L'AMR nelle acque reflue in una prospettiva One Health: il percorso del PNCAR e le evidenze della ricerca

Giuseppina La Rosa, Rossella Briancesco

Centro Nazionale per la Sicurezza delle Acque (CeNSiA), ISS, Roma

Workshop Annuale del Centro di Referenza Nazionale Antibiotico Resistenza e del National Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance
Roma, 19–20 novembre 2026

La dimensione ambientale nelle strategie di contrasto all’AMR

Il ruolo dell’ambiente è diventato progressivamente più importante e concreto nelle strategie di contrasto all’antimicrobico-resistenza.

2015

OMS

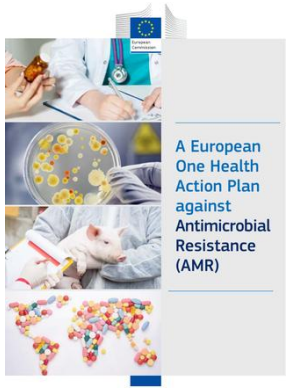


Piano d’azione globale sull’AMR

Riconosciuto il ruolo dell’ambiente nella diffusione dell’AMR

2017

Commissione UE



Piano d’azione One Health

Integrazione esplicita della dimensione ambientale nella strategia europea One Health

2023

OMS Europa



Roadmap AMR 2023–2030

Enabler «Surveillance»: inclusa la sorveglianza dell’AMR nelle acque reflue e superficiali

2025

Agenzia europea dell'ambiente – (EEA)

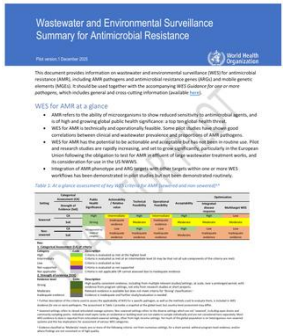


AMR nelle acque superficiali

Priorità per il monitoraggio ambientale

2025

OMS



Sorveglianza AMR nei reflui e nell’ambiente

Guida tecnica per la sorveglianza (pilota)

Le matrici idriche forniscono informazioni complementari



Acque reflue in ingresso (IN)

Forniscono un segnale aggregato dell'AMR nella comunità servita.

Effluente depurato (OUT)

- Documenta la presenza residua di AMR nell'effluente.
- Permette di valutare l'effetto del trattamento.

Acque superficiali (corpo idrico ricevente)

- Ricevono effluenti trattati ma anche altri apporti ambientali.
- Consentono di descrivere diffusione, persistenza e potenziali vie di esposizione dell'AMR (back to human).

AMR nelle acque: indicatori, ricerca e sorveglianza

CHE COSA MISURIAMO

Residui di antibiotici · Geni di resistenza (ARG) · Batteri resistenti (ARB)

DUE FINALITÀ COMPLEMENTARI

RICERCA

- Caratterizzare le resistenze, comprenderne distribuzione e dinamiche.
- Sviluppare metodi e criteri per interpretare correttamente i dati.

SORVEGLIANZA

- Monitorare le tendenze spazio-temporali dell'AMR.
- Fornire, nel lungo periodo, informazioni epidemiologiche complementari ai dati clinici, a supporto della sanità pubblica.

STUDI ISS → **Obiettivo**: comprendere potenzialità e criticità del monitoraggio AMR

Geni di antibiotico-resistenza (ARG) nei depuratori italiani


Contents lists available at ScienceDirect
Science of the Total Environment
journal homepage: www.elsevier.com/locate/scitotenv
ELSEVIER

Characterisation of microbial communities and quantification of antibiotic resistance genes in Italian wastewater treatment plants using 16S rRNA sequencing and digital PCR

Giusy Bonanno Ferraro [a,b], Carmelo Bonomo [b], David Brandtner [c], Pamela Mancini [a], Carolina Veneri [a], Rossella Briancesco [a], Anna Maria Coccia [a], Luca Lucentini [a], Elisabetta Suffredini [d], Dafne Bongiorno [b], Nicolò Musso [b], Stefania Stefani [b], Giuseppina La Rosa [a,*]

DISEGNO DELLO STUDIO

3 depuratori nel Lazio; 16 IN, 16 OUT e 4 pre-disinfezione, con campionamento stagionale nell'arco di un anno.

METODI

1) Quantificazione mediante digital PCR:
- **6 ARG**
- **intI1** (integrasi di classe 1)
- **16S rRNA** (riferimento per la normalizzazione rispetto alla componente batterica totale)

GENI ANALIZZATI MEDIANTE DIGITAL PCR

Classe di antibiotici	Geni di resistenza
Sulfamidici	sul1
Tetracicline	tetA
β-lattamici	blaTEM, blaCTX-M-1 group
β-lattamici – carbapenemi	blaKPC, blaOXA-48

RISULTATI –concentrazioni assolute e relative

Copie/L → riduzione generalmente di 1–3 log

ARG/16S → **aumento nel 37,5% dei confronti IN/OUT** (42/112)



Gli aumenti relativi indicano un reale arricchimento dei geni di resistenza?

Come interpretare gli aumenti relativi degli ARG? Il modello Gene–Biomass Dynamics (GBD)

Bacterial load changes influence the interpretation of antibiotic resistance gene dynamics during urban wastewater treatment

G. Bonanno Ferraro[1], A. Franco[1], D. Brandtner[1], D. Congiu[1], C. Veneri[1], P. Mancini[1], M. Iaconelli[1], L. Lucentini[1], D. S. I. Bongiorno[2], E. Suffredini[3], S. Stefani[2], G. La Rosa[1].

[1]National Center for Water Safety (CeNSiA), Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy
[2] Department of Biomedical and Biotechnological Science, University of Catania, Italy
[3]Department of Food Safety, Nutrition and Veterinary Public Health, Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy

submitted

DISEGNO DELLO STUDIO

5 depuratori (6 linee) · Piemonte, Lazio e Sicilia
23 coppie IN/OUT · 4 stagioni del 2024
Pannello di target ampliato (11 ARG + intI1 e 16S rRNA).

