

VALUTAZIONE FENOTIPICA DELL'ANTIBIOTICO RESISTENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI*, ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI POLLI DA CARNE ANTIBIOTIC FREE, BIOLOGICI E AL MACELLO

Musa L., Casagrande Proietti P., Bellucci S., Branciarri R., Menchetti L., Roila R., Giannone A., Franciosini M.P.

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Via S. Costanzo, 4, 06126 Perugia PG

Summary

This work is aimed at evaluating the spread of *E.coli* strains, resistant to several antimicrobials on the basis of different rearing systems, common in Central Italy, such as organic and antibiotic-free, and on the basis of type and time of samplings (T1 at one day; T2 at 30d; T3 at slaughter). Mac Conkey agar and biochemical tests were used for isolation and identification of *E.coli* respectively. To identify and to confirm Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) *E.coli*, Mac Conkey agar with a low concentration of cefotaxime and Cefpodoxime Combination Disc Test (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI) were used respectively. The antimicrobial susceptibility was evaluated, using disk diffusion following the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. Regardless of the rearing system, the type and sampling times, high levels of resistance against tetracycline TE, (85.6%), ampicillin AMP (66.4%) and nalidixic acid NA (60%) were observed in all of the *E.coli* isolates. In relation to the sampling times, a decrease of *E. coli* resistant strains was detected from T1 to T3 to: AMP (from 77% to 47%, $P = 0.002$), ceftazidime (CAZ) (from 31% at 2%, $P < 0.001$), cefotaxime (CTX) (from 67% to 10% $P < 0.001$), amoxicillin/ clavulanic acid (AMC) (from 36% to 4%, $P < 0.001$), and TE (95% to 71%, $P < 0.001$) As regards the type of samples, the cloacal and environmental ones presented the highest number of *E. coli* resistant to AMP, CTX, AMC, NA, SXT and TE when compared to the samples collected at slaughter. The preliminary data are encouraging especially those related to a *E.coli* resistant strain decrease in samples collected along the production cycle and at the slaughter, likely due to the application of protocols, using antimicrobials only if necessary. Finally, a control aimed at evaluating the antimicrobial susceptibility of the microbiota of grandparents is recommended since they play a determinant role in vertically transmitting resistance genes as evidenced by the high number of resistant *E.coli* strains isolated in cloacal swabs at one day.

INTRODUZIONE

La resistenza agli agenti antimicrobici (AMR) negli animali di interesse zootecnico è un problema che riveste una importanza globale in Sanità pubblica. *E. coli* è conosciuto essere tra le specie batteriche dove più rapidamente, nel corso degli anni, si è verificata la selezione di geni di resistenza a seguito dell'uso di antimicrobici (Tadesse et al., 2012). Tale microrganismo, a causa della sua elevata diffusione, è considerato un indicatore della antibiotico resistenza delle popolazioni di gram negativi e un modello per lo studio di AMR (Kaesbohrer et al., 2012). Di particolare interesse in tale ambito è il riscontro di isolati di *E.coli* multiresistenti e ESBL di cui le specie avicole, in particolare pollo e tacchino, sono considerate una importante fonte di contamina-

zione per l'uomo (De Been et al., 2014; Falgenhauer et al., 2018). L'uso indiscriminato di antibiotici nel settore avicolo ha contribuito infatti a creare l'aumento progressivo di *E. coli* resistenti alla maggiori classi di antibiotici quali chinoloni, tetracicline e beta lattamici (Van den Bogaard et al., 2000; Hricová et al., 2017). I geni responsabili della resistenza sono, inoltre, frequentemente localizzati a carico di elementi genetici trasferibili come plasmidi, pertanto *E. coli* può facilmente ricevere e trasmettere geni di resistenza antimicrobica ad altri batteri del microbiota intestinale tramite coniugazione (Carattoli et al., 2008 ;Bailey et al., 2010; Laxminarayan et al., 2013). L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di valutare in allevamenti, biologici e antibiotic-free, comuni nel centro Italia , le diffusione di ceppi di *E. coli* resistenti a diversi antibiotici in base al tipo e ai tempi del campionamento.

