



# Monitoraggio dell'insorgenza di antibiotico-resistenza associata all'uso di streptomicina nella lotta contro il fuoco batterico

## Sintesi

### 1 Introduzione

Nel gennaio 2008, l'Ufficio federale dell'agricoltura (UFAG) ha autorizzato l'uso di streptomicina nella lotta contro il fuoco batterico in condizioni controllate, con la clausola di monitorare lo sviluppo dell'antibiotico-resistenza negli appezzamenti trattati. La stazione di ricerche Agroscope Changins-Wädenswil (ACW) ha così avviato un programma di monitoraggio incentrato sulla flora batterica coltivabile nel suolo e nelle piante, in particolare sull'*Erwinia amylovora*, l'agente del fuoco batterico. Il 18 dicembre 2008, l'UFAG ha rinnovato l'autorizzazione per il 2009 a condizione che fosse proseguito il programma di monitoraggio. Da allora simili autorizzazioni sono concesse annualmente, in attesa di una soluzione alternativa efficace.

La Commissione federale per la sicurezza biologica (CFSB) ha sottolineato la necessità di un programma di monitoraggio multidisciplinare, che includa anche il potenziale sviluppo di antibiotico-resistenza e multiresistenza negli umani e negli animali, oltre agli aspetti legati alle piante e al suolo. La CFSB ha perciò avviato un progetto interdisciplinare in collaborazione con vari servizi federali, istituti di ricerca e altri esperti<sup>1</sup>. Visti i recenti progressi conseguiti nei settori della genomica e della metagenomica, il gruppo di esperti ha proposto un programma triennale composto da vari moduli, il cui scopo principale era di ottenere, mediante metodologie scientifiche all'avanguardia, una valutazione obiettiva dei rischi reali legati all'uso di streptomicina nella lotta contro il fuoco batterico piuttosto che di cercare argomenti contro tale trattamento.

Il programma è stato finanziato da vari uffici federali e altre organizzazioni<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Commissione federale per la sicurezza biologica (CFSB), Ufficio federale dell'ambiente (UFAM), Ufficio federale dell'agricoltura (UFAG), stazione di ricerche Agroscope Changins-Wädenswil (ACW), stazione di ricerche Agroscope Reckenholz-Tänikon (ART), Ufficio federale di veterinaria (UFV), Segreteria di Stato dell'economia (SECO).

<sup>2</sup> Hanno concesso un sostegno finanziario le seguenti istituzioni: CFSB, UFAG, UFAM, UFV, ACW, AWEL (Amt für Abfall, Wasser, Energie und Luft – Kanton ZH). ACW e IVB (Istituto di batteriologia veterinaria – Università di Berna) hanno inoltre fornito spazi di laboratorio e attrezzatura, costi fissi e personale. Il programma è stato coordinato da Jean-Claude Piffaretti, Interlifescience, Massagno.

## 2 Prove sperimentali e risultati

### 2.1 Modulo A: Valutazione dell'impatto dell'uso di streptomicina sui batteri ambientali (piante e suolo) e sui geni di resistenza

Questo modulo è stato realizzato dal centro di competenza nazionale sul fuoco batterico di ACW. Una parte delle attività di ricerca è stata effettuata nell'ambito di COST (cooperazione europea nei settori della scienza e della tecnica). Qui di seguito sono descritti gli esperimenti principali e i risultati.

#### 2.1.1 Perfezionamento degli strumenti molecolari necessari per monitorare i geni di resistenza presenti nell'ambiente

Per monitorare l'evoluzione quantitativa dei geni di resistenza in microrganismi coltivabili e non coltivabili presenti nell'ambiente è stato necessario ottimizzare e convalidare i metodi di estrazione del DNA da vari ecosistemi (matrici vegetali, suolo) nonché i metodi d'identificazione e quantificazione di tali sequenze. Sono stati presi in considerazione i geni di resistenza *aph3 (strA)*, *aph6 (strB)* e *aadA* per la streptomicina nonché *tetB*, *tetM* e *tetW* per la tetraciclina. I dati generati sono stati normalizzati mediante le sequenze codificanti del RNA ribosomiale (16S rRNA).