EFFETTO DELLA DEPURAZIONE

- Copie ARG/L (quantificazione assoluta): **diminuzione generalmente di 1–3 log;**
- ARG/16S (quantificazione relativa): **incremento nelle uscite nel 34,3%** (**79**/230) dei confronti



IL MODELLO GBD

Integra le variazioni delle concentrazioni assolute (ARG/L e 16S/L) e delle abbondanze relative (ARG/16S), distinguendo 7 classi di comportamento.

IL RISULTATO

35 dei 79 aumenti relativi sono classificati come ***lurk enrichment***
(aumento relativo apparente . artefatto matematico)

Aumento relativo dovuto a una riduzione del 16S maggiore di quella degli ARG.
ARG/L ↓ | 16S/L ↓↓ | ARG/16S ↑

Un aumento relativo degli ARG non indica necessariamente un arricchimento reale: la corretta interpretazione dei dati è cruciale!

Resistoma dei reflui urbani mediante hybrid capture

Un approccio diverso, che ci permette di andare oltre la quantificazione di pochi geni

toxics

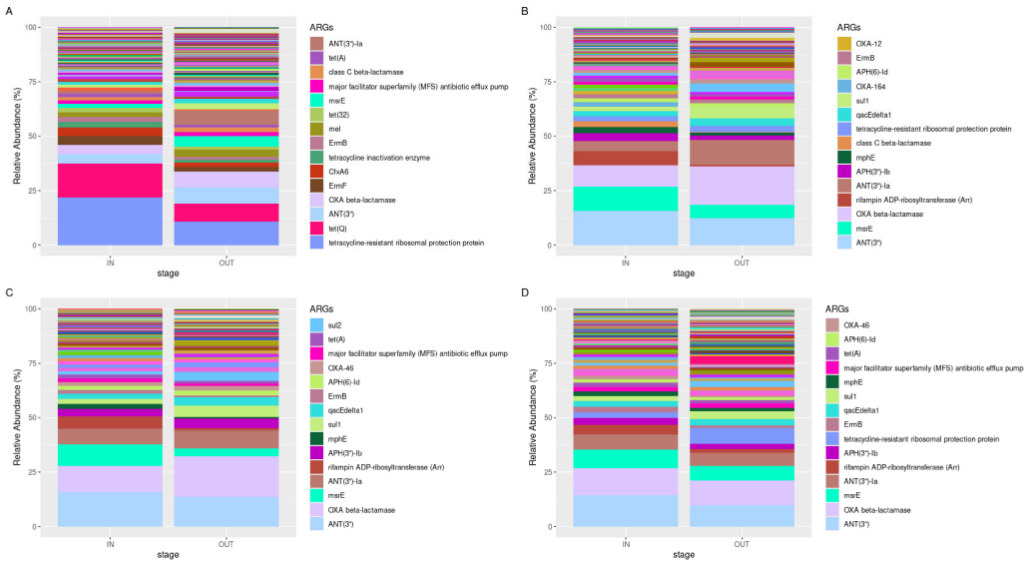
MDPI

Studio proof of concept su un singolo impianto

Article

Targeted Enrichment Sequencing for Wastewater Resistome Surveillance: A Proof-of-Concept Study Across Treatment Stages and Seasons

Giusy Bonanno Ferraro [1,*,†], David Brandtner [1,†], Carolina Veneri [1], Pamela Mancini [1], Agata Franco [1], Daniele Congiu [1], Marcello Iaconelli [1], Monica Monaco [2], Maria Del Grosso [2], Giulia Errico [2], Elisabetta Suffredini [3] and Giuseppina La Rosa [1]



Profili relativi di ARG dal sequenziamento (IN/OUT, 4 stagioni)

STUDIO PILOTA – TARGET ENRICHMENT

1 depuratore · 8 campioni IN/OUT · 4 stagioni

Pannello di **2.786 geni di resistenza**

RISULTATI PRINCIPALI

Elevata diversità: 743 ARG identificati, distribuiti in 35 categorie di antimicrobici.

Distribuzione disomogenea: oltre 500 ARG scarsamente rappresentati; 20 geni concentrano circa il 60% del segnale.

Persistenza dei profili: 624 ARG (84%) rilevati sia in IN sia in OUT.

Dinamiche stagionali: 191 ARG con arricchimento relativo invernale negli IN, soprattutto associati alle tetracicline;

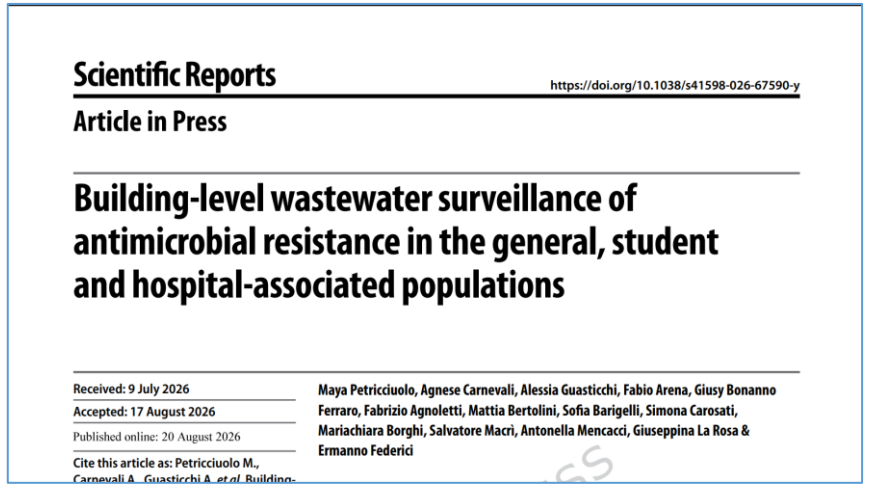
Approccio promettente per caratterizzare il resistoma; potenziale alternativa alla metagenomica shotgun