MATERIALI E METODI

Campionamento I campionamenti sono stati effettuati in gruppi di polli da carne broiler (Ross 308) di consistenza numerica pari a 4600/5000 capi , allevati con sistema biologico e antibiotic-free. In questo ultimo caso i soggetti sono cresciuti in ambiente condizionato, seguendo il management dell'allevamento convenzionale (piani di vaccinazione, alimentazione) tranne che per l'uso di antimicrobici. I prelievi consistenti in tamponi cloacali e campioni ambientali (mangiatoie, abbeveratoio, lettiera) sono stati raccolti in allevamento a T1 (immissione) e a T2 (a 30 gg). Al macello (T3) sono stati prelevati individualmente dalle carcasse il contenuto cecale e la pelle del collo, quindi i campioni sono stati mantenuti a temperature di refrigerazione di 4°C fino all'arrivo in laboratorio

Isolamento e Identificazione di *E. coli* . Per l'isolamento di *E. coli* i campioni posti in terreno di prearricchimento costituito da acqua peptonata tamponata (BPW) in rapporto 1:10 sono stati incubati a 37°C per 18-24 ore in aerobiosi. Da ciascun campione così diluito è stata prelevato 0.1 ml di soluzione e quindi seminato su agar Mac Conkey , incubato per 24 h a 37 °C in anaerobiosi . Le colonie con una morfologia tipica, riferibile a *E. coli* sono state confermate mediante appropriate prove biochimiche. Per l'identificazione di ceppi ESBL, gli isolati sono stati seminati su agar Mac Conkey , addizionato con basse concentrazioni (1mg/L) di cefotaxime, messo a incubare a 37 ± 1°C per 18-24 h in condizioni di aerobiosi. I ceppi cresciuti sono stati testati per la conferma della produzione di ESBL mediante il test di combinazione con cefpodoxime da solo e associato con acido clavulanico (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI)

Test di suscettibilità agli antibiotici . Per valutare la suscettibilità agli antimicrobici, è stato utilizzato il test di diffusione su agar contenente diversi antibiotici a determinate concentrazioni: ampicillina (AMP) (10µg), cefotaxime (CTX) (30µg), ceftazidime (CAZ)(30µg), amoxicillina+acido clavulanico (AMC)(30µg), acido nalidixico (NA) (30µg), ciprofloxacina (CIP) (5µg), trimetoprim/sulfametoxazolo (SXT) (25µg), (TE) tetracicline (30µg), gentamicina (CN) (10µg).

Le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. I risultati sono stati valutati secondo le linee guida di CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)

Analisi statistiche Le proporzioni relative di campioni resistenti, intermedi e sensibili erano confrontate utilizzando i test chi-quadro o di Fisher. Le proporzioni di colonna erano confrontate con il test z utilizzando la correzione di Bonferroni. Per valutare l'effetto del tempo, del tipo di allevamento e del tipo di matrice sul numero di resisten-

ze era utilizzato un modello di regressione logistica ordinale. I risultati erano espressi come odds ratio (OR) con i corrispondenti intervalli di confidenza (CI) al 95% e P value. Un valore di $P < 0.05$ era considerato significativo. Le analisi erano realizzate utilizzando il software per le analisi statistiche SPSS versione 25.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

RISULTATI

Indipendentemente dalle caratteristiche di allevamento, dal tipo e dal tempo di campionamento è stato riscontrato un elevato numero di *E.coli* resistenti nei confronti di TE (85,6%), AMP (66,4%) e NA (60 %) (Tabella 1).

Tabella 1. Suscettibilità degli isolati di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici indipendentemente dal tempo, dall'allevamento e dal tipo di campione.

	Antibiotico	Conta	N %
AMP	Resistente	83	66.4%
	Sensibile	35	28.0%
	Intermedio	7	5.6%
CAZ	Resistente	14	11.2%
	Sensibile	110	88.0%
	Intermedio	1	0.8%
CTX	Resistente	34	27.2%
	Sensibile	83	66.4%
	Intermedio	8	6.4%
AMC	Resistente	19	15.2%
	Sensibile	86	68.8%
	Intermedio	20	16.0%
NA	Resistente	75	60.0%
	Sensibile	45	36.0%
	Intermedio	5	4.0%
CIP	Resistente	35	28.0%
	Sensibile	69	55.2%
	Intermedio	21	16.8%
SXT	Resistente	49	39.2%
	Sensibile	75	60.0%
	Intermedio	1	0.8%
TE	Resistente	107	85.6%
	Sensibile	17	13.6%
	Intermedio	1	0.8%
CN	Resistente	19	15.2%
	Sensibile	103	82.4%
	Intermedio	3	2.4%

Esaminando inoltre i pattern di resistenza si osserva che il 24,8%, il 23,2% , 26,4 % e 8% di *E.coli* mostrano rispettivamente resistenza nei confronti di 2, 3,4 e 5 antibiotici (Tabella 2).