#### 2.1.2 Efficacia della streptomicina nella lotta contro il fuoco batterico

È stata effettuata un'analisi comparativa in due frutteti. Nel primo (Neukirch, TG), in assenza di trattamenti con la streptomicina è risultato contaminato da *E. amylovora* il 67 per cento degli alberi e il 17 per cento dell'infiorescenze, mentre dopo tre applicazioni di streptomicina i tassi d'infezione erano solo del 20 e dell'1 per cento rispettivamente. Nel secondo frutteto (Lömmenschwil, SG), i risultati sono stati ancora migliori: il tasso d'infezione degli alberi è infatti sceso dal 100 al 13 per cento e quello dell'infiorescenze dal 14 a meno dell'1 per cento. Seppur su piccola scala, queste analisi hanno confermato che l'applicazione tempestiva dell'antibiotico riduce notevolmente il fuoco batterico.

#### 2.1.3 Determinazione di una *baseline* prima dei trattamenti con la streptomicina, monitoraggio della resistenza dopo l'applicazione dell'antibiotico e valutazione dell'impatto sulle comunità batteriche

Le analisi sono state effettuate in appezzamenti di vari frutteti commerciali e sperimentali trattati con la streptomicina (alle condizioni previste dell'autorizzazione) o con prodotti alternativi (il lievito *Aureobasidium pullulans* o acqua). Sono stati analizzati campioni di piante e suolo.

Le principali osservazioni sono state le seguenti:

- a. Non è stato riscontrato alcun clone resistente alla streptomicina dell'agente patogeno *E. amylovora*, né prima né dopo l'applicazione dell'antibiotico. Sono per contro stati individuati cloni resistenti nelle comunità batteriche naturali, anche in assenza di trattamenti con la streptomicina (p. es. *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Aeromicrobium* ecc.).
- b. Applicazioni successive di streptomicina non hanno avuto alcun impatto sulla diversità batterica autoctona (microrganismi coltivabili e non coltivabili) nei fiori, nei frutti, nelle foglie o nel suolo, in nessun sito. Anche l'esposizione *worst case* (applicazione di dosi pari a 100 volte il dosaggio autorizzato) non ha avuto alcun impatto sulla biodiversità nelle comunità batteriche del suolo autoctone.

#### 2.1.4 Evoluzione dei geni di resistenza alla streptomicina e alla tetraciclina dopo l'uso di streptomicina

Le analisi effettuate durante tre anni consecutivi (2010-2012) hanno interessato tre frutteti sperimentali di mele nei Cantoni di Turgovia e Zurigo. I geni che codificano la resistenza alla streptomicina e alla tetraciclina sono stati monitorati in batteri coltivabili e non coltivabili estratti da fiori, foglie e suolo. Ogni anno sono state effettuate tre applicazioni di streptomicina o acqua (controllo). Sono stati prelevati

campioni un giorno prima della prima applicazione, un giorno e due settimane dopo la terza applicazione nonché durante il raccolto.

I principali risultati sono stati i seguenti:

- a. La maggior parte dei geni di resistenza è stata identificata, a livelli elevati, nei primi campioni (suolo, fiori, foglie) dei tre siti prima di qualsiasi trattamento.
- b. Nei tre siti, dopo le applicazioni di streptomicina gli aumenti relativi della quantità di geni di resistenza sono stati occasionali, incoerenti e non riproducibili da un anno all'altro.
- c. Gli aumenti relativi della quantità di geni di resistenza osservati dopo le applicazioni di streptomicina erano transitori e non sono più stati identificati nei campioni iniziali dell'anno successivo.
- d. In conclusione, nelle specifiche condizioni sperimentali dei test non è stato osservato alcun effetto permanente sui livelli dei geni di resistenza alla streptomicina e alla tetraciclina.

## **2.2 Modulo B: Valutazione dell'impatto dell'uso di streptomicina sulla flora commensale di animali che vivono nei pressi degli appezzamenti trattati**

Questo modulo è stato realizzato dall'Istituto di batteriologia veterinaria presso l'ospedale veterinario della facoltà Vetsuisse dell'Università di Berna.