AMR nei reflui: popolazioni diverse, profili diversi

La WBE permette di studiare non solo intere comunità attraverso i depuratori, ma anche popolazioni specifiche, campionando direttamente nella rete fognaria

TRE DIVERSI CONTESTI – Perugia, febbraio–luglio 2025

- **Depuratore urbano** – popolazione generale (senza scarichi ospedalieri)
- **Edificio universitario** – popolazione studentesca
- **Ospedale** – popolazione ospedaliera



Scientific Reports

https://doi.org/10.1038/s41598-026-67590-y

Article in Press

Building-level wastewater surveillance of antimicrobial resistance in the general, student and hospital-associated populations

Received: 9 July 2026
Accepted: 17 August 2026
Published online: 20 August 2026
Cite this article as: Petricciuolo M., Carnevali A., Guasticchi A. *et al.* Building-

Maya Petricciuolo, Agnese Carnevali, Alessia Guasticchi, Fabio Arena, Giusy Bonanno Ferraro, Fabrizio Agnoletti, Mattia Bertolini, Sofia Barigelli, Simona Carosati, Mariachiara Borghi, Salvatore Macri, Antonella Mencacci, Giuseppina La Rosa & Ermanno Federici

TARGET ANALIZZATI

- *E. coli* resistenti alle cefalosporine di III generazione (3GCR-Ec) e enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE)
- 7 ARG + intI1

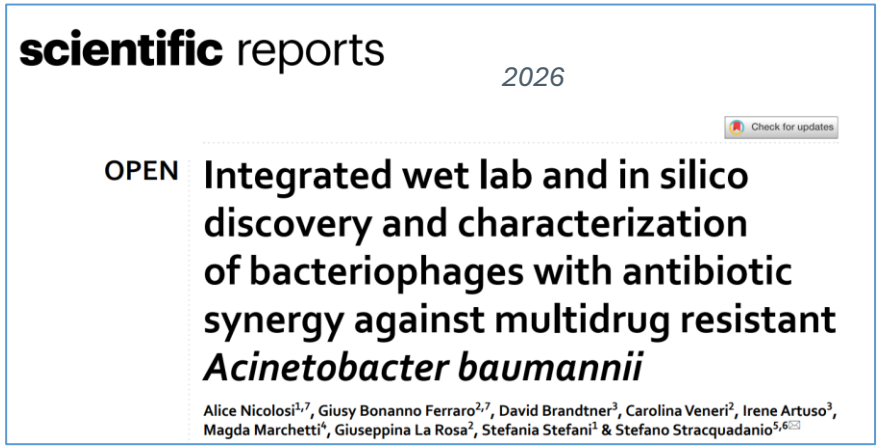
RISULTATI PRINCIPALI

- **VRE: prevalenza significativamente più elevata nei reflui ospedalieri**
- E. coli resistenti alle cefalosporine di III generazione: prevalenze comparabili nei tre contesti.
- **qnrS, blaCTX-M, blaKPC e vanA: abbondanze relative significativamente più elevate nei reflui ospedalieri** rispetto a quelli urbani. Differenze più marcate per blaKPC e vanA.

Conoscere il bacino servito dai depuratori e la presenza di scarichi ospedalieri è essenziale per interpretare correttamente i dati di AMR, evitando sovrastime attribuibili alla popolazione generale

Dai reflui nuove opportunità per contrastare l'AMR

Il rinnovato interesse per la fagoterapia apre nuove prospettive nella lotta all'AMR: le acque reflue rappresentano una preziosa risorsa per la ricerca di batteriofagi con potenziale terapeutico.



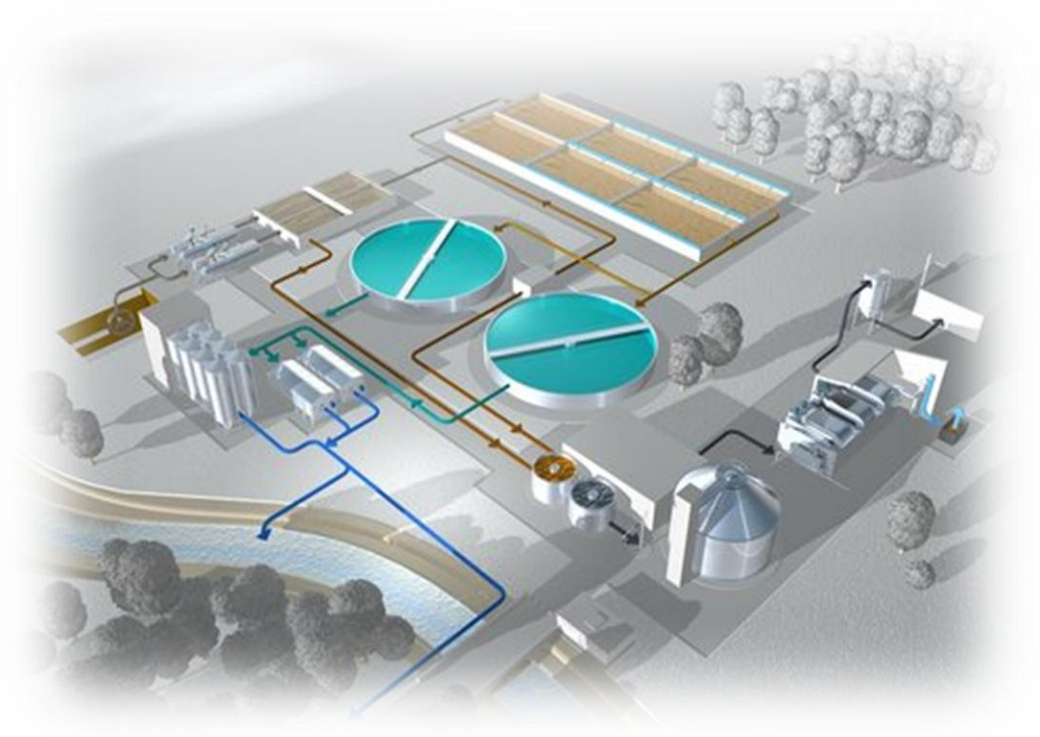
Isolamento e caratterizzazione di batteriofagi da acque reflue urbane, attivi contro ceppi clinici multiresistenti di *Acinetobacter baumannii*

Risultati principali

- 4 batteriofagi attivi contro un ceppo clinico multiresistente di *Acinetobacter baumannii;* 2 strettamente litici.
- Sinergia con antibiotici: uno dei fagi ha potenziato l'attività di cefiderocol, ceftazidime e cefotaxime.