Tabella 2. Pattern di resistenza degli isolati di *E. coli* osservati indipendentemente dal tempo, dall'allevamento e dal tipo di campione.

	Antibiotici	N degli isolati	N degli isolati (%)
0	-	5	4.0%
1	CN	1	0.8%
	B-lattamici	1	0.8%
	TE	15	12.0%
2	B-lattamici, TE	19	15.2%
	Chin, TE	10	8.0%
	SXT, TE	2	1.6%
3	B-lattamici, CN, TE	15	12.0%
	B-lattamici, SXT, TE	6	4.8%
	Chin, SXT, TE	3	2.4%
	Chin, TE, CN	5	4.0%
4	B-lattamici, Chin, SXT, TE	28	22.4%
	B-lattamici, Chin, TE, CN	4	3.2%
	B-lattamici, SXT, TE, CN	1	0.8%
5	B-lattamici, Chin, SXT, TE, CN	10	8.0%

B-lattamici (AMP, CAZ CTX,AMC); Chin (NA, CIP)

Paragonando la suscettibilità degli isolati in relazione alla tipologia di allevamento risulta che un maggior numero di *E.coli* resistenti a AMC è stato isolato negli allevamenti antibiotic free rispetto a quelli biologici (25.4 % vs 6.1 % , P<0,001) (Tabella 3).

Tabella 3. Suscettibilità di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici in relazione alla tipologia di allevamento

Antibiotico	Tipo					P
	Biologico		Antibiotic free		P	
	Conta	N %	Conta	N %		
AMP	Resistente	47	71.2%	36	61.0%	0.507
	Intermedio	3	4.5%	4	6.8%	
	Sensibile	16	24.2%	19	32.2%	
CAZ	Resistente	7	10.6%	7	11.9%	0.774
	Intermedio	0	0.0%	1	1.7%	
	Sensibile	59	89.4%	51	86.4%	
CTX	Resistente	17 _a	25.8%	17 _a	28.8%	0.045
	Intermedio	1 _a	1.5%	7 _b	11.9%	
	Sensibile	48 _a	72.7%	35 _a	59.3%	
AMC	Resistente	4 _a	6.1%	15 _b	25.4%	<0.001
	Intermedio	6 _a	9.1%	14 _b	23.7%	
	Sensibile	56 _a	84.8%	30 _b	50.8%	
NA	Resistente	35	53.0%	40	67.8%	0.146
	Intermedio	2	3.0%	3	5.1%	
	Sensibile	29	43.9%	16	27.1%	
CIP	Resistente	20	30.3%	15	25.4%	0.755
	Intermedio	10	15.2%	11	18.6%	
	Sensibile	36	54.5%	33	55.9%	
SXT	Resistente	23	34.8%	26	44.1%	0.359
	Intermedio	1	1.5%	0	0.0%	
	Sensibile	42	63.6%	33	55.9%	
TE	Resistente	56	84.8%	51	86.4%	0.604
	Intermedio	0	0.0%	1	1.7%	
	Sensibile	10	15.2%	7	11.9%	
CN	Resistente	14	21.2%	5	8.5%	0.100
	Intermedio	2	3.0%	1	1.7%	
	Sensibile	50	75.8%	53	89.8%	

I valori seguiti dalla stessa lettera in ogni riga non differiscono in modo significativo ($P < 0,5$; metodo di Bonferroni).

In relazione ai tempi di campionamento si evidenzia una diminuzione nel riscontro degli isolati resistenti di *E.coli* da T1 a T3 nei confronti di: AMP (dal 77% al 47%, P=0,002), CAZ (dal 31% al 2% , P<0,001), CTX (dal 67% al 10% P<0,001) e AMC (dal 36% al 4%, P <0,001), TE (95% al 71%, P<0,001) (Tabella 4) . Va sottolineato che solo nel caso di NA e SXT pur verificandosi una diminuzione di ceppi resistenti alla macellazione (41% e 24% rispettivamente) se paragonato a quelli presenti in T1 (62% e 31% rispettivamente) si osserva un aumento dei ceppi resistenti in T2 (86% e 71% rispettivamente) (Tabella 4).