Due gruppi (uno sperimentale e uno di controllo) di cinque agnelli e due pecore ciascuno sono stati collocati in due pascoli distinti di circa 2000 m<sup>2</sup> l'uno. Nel pascolo sperimentale sono state effettuate quattro applicazioni nebulizzando streptomicina direttamente sull'erba di due superfici adiacenti di 180 m<sup>2</sup> e 120 m<sup>2</sup>. Le concentrazioni dell'antibiotico erano di 17,5 mg/m<sup>2</sup> e 12,0 mg/m<sup>2</sup> rispettivamente, in modo da riprodurre il gradiente di contaminazione da streptomicina risultante dal trattamento di frutteti. Dopo l'applicazione, gli ovini sono stati confinati per 12 ore nell'area trattata e successivamente liberati nell'intero pascolo. Da ogni ovino dei due gruppi sono stati prelevati strisci rettali e nasali il giorno 0, tre giorni dopo la prima applicazione di streptomicina, sei giorni dopo la terza applicazione, due giorni dopo la quarta applicazione nonché i giorni 67 e 90. Nei campioni raccolti sono stati cercati due batteri indicatori: *Escherichia coli* negli strisci rettali e *Staphylococcus* spp. negli strisci nasali. Nelle colonie isolate sono stati effettuati test di suscettibilità a vari antibiotici. La natura genetica della resistenza alla streptomicina è stata analizzata cercando le sequenze *aph3* (*strA*), *aph6* (*strB*), *aadA*-e *ant(6)-1a* e sequenziando il gene *rpsL*, che codifica la proteina ribosomiale S12.

I principali risultati sono stati i seguenti:

- a. Complessivamente sono stati testati 455 ceppi di *E. coli*. Prima dell'applicazione della streptomicina il 16 per cento dei ceppi provenienti dal gruppo di controllo e il 15 per cento di quelli provenienti dal gruppo sperimentale erano resistenti all'antibiotico.
- b. Il giorno 90 le feci degli ovini esposti alla streptomicina contenevano il 44 per cento di *E. coli* resistenti contro il 17 per cento nel gruppo di controllo. Considerando il numero totale di *E. coli* isolati dalla prima applicazione, gli ovini esposti contenevano il 40 per cento di *E. coli* resistenti contro il 22 per cento nel gruppo di controllo ( $p = 0,0001$ ).
- c. Negli ovini esposti la multiresistenza (principalmente sulfametossazolo, ampicillina, tetraciclina, cloramfenicolo) è risultata nettamente superiore rispetto al gruppo di controllo (40% contro il 24%,  $p = 0,0002$ ). Alcuni ceppi presentavano una resistenza alla terza generazione di cefalosporine.
- d. Sono stati testati 184 ceppi di *Staphylococcus* spp. Complessivamente, dalla prima applicazione dell'antibiotico all'ultimo prelievo di campioni sono stati identificati solo otto ceppi resistenti alla streptomicina nella cavità nasale degli ovini esposti e nessuno nel gruppo di controllo. Analizzando i singoli *time point*, la differenza nella densità di *Staphylococcus* spp. resistenti non era significativa. Tale differenza diventava significativa solo aggregando i dati di tutti i *time point* ( $p = 0,001$ ). Gli otto ceppi resistenti alla streptomicina erano resistenti anche alla tetraciclina, all'acido fusidico e alla tiamulina.

### 3 Discussione generale

I risultati ottenuti in questi due progetti sono apparentemente divergenti. Nei frutteti e nelle condizioni sperimentali delle analisi è stato possibile osservare aumenti occasionali e transitori della quantità di geni di resistenza, che tuttavia non possono essere associati alle applicazioni di streptomina. In particolare, da sei a sette mesi dopo il termine dei trattamenti annuali non è stato identificato alcun aumento duraturo della resistenza. Questi risultati incoraggianti possono essere legati alle condizioni restrittive poste dalle autorizzazioni per usare streptomina nella lotta contro il fuoco batterico. È pertanto essenziale che questa politica sia portata avanti. Non è tuttavia escluso che, a lungo termine, l'applicazione di streptomina possa provocare un aumento duraturo della resistenza. Per questo motivo anche il monitoraggio dei suoli dei frutteti trattati deve proseguire.