Isolamento e caratterizzazione di batteri antibiotico-resistenti

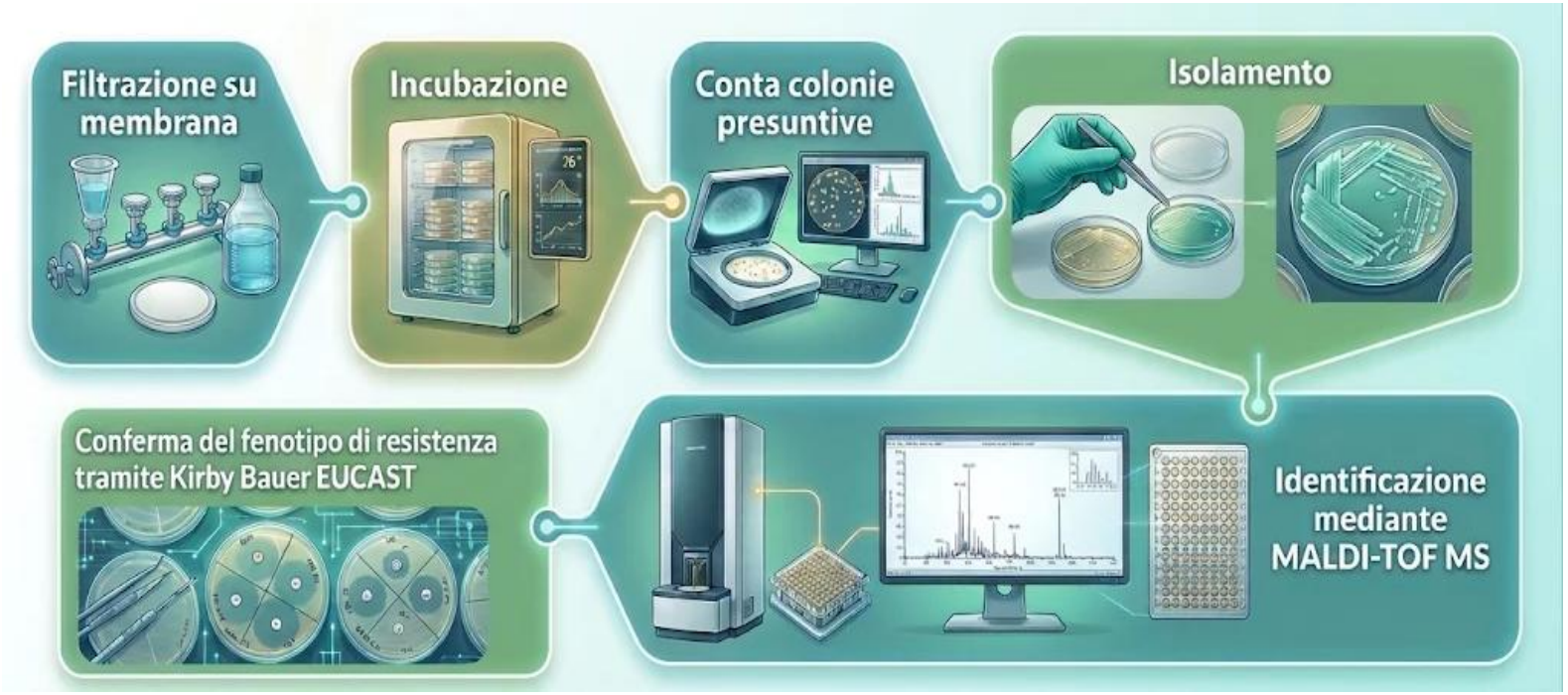
Studio longitudinale (**2024–2026**) in **5 impianti di trattamento di acque reflue (6 linee di trattamento)** del Nord, Centro e Sud Italia – Reflui IN, PRE-disinfezione e OUT



Target microbiologici

- ***Escherichia coli* produttori di beta-lattamasi a spettro esteso** (ESBL-Ec)
- **Enterococchi vancomicina-resistenti** (VRE)
- Indicatori di contaminazione fecale (***E. coli* totali, enterococchi intestinali**)
- **Carica batterica eterotrofa** (HPC a 22°C).