Tabella 4. Suscettibilità di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici in relazione alla tempistica dei prelievi

Antibiotico		Tempo						P
		T1		T2		T3		
		Conta	N %	Conta	N %	Conta	N %	
AMP	Resistente	30 _a	77	29 _a	83	24 _b	47	0.002
	Intermedio	3 _a	8	1 _a	3	3 _a	6	
	Sensibile	6 _a	15	5 _a	14	24 _b	47	
CAZ	Resistente	12 _a	31	1 _b	3	1 _b	2	<0.001
	Intermedio	1 _a	3	0	0	0 _a	0	
	Sensibile	26 _a	67	34 _b	97	50 _b	98	
CTX	Resistente	26 _a	67	3 _b	9	5 _b	10	<0.001
	Intermedio	7 _a	18	1 _b	3	0 _b	0	
	Sensibile	6 _a	15	31 _b	89	46 _b	90	
AMC	Resistente	14 _a	36	3 _b	9	2 _b	4	<0.001
	Intermedio	7 _a	18	6 _a	17	7 _a	14	
	Sensibile	18 _a	46	26 _b	74	42 _b	82	
NA	Resistente	24 _a	62	30 _b	86	21 _a	41	0.001
	Intermedio	2 _a	5	0 _a	0	3 _a	6	
	Sensibile	13 _{a,b}	33	5 _b	14	27 _a	53	
CIP	Resistente	12	31	9	26	14	27	0.222
	Intermedio	6	15	10	29	5	10	
	Sensibile	21	54	16	46	32	63	
SXT	Resistente	12 _a	31	25 _b	71	12 _a	24	<0.001
	Intermedio	1 _a	3	0 _a	0	0 _a	0	
	Sensibile	26 _a	67	10 _b	29	39 _a	76	
TE	Resistente	37 _a	95	34 _a	97	36 _b	71	<0.001
	Intermedio	1 _a	3	0 _a	0	0 _a	0	
	Sensibile	1 _a	3	1 _a	3	15 _b	29	
CN	Resistente	6	15	8	23	5	10	0.196
	Intermedio	1	3	2	6	0	0	
	Sensibile	32	82	25	71	46	90	

I valori seguiti dalla stessa lettera in ogni riga non differiscono in modo significativo (P<0,05; metodo di Bonferroni).

Per quanto riguarda la tipologia del campione in linea generale i tamponi cloacali e ambientali hanno presentato il più alto numero di *E.coli* resistenti nei confronti di AMP, CTX, AMC,NA, SXT e TE se paragonati ai prelievi effettuati in sede di macellazione (Tabella 5). Nel caso di CIP il numero di *E.coli* resistenti a livello a cutaneo riscontrati alla macellazione è stato più alto di quello riferito al contenuto intestinale (37,5% vs 4,5%, P<0,001) (Tabella 5) . Sono stati isolati in totale 6 ceppi di *E.coli* ESBL, 4 dall'allevamento biologico e 2 da quelli antibiotic free , di questi solo 1 è stato isolato alla macellazione a livello di contenuto cecale proveniente da pollo biologico.

Tabella 5. Suscettibilità di *E. coli* nei confronti di alcuni antibiotici e beta lattamici in relazione alla tipo di campione

	Cloacale		Ambientale		Cecale		Cutaneo		P	
	Conta	N %	Conta	N %	Conta	N %	Conta	N %		
AMP	Resistente	45a	83.3%	15a,b	71.4%	11b	50.0%	9b	37.5%	<0.001
	Intermedio	2a	3.7%	2a	9.5%	0a	0.0%	3a	12.5%	
	Sensibile	7a	13.0%	4a,b	19.0%	11b	50.0%	12b	50.0%	
CAZ	Resistente	8	14.8%	5	23.8%	1	4.5%	0	0.0%	0.067
	Intermedio	1	1.9%	0	0.0%	0	0.0%	0	0.0%	
	Sensibile	45	83.3%	16	76.2%	21	95.5%	24	100.0%	
CTX	Resistente	20a	37.0%	9a	42.9%	2a,b	9.1%	0b	0.0%	<0.001
	Intermedio	6a	11.1%	2a	9.5%	0a	0.0%	0a	0.0%	
	Sensibile	28a	51.9%	10a	47.6%	20b	90.9%	24b	100.0%	
AMC	Resistente	10a	18.5%	7a	33.3%	1a	4.5%	1a	4.2%	0.035
	Intermedio	9a	16.7%	5a	23.8%	4a	18.2%	2a	8.3%	
	Sensibile	35a,b	64.8%	9b	42.9%	17a,b	77.3%	21a	87.5%	
NA	Resistente	37a	68.5%	17a	81.0%	6b	27.3%	12a,b	50.0%	0.005
	Intermedio	2a	3.7%	0a	0.0%	2a	9.1%	1a	4.2%	
	Sensibile	15a	27.8%	4a	19.0%	14b	63.6%	11a,b	45.8%	
CIP	Resistente	9a,b	16.7%	13c	61.9%	1b	4.5%	9a,c	37.5%	<0.001
	Intermedio	12a	22.2%	4a	19.0%	3a	13.6%	2a	8.3%	
	Sensibile	33a	61.1%	4b	19.0%	18a	81.8%	13a,b	54.2%	
SXT	Resistente	27a	50.0%	10a	47.6%	4a	18.2%	5a	20.8%	0.007
	Intermedio	0a	0.0%	1a	4.8%	0a	0.0%	0a	0.0%	
	Sensibile	27a	50.0%	10a	47.6%	18a	81.8%	19a	79.2%	
TE	Resistente	51a	94.4%	21a,b	100.0%	16b,c	72.7%	17c	70.8%	0.001
	Intermedio	1a	1.9%	0a	0.0%	0a	0.0%	0a	0.0%	
	Sensibile	2a	3.7%	0a,b	0.0%	6b,c	27.3%	7c	29.2%	
CN	Resistente	10	18.5%	4	19.0%	1	4.5%	2	8.3%	0.430
	Intermedio	2	3.7%	1	4.8%	0	0.0%	0	0.0%	
	Sensibile	42	77.8%	16	76.2%	21	95.5%	22	91.7%	

