2003
 - Meschke J.S. e Boyle D.L., *Shellfish and microbial source tracking*. In: Santo Domingo, J., Sadowsky, M. (Eds.), *Microbial Source Tracking*. ASM Press, Washington, DC, 2007
 - Mugnaioli C., Luzzaro F., De Luca F., Brigante G., Perilli M., Amicosante G., Stefani S., Toniolo A., Rossolini G., *CTX-M Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Italy: Molecular Epidemiology of an emerging Countrywide problem*, *Antimicrob. Agents*

- Chemiother., vol. 50, p. 2700-2706, 2006
- Namsai A., Louisirotchanakul S., Wongchinda N., Siripanyaphniyo U., Virulhakul P., Puthavanatha P., Myint K.S., Gannarong M., Ttapong R.I., *Surveillance of Hepatitis A and E Viruses Contamination in Shellfish in Thailand*, Lett. Appl. Microbiol., vol. 53, p. 608-613, 2011
 - *National Action Plan for combating Antibiotic-Resistant Bacteria*, USA, 2015
 - Ng L., Mulvey M.R., Martin I., Peters G.A., Johnson W., *Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance in Canadian Isolates of Salmonella Serovar Typhimurium DT104*, Antimicrob. Agents Chemother., vol.43, p. 3018-3021, 1999
 - O'Neill J., *Antimicrobials in Agriculture and the Environment: reducing unnecessary Use and Waste*, The Rev. Antimicrob. Resistance, p. 1-41, 2015
 - Olalemi A., Baker-Austin C., Ebdon J., Taylor H., *Bioaccumulation and Persistence of Faecal Bacterial and Viral Indicators in Mytilus edulis and Crassostrea gigas*, Int. J. of Hyg. Envir. Hea., vol. 219, p. 592-598, 2016
 - Osinska A., Kozerniewska E., Harnisz M., Niestepski S., *The Prevalence and Characterization of Antibiotic-Resistant and Virulent Escherichia coli Strains in the Municipal Wastewater System and their environmental Fate*, Sci. Total Environ., in stampa, 2016
 - *Piano Regionale Integrato dei Controlli anno 2015-2018*
 - Radhouani H., Silva N., Poeta P., Torres C., Correia S., Igrejas G., *Pontential Impact of Antimicrobial Resistance in Wildlife, Environment and Human Health*, Front. Microbiol., vol. 5, p. 1-12, 2014
 - Rodriguez I., Barownick W., Helmuth R., Mendoza C.M., Rodicio M.R., Schroeter A., Guerra B., *Extended-spectrum β -Lactamases and AmpC β -Lactamases in Ceftriaxone-resistant Salmonella enterica Isolates from Food and Livestock obtained in Germany during 2003-07*, J. Antimicrob. Chemother., vol. 64, p. 301-309, 2009
 - Sapkota A., Sapkota A.R., Kucharski M., Burke J., McKenzie S., Walker P., Lawrence R., *Aquaculture Practices and potential Human Health Risks: current Knowledge and future Priorities*, Env. Inter., vol. 34, p. 1215-1226, 2008

- Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.A., *A Global Perspective on the Use, Sales, Exposure Pathways, Occurrence, Fate and Effects of Veterinary Antibiotics (VAs) in Environment*, Chemosphere, vol. 65, p. 725-759, 2006
- Savage D.C., *Microbial Ecology of the Gastrointestinal Tract*, Ann. Rev. of Microbiol., vol. 31, p. 107-133, 1977
- Schwartz T., Kohnen W., Jansen B., Obst U., *Detection of Antibiotic-resistant Bacteria and their Resistance Genes in Wastewater, Surface Water, and Drinking Water Biofilms*, FEMS Microbiol. Eco., vol. 43, p. 325-335, 2003
- Scott T.M., Jenkins T.M., Lukasik J., Rose J.B., *Potential Use of a Host Associated Molecular Marker in Enterococcus faecium as an Index of Human Fecal Pollution*, Environ. Sci.Tech., vol. 39, p. 283-287, 2005
- Scott T.M., Parveen S., Portier K. M., Rose J.B., Tamplin M.L., Farrah S.R., Koo A., Lukasik J., *Geographical Variation in Ribotype Profiles of Escherichia coli Isolates from Humans, Swine, Poultry, Beef, and Dairy Cattle in Florida*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 69, p. 1089-1092, 2003
- Sestili P., Santarelli S., Ottaviani D., *Surveillance Activity in the IZS UM Safety lab of Ancona - Italy - Attività di sorveglianza nel laboratorio di sicurezza alimentare di Ancona dell'IZS UM*, Webzine Sanità Pubblica, vol. 53, 2009
- Sengupta S., Chattopadhyay M.K., Grossart H., *The Multifaceted Roles of Antibiotics and Antibiotic-Resistance in Nature*, Front. Microbiol., vol. 4, p. 1-13, 2013
- Seputiene V., Povilonis J., Ruzauskas M., Pavilonis A., Suziedeliene E., *Prevalence of Trimetoprim Resistance genes in Escherichia coli Isolates of Human and Animal Origin in Lithuania*, J. Med. Microbiol., vol.59, p. 315-322, 2010
- Serrano Hernandez P., *Responsible Use of Antibiotic in Aquaculture*, FAO Fisheries Technical Paper, p. 1-110, 2005
- Simoes R., Poirel L., Da Costa P., Nordmann P., *Seagulls and Beaches as Reservoirs for Multidrug-Resistant Escherichia coli*, Emerg. Infect. Dis., vol. 16, p. 110-112, 2010
- Soule M., Kuhn E., Loge F., Gay J., Call D.R., *Using DNA Microarray to identify*

- Library-Independent Markers for Bacterial Source Tracking*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 272, p. 1843-1851, 2006
- Stoeckel D.M., Harwood V.J., *Performance, Design and Analysis in Microbial Source Tracking Studies*, Appl. Environ. Microbiol., vol. 73, p. 2405-2415, 2007
 - Stange C., Sidhu J.P.S., Tiehm A., Toze S., *Antibiotic-resistance and Virulence Genes in Coliform Water Isolates*, Int. J. Hyg. Envir. Hea., vol. 219, p. 823-831, 2016
 - Strubbia S., Lyons B.P., Lee R.J., *Geographical and Temporal Variation of Escherichia coli and Norovirus in Mussels*, Mar. Pollut. Bull., vol. 107, p. 66-70, 2016
 - Suhartono S., Savin M., Gbur E. E., *Genetic Redundancy and Persistence of Plasmid-mediated Trimetoprim/Sulfomethoxazole Resistent Effluent and Stream Water Escherichia coli*, Water Res., vol.103, p.197-204, 2016
 - Suzuki S. e Hoa P.T.P., *Distribution of Quinolones, Sulfonamides, Tetracyclines in aquatic Environment and Antibiotic Resistance in Indochina*, Front. Microbiol., vol. 3, p. 1-8, 2012
 - Turolla E., *La Venericoltura in Italia*, FAO, p. 177-188, 2008
 - Van Hoek A., Mevius D., Guerra B., Mullany P., Roberts A.P., Aarts H.J.M., *Aquired Antibiotic-resistance Genes: an Overview*, Front. Microbiol., vol.2, p. 1-27, 2011
 - Van T.T.H., Chin J., Chapman T., Tran L.T., Coloe P.J., *Safety of raw Meat and Shellfish in Vietnam: an Analysis of Escherichia coli Isolations for Antibiotic-Resistance and Virulence Genes*, Int. J. of Food Micro., vol. 124, p. 217-223, 2008
 - Veneto Agricoltura, Osservatorio Socio-Economico della Pesca e dell'Acquacoltura, *La Mitilicoltura Veneta-Focus sull'Off-Shore*, 2014
 - Wilson E.O., *La Società degli Insetti*, Einaudi, Torino, 1976
 - Winterbourn J.B., Clements K., Lowther J.A., Malham S.K., McDonald J.E., Jones D.L., *Use Mytilus edulis Biosentinels to investigate Spatial Patterns of Norovirus and Fecal Indicator Contamination around Coastal Sewage Discharges*, Water Res., vol. 105, p. 241-250, 2016
 - World Health Organization (WHO), *Antimicrobial use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance. Report af a joint FAO/OIE/WHO expert Consultation on*