Metodologia analitica



Substrati colturali

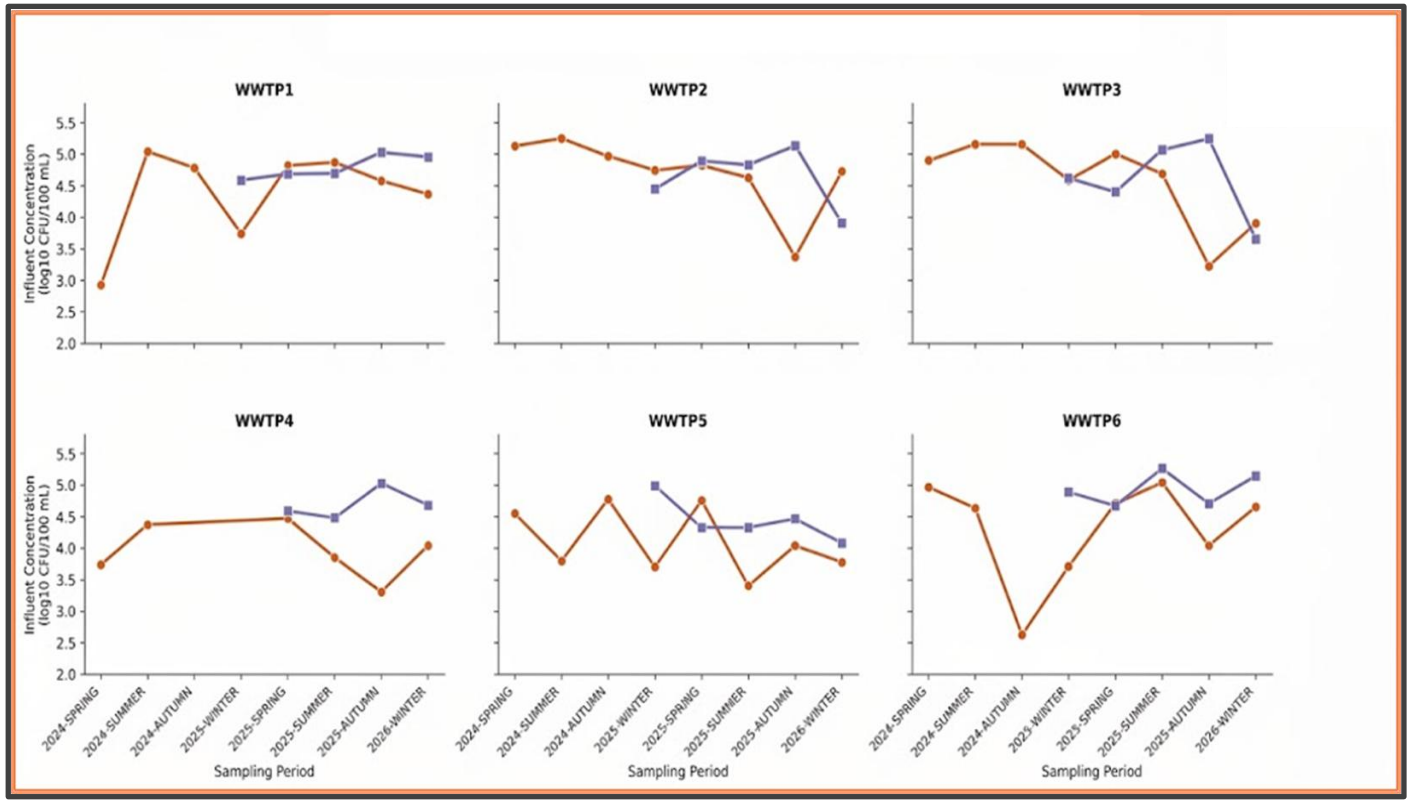
ESBL-Ec: TBX + cefotaxime (protocollo OMS Tricycle, 2021).

VRE: Slanetz & Bartley + vancomicina, EIA

***E. coli* totali e enterococchi intestinali**: TBX; Slanetz & Bartley + EIA

Carica batterica eterotrofa (HPC a 22°C): PCA

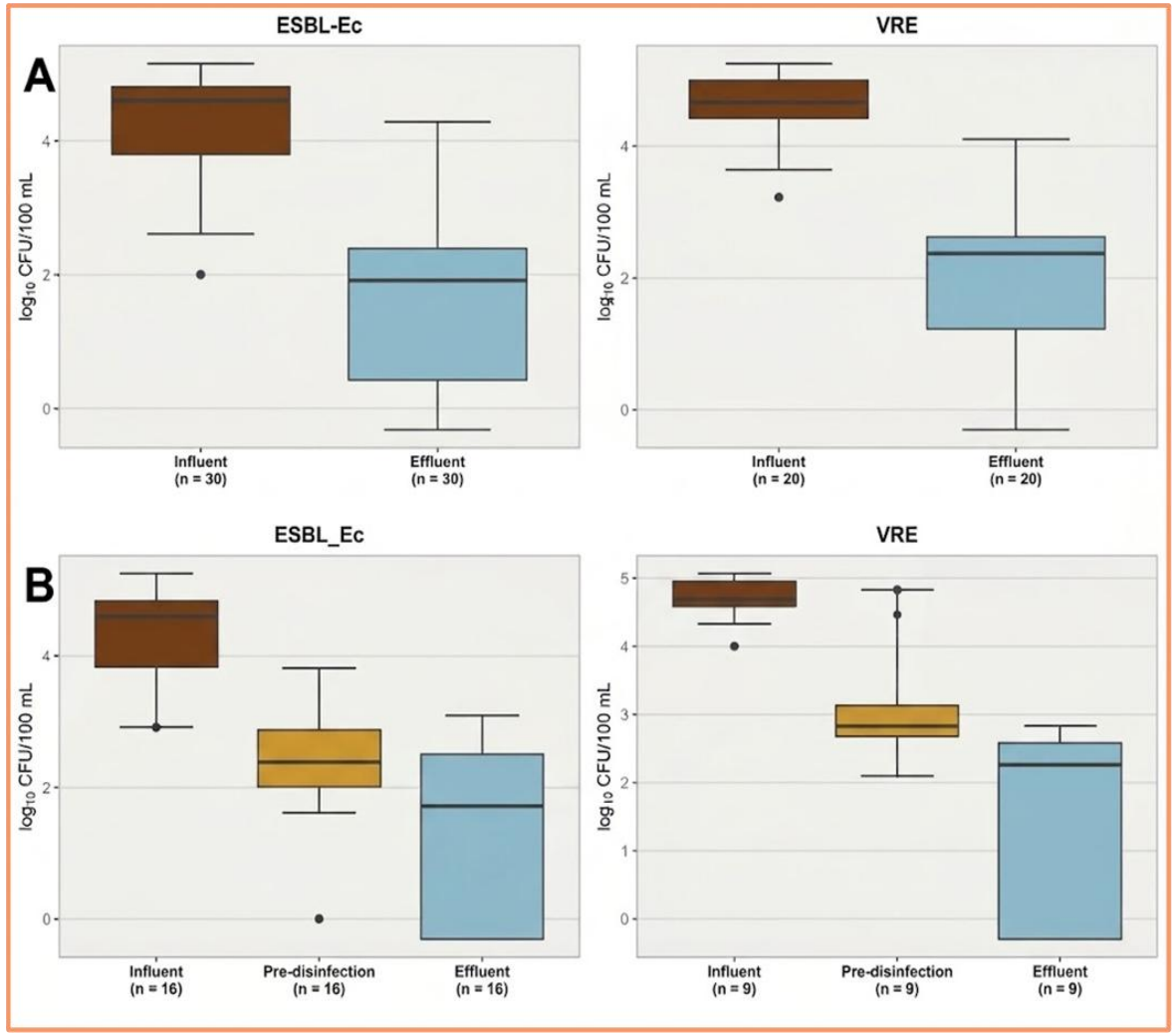
Reflui in ingresso: profilo quantitativo dei batteri antibiotico-resistenti