I valori seguiti dalla stessa lettera in ogni riga non differiscono in modo significativo (P<0,05; metodo di Bonferroni).

DISCUSSIONE

Il nostro studio ha messo in evidenza la presenza di un numero elevato di ceppi resistenti a TE e AMP indipendentemente da tipologia di allevamento, natura e tempistica del prelievo ; un dato non del tutto sorprendente in relazione al fatto che questi antibiotici sono da tempo utilizzati in campo avicolo (Yassin et al, 2017). Dall'analisi dei pattern di resistenza risultano diffusi i ceppi caratterizzati da multiresistenza in conformità a ricerche effettuate da altri Autori (Dandachi et al., 2017; Davis et al., 2018). Nel nostro lavoro sono stati riscontrati più frequentemente ceppi di *E.coli* con resistenza multipla nei confronti di beta lattamici, ciprofloxacina , sulfametoxazolo associato a trimethoprim e tetracicline. Negli allevamenti antibiotic-free è stato evidenziato, in paragone agli allevamenti biologici, un numero significativamente più elevato di *E.coli* resistenti a amoxicillina e acido clavulanico, associazione utilizzata da tempo in medicina umana (Finlay et al., 2003) . Va ricordato che fluorochinoloni, macrolidi e beta lattamici seppure ammessi per l'uso in campo zootecnico sono considerati da WHO (2016) gli antibiotici più "critici" per il realizzarsi di fenomeni di antibiotico resistenza in umana . In relazione alla tempistica dei prelievi , indipendentemente dalla tipologia, viene osservato un verificarsi della diminuzioni di ceppi resistenti nei confronti della maggior parte di antibiotici testati quasi a sottolineare una possibile "clearance", favorita dall'assenza di trattamenti antimicrobici, che si attua a carico di una popolazione di *E.coli* , costituita perlopiù da ceppi resistenti ereditata alla nascita . Nilsson et al. (2014) hanno riportato la frequente presenza in riproduttori grandparent del gene *bla*_{CMY2} e il riscontro del clone di *E.coli* carrier di *bla*_{CMY-2} a tutti i livelli della produzione piramidale. Se consideriamo il grado di contaminazione in relazione alla natura dei campioni, i prelievi ambientali e i tamponi cloacali presentano un alto numero di ceppi resistenti, specialmente nei confronti delle tetracicline . Questa classe di antibiotici è forse la più "datata" in termini di uso in zootecnia e nonostante l'avvento di nuove molecole viene ancora impiegata, in particolare la doxiciclina, per il trattamento di forme respiratorie di natura batterica, spesso in alternativa ai chinoloni, in virtù degli elevati livelli di resistenza registrati nei confronti di questi ultimi (Endtz et al 1991; Hricová et al., 2017) A livello di macellazione si registra in linea generale una riduzione dei ceppi di *E.coli* resistenti , dovuta verosimilmente, nel caso di campioni cutanei al transito nel tunnel di refrigerazione che sicuramente può influenzare la carica batterica di superficie. Interessante è il risultato relativo al basso numero di *E.coli* resistenti riscontrati a carico dei campioni di contenuto cecale che supporta il riscontro della diminuzione dei ceppi resistenti verificatosi in tempi successivi .