Antimicrobial use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance, Seul, Republic of Korea, 2006

- World Health Organization (WHO), *Food Safety Issues Associated with Products from Aquaculture*, vol. 883, Geneva, Switzerland, 1999
- World Health Organization (WHO), *The Medical Impact of Antimicrobial Use in Food Animals*, Berlino, Germania, 1997
- Zhang J., Yang X., Kuang D., Shi X., Xiao W., Zhang J., Gu Z., Xu X., Meng J., *Prevalence of Antimicrobial Resistance in non-typhoidal Salmonella Serovars in retail Aquaculture Products*, Int. J. of Food Micro., vol. 210, p. 47-52, 2015
- Zheng Q., Zhang R., Wang Y., Xiaohui P., Tang J., Zhang G., *Occurrence and Distribution of Antibiotics in the Beibu Gulf, China: Impacts of River Discharge and Aquaculture Activities*, Mar. Environ. Res., vol. 78, p. 26-33, 2012

SITOGRAFIA

- appsricercascientifica.inail.it
- ec.europa.eu
- ecdc.europa.eu/
- maps.google.it
- www.ismea.it/
- www.iss.it
- www.izsum.it
- www.msdl-italia.it
- www.regione.veneto.it
- www.whitehouse.gov
- www.wikipedia.it

RINGRAZIAMENTI

Ringrazio prima di tutto coloro che mi hanno permesso di svolgere questo lavoro di tesi e mi hanno sostenuto durante tutto questo periodo. Quindi prima di tutti il prof. Alberghini, la dott. ssa Losasso e la dott. ssa Barco dell'IZSVe che mi hanno seguito in tutto questo periodo di sperimentazione e scrittura. Grazie a loro non solo ho avuto la possibilità di svolgere una bellissima tesi, ma anche per aver avuto la possibilità di imparare moltissime cose anche oltre l'ambito della tesi.

Ringrazio tutti i tecnici di laboratorio e borsisti che mi hanno aiutato a raccogliere la marea di dati che è servita per avere un quadro completo della situazione e che mi hanno permesso di stare al loro fianco non soltanto per lo svolgimento della tesi, ma anche per la simpatia e la leggerezza che mi hanno permesso di vivere con serenità questo ultimo anno di fatiche universitarie.

Ringrazio i miei colleghi, già laureati o nel frangente di farlo.

Quindi ringrazio la mia famiglia che mi ha sostenuto non solo economicamente, ma anche moralmente per finire questo percorso di studi, sperando di non deluderli del risultato ottenuto.

Ringrazio gli amici che mi sono stati (e lo saranno ancora), nonostante la distanza, vicini a me tutta la vita e mi hanno visto passare uno sclero dopo l'altro dalle superiori, se non dall'infanzia, e che mi hanno sempre voluto bene nonostante sia un maschiaccio dentro e fuori (anche se ultimamente sono leggermente migliorata no?).

Ringrazio gli amici di Salamandra e del MOP che hanno reso la mia esperienza universitaria unica, anche all'infuori dello studio (forse dovrei dire soprattutto?!).

Ringrazio le mie coinquiline Clara e Charlotte per avermi sostenuto e soprattutto sopportato per tutto questo tempo (prometto che dopo tutto ciò la mia scrivania sarà sempre in ordine!).

Tranquilla Charlie le serate serie tv e di film trashosi non finirà con copertine morbide e cioccolata, lo prometto... abbiamo ancora tanto da scoprire in questo oscuro mondo di film e serie a bassissimo budget.

In questo frangente ringrazio anche le BFF e gli amici delle BFF, di cui sono fiera di fare parte perché siamo sempre favolose ... e lo sappiamo.

Infine ringrazio Alberto che mi ha sostenuto, sopportato e assicurato durante tutti questi due anni e mezzo di studio; grazie alla sua pazienza, alla sua buona cucina e anche perché (in fondo in fondo) so che mi vuoi bene. Sei riuscito a sopportarmi anche durante le crisi durante questi ultimi giorni, non è da tutti.

Elena B.