Per entrambi i target:

- **Presenza ubiquitaria e costante** nelle diverse aree geografiche monitorate
- Concentrazioni medie comprese tra **10^4 e 10^5 UFC/100 mL**
- Assenza di variabilità stagionale (Kruskal–Wallis: ESBL-Ec p = 0,307; VRE p = 0,157)

Abbattimento e Persistenza degli ARB negli effluenti



- **Riduzione logaritmica complessiva** (differenza tra mediane)

ESBL-Ec: **2,7 $\log_{10}$** VRE: **2,3 $\log_{10}$**

- **Riduzione prima della disinfezione finale**

ESBL-Ec: **2,2 $\log_{10}$** VRE: **1,9 $\log_{10}$**

- **Persistenza negli effluenti finali**

ESBL-Ec: **78,3%** di campioni positivi
VRE: **82,8%** di campioni positivi

Ampia variabilità delle concentrazioni residue con valori mediani nell'ordine delle decine o poche centinaia di UFC/100 mL

Controllo efficienza (HPC 22 °C): Abbattimento mediano complessivo di **2,3 $\log_{10}$** (n = 46), del tutto sovrapponibile a quello dei target resistenti.

Prevalenza proporzionale dei batteri resistenti

ESBL-Ec / E. coli totali

- Percentuale media invariata tra influente ed effluente: **2,06%**
- Mediana: **1,75%** nell'influente e **1,31%** nell'effluente
- Variabilità (CV): **91,75% → 124,27**



VRE / Enterococchi totali

- Percentuale media: **4,46%** nell'influente e **5,16%** nell'effluente
- Mediana: **3,45%** nell'influente e **2,95%** nell'effluente
- Variabilità (CV): **67,71% → 175,97**

Abbattimento proporzionale: quota relativa di ESBL-Ec e VRE invariata tra ingresso e uscita