CONCLUSIONI

I dati preliminari, pur confermando l'esistenza di una problematica che attualmente è definita una emergenza per la salute pubblica, risultano incoraggianti , soprattutto quelli riferiti a una diminuzione dei ceppi resistenti di *E.coli* in prelievi realizzati lungo il ciclo di produzione e alla macellazione . Ciò potrebbe essere giustificato dall'applicazione di protocolli aziendali in cui il ricorso all'antibiotico è previsto solo in caso di effettiva necessità . Viene sottolineata infine l'importanza di un controllo indirizzato a valutare la suscettibilità agli antibiotici del microbiota dei grandparents che si configurano tra i maggiori responsabili del fenomeno di antibiotico resistenza nella catena di produzione avicola come supportato dall'alto numero di *E.coli* resistenti nei tamponi cloacali isolati a 1 giorno di vita

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey JK, Pinyon JL, Anantham S e Hall R (2010). Commensal *Escherichia coli* of healthy humans - a reservoir for antibiotic resistance determinants. *J Med Microbiol* 59: 1331–1339.
2. Carattoli, A., (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 1: 117–123.
3. Dandachi I, Sokhn ES, Dahdouh AE, Azar E, El-Bazzal B, Rolain JM e Daoud Z. (2018). Prevalence and characterization of multi-drug-resistant Gram-negative Bacilli isolated from Lebanese poultry: A nationwide study. *Front Microbiol.* 9: 550
4. Davis GS, Waits K, Nordstrom L, Grande H, Weaver B, Papp K, Horwinski J, Koch B, Hungate BA, Liu CM e Price LB. (2018). Antibiotic-resistant *Escherichia coli* from retail poultry meat with different antibiotic use claims. *BMC Microbiology.* 174.
5. de Been M, Lanza VF, de Toro M, Scharringa J, Dohmen W, Du Y, Hu J, Li N, Tooming-Klunderud A, Heederik DJ, Fluit AC, Bonten MJ, Willems RJ, de la Cruz F e van Schaik W. (2014). Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLOS Genet.* 10:e1004776.
6. Endtz HP, Ruijs GJ, van Klingeren B, Jansen WH, van der Reyden T e Mouton RP. (1991). Quinolone resistance in campylobacter isolated from man and poultry following the introduction of fluoroquinolones in veterinary medicine. *J Antimicrob Chemother.* 27(2):199-208.
7. Falgenhauer L, Ghosh H, Guerra B, Yao Y, Fritzenwanker M, Fischer J, Helmuth R, Imirzalioglu C e Chakraborty T. (2017). Comparative genome analysis of IncHI2 VIM-1 carbapenemase-encoding plasmids of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from a livestock farm in Germany. *Vet Microbiol.* 200:114-117.
8. Finlay J, Miller L e Poupard JA. (2003). A review of the antimicrobial activity of clavulanate. *J Antimicrob Chemother.* 52: 18-23.
9. Hricová K, Röderová M, Pudová V, Hanulík V, Halová D, Julínková P, Dolejšká M, Papoušek I e Bardoň J. (2017). Quinolone-resistant *Escherichia coli* in poultry farming. *Cent. Eur. J. Public Health.* 25(2): 163-167.
10. Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen BA, Alt K, Guerra B e Appel B. (2012). Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. *Zoonoses Public Health* 59, 158–165
11. Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED e O Cars. (2013) Antibiotic resistance-the need for global solutions *Lancet Infect. Dis.* 13: 1057-1098
12. Nilsson O, Börjesson S, Landén A e Bengtsson B. (2014). Vertical transmission of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated AmpC (pAmpC) through the broiler production pyramid. *J. Antimicrob. Chemother.* 69(6):1497-500
13. Tadesse DA, Zhao S, Tong E, Ayers S, Singh A, Bartholomew MJ e McDermott PF. (2012). Antimicrobial drug resistance in *Escherichia coli* from hu-

- mans and food animals. *Emerg Infect Dis.* 18(5):741-9.
14. van den Bogaard AE e Stobberingh EE. (2000). Epidemiology of resistance to antibiotics. Links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 14(4):327-35.
 15. WHO. (2015). Global Action Plan on Antimicrobial Resistance . WHO, Geneva, Switzerland.
 16. Yassin AK, Gong J, Kelly P, Lu G, Guardabassi L, Wei L, Han X, Qiu H, Price S, Cheng D e Wang C. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PLoS One.* 12(9):e0185326.