È difficile trarre conclusioni dall'esperimento con gli ovini. Nei ceppi di *E. coli* della flora intestinale degli animali che hanno pascolato nei campi trattati con la streptomina è effettivamente stato osservato un aumento significativo della resistenza. Sono tuttavia state effettuate quattro applicazioni dell'antibiotico e non tre o addirittura due, come specificato nelle autorizzazioni annuali. Inoltre gli ovini hanno potuto pascolare sull'erba trattata durante 12 ore, cosa che non è consentita dalle condizioni a cui sono vincolate le autorizzazioni. Molto probabilmente gli ovini sono quindi stati esposti a quantità di streptomina superiori a quelle consentite dalle autorizzazioni. Questo aumento della resistenza non va tuttavia ignorato, bensì considerato un chiaro appello alla prudenza.

### 4 Conclusioni e dichiarazione finale

I risultati ottenuti dal programma di ricerca nonché il monitoraggio effettuato dall'ACW dal 2008 hanno mostrato che, alle condizioni sperimentali applicate, il trattamento con la streptomina ha avuto un impatto occasionale e reversibile sul livello di antibiotico-resistenza dei microrganismi presenti nel suolo, nelle foglie, nei fiori e nei frutti dei frutteti trattati. Benché transitorio, questo aumento non può tuttavia essere ignorato così come non può essere ignorata l'insorgenza di resistenza riscontrata nei ceppi di *E. coli* isolati dalle feci degli ovini esposti alla streptomina. Queste osservazioni, unitamente ai residui di streptomina riscontrati occasionalmente in campioni di miele e mele, indicano chiaramente che non bisogna abbassare la guardia. Anche in futuro in caso di autorizzazioni per l'uso di streptomina nella lotta contro il fuoco batterico sarà essenziale:

- a. continuare a subordinare l'autorizzazione di usare l'antibiotico a severe misure di controllo;
- b. proseguire il monitoraggio dei livelli di resistenza nel suolo dei frutteti trattati.

Sarà inoltre importante valutare i rischi legati al metodo e alle condizioni di applicazione della streptomina, allo scopo di ridurli, nei limiti del possibile. Quando si nebulizza la streptomina, è opportuno proteggere molto accuratamente le superfici circostanti allo scopo di evitare una contaminazione per l'effetto deriva. Occorre infine prestare particolare attenzione alla protezione dei lavoratori che nebulizzano l'antibiotico, che devono essere informati correttamente sui rischi legati a un'esposizione eccessiva.

Per placare i timori di una crescente antibiotico-resistenza batterica legata all'uso di streptomina nella lotta contro il fuoco batterico l'ideale sarebbe tuttavia trovare un'alternativa efficace. La ricerca scientifica in questo settore va pertanto promossa attivamente e finanziata adeguatamente. Sono già stati ottenuti risultati incoraggianti con il batterio *Pantoea agglomerans* presso l'ACW e con sostanze inorganiche, come l'allume di potassio  $[KAl(SO_4)_2]$  introdotto nel Baden-Württemberg. Offre prospettive interessanti anche la selezione di varietà di alberi da frutta con una minor suscettibilità all'*E. amylovora*. Ciò può essere ottenuto mediante procedure d'ibridazione classiche o potenziato notevolmente facendo ricorso a tecniche di ingegneria genetica.

## Ringraziamenti

Si ringraziano le seguenti persone per il loro impegno in qualità di membri del gruppo di esperti: Pascal Meylan (Università di Losanna, presidente della CFSB), Isabel Hunger-Glaser (responsabile della segreteria della CFSB), Markus Hardegger (UFAG), Eduard Holliger (ACW), Christian Pillonel (UFAM), Sabina Büttner (UFV), Kathrin Mühlemann<sup>†</sup> (CFSB e Università di Berna), Irene Schiller (UFV), Olivier Sanvido (SECO), Nicolas Foresti (UFAG), Mauro Tonola (CFSB e Istituto cantonale di microbiologia, Bellinzona), Jean-Claude Piffaretti (Interlifescience, Massagno, coordinatore del programma).

Si ringraziano inoltre Brion Duffy (ACW), Fiona Walsh (ACW) e Joachim Frey (Università di Berna) per aver condotto gli esperimenti descritti nel presente rapporto.

<sup>†</sup> Kathrin Mühlemann è deceduta nel novembre 2012.

Nota: molti dei risultati del programma sono stati pubblicati in riviste scientifiche internazionali o sono in stampa.