Correlazioni e dinamiche di rimozione – ARB e indicatori convenzionali

1. Correlazione (Spearman, ρ)

ESBL-Ec / E. coli totali

ρ = 0,732

Influente - p < 0,001

ρ = 0,802

Effluente - p < 0,001

VRE / Enterococchi

ρ = 0,348

Influente - p = 0,064

ρ = 0,841

Effluente - p < 0,001

2. Efficienza di rimozione

Confronto ΔLRV · Wilcoxon

ESBL-Ec

−0,08

ΔLRV mediano

p = 0,438

VRE

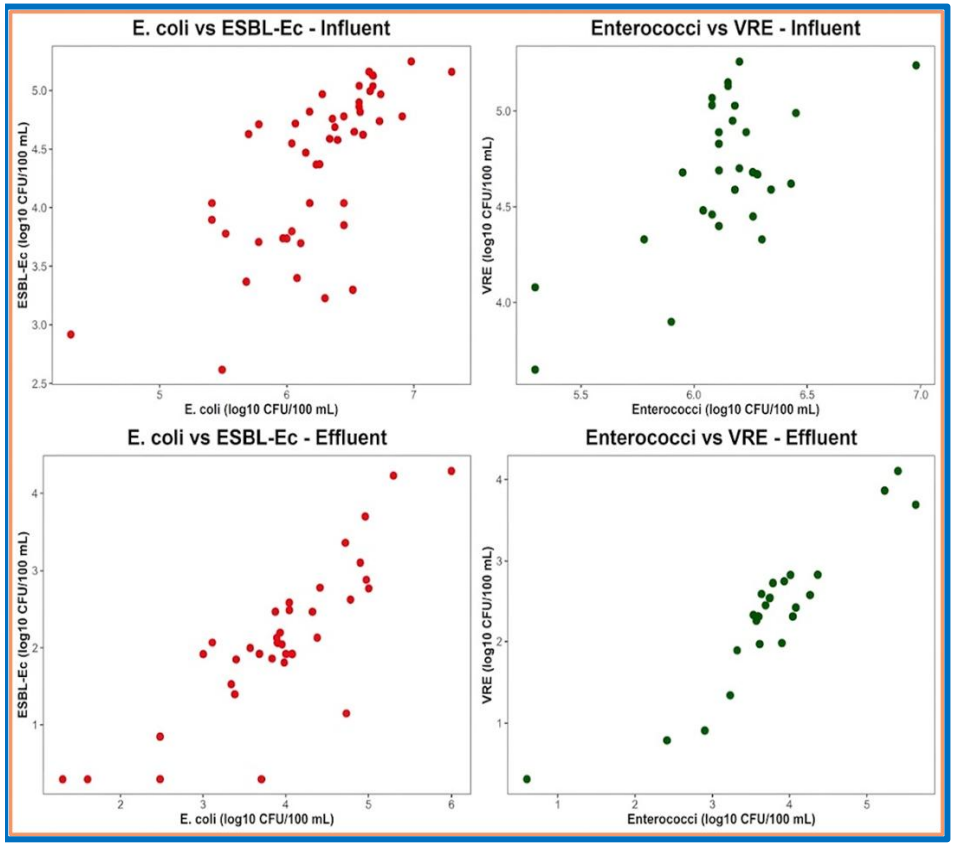
−0,03

ΔLRV mediano

p = 0,746

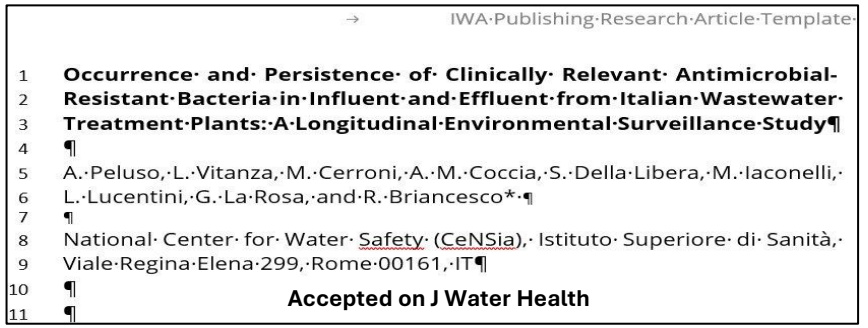
Entrambi p > 0,05

Nessuna differenza statisticamente significativa rispetto ai rispettivi indicatori.



I batteri resistenti seguono **dinamiche di abbattimento** complessivamente **comparabili** a quelle dei rispettivi indicatori.

Considerazioni conclusive e prospettive



→ IWA·Publishing·Research·Article·Template·

Occurrence· and· Persistence· of· Clinically· Relevant· Antimicrobial-Resistant·Bacteria·in·Influent·and·Effluent·from·Italian·Wastewater·Treatment·Plants:·A·Longitudinal·Environmental·Surveillance·Study¶

¶

A.·Peluso,·L.·Vitanza,·M.·Cerroni,·A.·M.·Coccia,·S.·Della·Libera,·M.·Iaconelli,·L.·Lucentini,·G.·La·Rosa,·and·R.·Briancesco*·¶

¶

National· Center· for· Water· Safety· (CeNSia),· Istituto· Superiore· di· Sanità,· Viale·Regina·Elena·299,·Rome·00161,·IT¶

¶

Accepted on J Water Health

¶

Carico in ingresso – Caratterizzazione dei reflui e sorveglianza

La presenza costante dei target negli influenti evidenzia il potenziale degli impianti di depurazione come siti di monitoraggio e sorveglianza ambientale degli ARB.

Frazione residua in uscita – Persistenza e rilascio ambientale

La persistenza di batteri vitali negli effluenti determina un rilascio ambientale il cui destino e contributo alla diffusione dell'antibiotico-resistenza sono ancora da chiarire, così come i margini di miglioramento dei trattamenti.

VERSO LA GESTIONE DEL RISCHIO

Comprendere la complessità del comportamento degli ARB negli impianti per sviluppare strategie integrate di sorveglianza e controllo.

Dai batteri isolati al sequenziamento genomico

PERCHÉ SEQUENZIARE GLI ISOLATI RESISTENTI?

- Identificare lineaggi e relazioni genetiche tra isolati
- Caratterizzare geni di resistenza e di virulenza ed elementi genetici mobili
- Valutare possibili collegamenti tra isolati ambientali, umani e animali

DUE COLLABORAZIONI DI RICERCA

***Acinetobacter baumannii* resistente ai carbapenemi**

Caratterizzazione della resistenza e sequenziamento genomico di isolati provenienti dai reflui.

Collaborazione: Sapienza Università di Roma e UniRoma5.

***Enterococcus faecium* resistente alla vancomicina (VRE)**

Confronto genomico tra isolati ambientali, umani e veterinari in prospettiva One Health.

Collaborazione: IZS Lazio e Toscana (A. Franco) e DMI-ISS (M.Monaco).

VRE: confronto genomico tra ambiente, uomo e animali

Enterococcus faecium resistente alla vancomicina · focus sui risultati ambientali

PROVENIENZA DEGLI ISOLATI

AMBIENTE

Reflui IN/OUT di 6 depuratori (Nord, Centro, Sud) e acque superficiali (fiumi, mare).

UOMO

Infezioni e colonizzazioni: ospedali del Nord, Centro e Sud Italia (rete AR-ISS).

ANIMALI

Isolati di origine animale, nell'ambito della sorveglianza veterinaria (IZS Lazio e Toscana).

Workflow comune: WGS (Illumina) e analisi bioinformatica condivisa · MLST, geni di resistenza, filogenesi

SEQUENCE TYPE IDENTIFICATI (MLST)

Risultati preliminari sui primi 33 isolati ambientali sequenziati (2025).
Aggiornamento 2026: oltre 100 isolati ambientali sequenziati complessivamente; analisi bioinformatica ancora da completare.

AMBIENTE	ST80 · ST1478 · ST612
UOMO	ST80 · ST1478 · ST117 · ST552 · ST17 · nuovo ST
ANIMALI	ST80 · ST1693 · ST1478

GENI DI RESISTENZA NEGLI ISOLATI AMBIENTALI (n = 33)

Vancomicina: ***vanA*** in 33/33 isolati; ***vanB*** in 1/33.

Altre resistenze: ***aac(6')-Ii*** (aminoglicosidi) e ***msr(C)*** (macrolidi/streptogramine), entrambi in 33/33.

ST80 compare nei tre comparti, ma la filogenesi non mostra una stretta correlazione tra gli isolati.

PNCAR 2022–2025: dalla rete SARI al monitoraggio AMR

PNCAR 2022–2025: rafforza l'approccio One Health, dedicando per la prima volta uno spazio specifico alla sorveglianza ambientale dell'AMR.

PNCAR · P. 50 | L'OPPORTUNITÀ DI VALORIZZARE LA RETE

«A tal fine va colta l'opportunità di **estendere la rete di sorveglianza** a seguito della "Raccomandazione (UE) 2021/472 della Commissione" del 17 marzo 2021 relativa a un approccio comune per il rilevamento di SARS-CoV-2 e delle sue varianti nelle acque reflue nell'UE [...]»

«Integrazione della ricerca di antibiotici, batteri resistenti e geni di resistenza nelle campagne di monitoraggio»

L'IMPULSO EUROPEO

17 MARZO 2021

Raccomandazione (UE) 2021/472

Invita MS a istituire sistemi di sorveglianza di SARS-CoV-2 e delle sue varianti nei reflui

LA RISPOSTA ITALIANA

OTTOBRE 2021 – MARZO 2023

167 impianti di depurazione

>40 laboratori della rete

Coordinamento ISS

Metodi e procedure armonizzati



LA RETE SARI (2021–2023)

Protocolli e target prioritari

Due gruppi nazionali · circa 100 esperti di 44 laboratori · protocolli pubblicati nel 2026 (sito MdS)

METODI COLTURALI

Tre gruppi di batteri resistenti:

- E. coli produttori di ESBL
- E. coli resistenti ai carbapenemi
- Enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE)

METODI MOLECOLARI (dPCR)

Quattro geni di resistenza:

- blaCTX-M · β-lattamici / ESBL
- blaKPC · carbapenemi
- vanA · vancomicina
- qnrS · fluorochinoloni

Due marcatori:

- intI1 · integrasi di classe 1
- 16S rRNA · normalizzatore

Due protocolli nazionali armonizzati, per dati confrontabili tra laboratori

Il pilota nazionale PNCAR: organizzazione e risultati attesi

OBIETTIVO

Valutare se il monitoraggio di batteri e geni di resistenza nei reflui urbani possa fornire informazioni epidemiologiche complementari alla sorveglianza clinica AR-ISS.

REGIONI E PROVINCE AUTONOME

- Piani regionali e accordi con i gestori
- Scelta dei depuratori e dei laboratori
- **Campionamenti almeno mensili dei reflui IN e analisi armonizzate**
- Invio dei risultati e condivisione dei dati AR-ISS

ISS | LIVELLO NAZIONALE

- Piattaforma nazionale per raccolta e validazione
- Coordinamento del gruppo interdisciplinare
- Analisi dei trend e confronto con i dati clinici
- Valutazione dell'utilità epidemiologica dei risultati

INDICATORI DI RISULTATO PREVISTI

Regioni Piani operativi e accordi formalizzati; almeno il **70% delle attività programmate entro il 2026** e l'**80% entro il 2027**.

ISS Relazioni sul monitoraggio e **valutazione finale delle capacità descrittive e predittive** dei dati ambientali.

Dall’obiettivo trainante all’attuazione regionale

L’Intesa Stato-Regioni del 17 aprile 2025 ha individuato il monitoraggio dell’AMR nei reflui urbani come obiettivo trainante del PNCAR nell’ambito della salute ambientale

OBIETTIVO TRAINANTE

> *«Inserire nella programmazione regionale delle attività, il monitoraggio nei reflui urbani delle resistenze batteriche agli antimicrobici secondo gli indirizzi metodologici dei gruppi di lavoro coordinati dall’Istituto Superiore di Sanità, individuando formalmente gli enti preposti».*

STATO DI ATTUAZIONE – NOVEMBRE 2026

Le attività di monitoraggio sono in fase di avvio progressivo nelle Regioni e Province autonome, con tempi di attuazione differenti.

SORVEGLIANZA / WORKSHOP NAZIONALE, BOLOGNA · 27 OTTOBRE 2026

Il monitoraggio ambientale dell'AMR è già avviato in diversi territori

I Workshop Nazionale sugli Aspetti Ambientali dell'Antimicrobico Resistenza nel Quadro del PNCAR

27 Ottobre 2026, Bologna

130
partecipanti

13
territori con contributi tecnici

14
contributi presentati

Partecipazione di tutte le Regioni e Province autonome, tranne una

- Monitoraggi di batteri resistenti (ARB) e geni di resistenza (ARG) già avviati in diverse Regioni e PA.
- Esperienze ancora eterogenee per metodi, organizzazione e disponibilità dei dati.

Tutti i contributi saranno pubblicati su *Ecoscienza* nel numero di dicembre 2026

Verso una sorveglianza ambientale coordinata e armonizzata

SORVEGLIANZA | QUADRO NORMATIVO EUROPEO

L’AMR nei reflui entra nella sorveglianza europea

Direttiva (UE) 2024/3019 sul trattamento delle acque reflue urbane · Articolo 17

≥100.000

abitanti equivalenti

Agglomerati per i quali è previsto il monitoraggio dell’AMR nelle acque reflue urbane.

COORDINAMENTO NAZIONALE

Cooperazione tra autorità sanitarie e autorità competenti per il trattamento dei reflui.

REGOLE TECNICHE EUROPEE

Gli atti di esecuzione definiscono target, metodologia e frequenza minima di campionamento (attesi entro 2026)

AVVIO DEL MONITORAGGIO

Entro la fine del secondo anno dall’adozione degli atti di esecuzione.

Il pilota nazionale prepara il passaggio a una sorveglianza europea armonizzata.

Recepimento nazionale della direttiva: entro il 31 luglio 2027

CONCLUSIONI | PROSPETTIVE

AMR nei reflui: il percorso avviato e le prossime sfide

IL PERCORSO REALIZZATO



LE PROSSIME SFIDE

- **Consolidare la rete nazionale** e garantire dati confrontabili nel tempo e tra territori.
- **Comprendere il significato epidemiologico dei dati**, attraverso un'interpretazione multidisciplinare e l'analisi dei trend spazio-temporali.
- **Valutare il contributo complementare alla sorveglianza clinica**, integrando progressivamente dati ambientali, clinici ed epidemiologici.
- **Ampliare il monitoraggio** a nuove matrici e contesti, inclusi reflui ospedalieri, acque superficiali

RICERCA SCIENTIFICA CONTINUA: approfondire la conoscenza delle resistenze e delle loro dinamiche, affinando metodi e criteri di interpretazione dei dati