# SUSCETTIBILITÀ ANTIMICROBICA DI CEPPI *ESCHERICHIA COLI* E DIFFUSIONE DI *E.COLI* ESBL IN POLLI DA CARNE BIOLOGICI, ANTIBIOTIC FREE E CONVENZIONALI ALLA MACELLAZIONE

Musa L.[1], Franciosini M.P.[1], [2], Branciari R.[1], Menchetti M.[1], Marenzoni M.L.[1] Ranucci D.[1], Shtylla Kika T.[2], Casagrande-Proietti P.[1]

[1]*Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, 06126 Perugia, Italia.*
[2]*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Agraria di Tirana, Albania.*

**Summary**
Our work investigated *Escherichia coli* susceptibility to different antimicrobials and extended-spectrum β-lactamase (ESBL) *E. coli* diffusion from samples collected in slaughterhouse from conventional (C), organic (O) and reared without antibiotics (AF) chickens. The highest number of *E. coli* strains resistant to ampicillin (89.6%), trimethoprim/sulfamethoxazole (62.2%), nalidixic acid (57.8%), ciprofloxacin (44.4%), and cefotaxime (43.7%) with prevalent patterns of multi-resistance to three (35.1%) and to four antimicrobials (31.3%) was seen in C samples as well as the highest numbers of ESBL *E. coli* while the lowest in O samples. Our results are consistent with an influence of farming typology regarding the susceptibility of *E. coli* and the presence of ESBL *E. coli,* that was highest in the samples coming from C farms , where the use of antibiotics is common. O samples exhibited the lowest value for ESBL due to a lack of antimicrobial treatment in chickens and to the possibility to have access to the outdoors, limiting also contact with litter as a potential source of resistant bacteria.

## INTRODUZIONE

L'uso indiscriminato di antibiotici nel pollame ha contribuito al progressivo aumento della resistenza batterica alle principali classi di antibiotici quali chinoloni, tetracicline e beta-lattamici (Van Den Bogaard et al., 2000; Hricovà et al., 2017). Inoltre, la continua esposizione dei batteri a una grande varietà di β-lattamici ha causato la mutazione delle β-lattamasi batteriche, responsabile dello sviluppo di resistenze anche nei confronti di β-lattamici di nuova generazione. Questi enzimi sono noti come β-lattamasi a spettro esteso (ESBL). *Escherichia coli* è una delle specie batteriche in cui la selezione dei geni di resistenza è avvenuta più rapidamente negli anni a seguito dell'uso diffuso e improprio di antimicrobici (Tadesse et al., 2012). I geni responsabili della resistenza sono spesso localizzati in elementi genetici trasferibili come plasmidi e integroni (Ahmed et al., 2013; Cavicchio et al., 2015) e gli *E. coli* patogeni e commensali possono facilmente ricevere geni di resistenza antimicrobica e trasmetterli ad altri batteri del microbiota intestinale anche per coniugazione (Carattoli et al., 2008; Laxminarayan et al., 2013). In questo scenario, polli e tacchini commerciali sono considerati un importante serbatoio di isolati multiresistenti di *E. coli* ed *E.coli* ESBL per l'uomo (Falgenhauer et al., 2019). Per garantire al consumatore una maggiore sicurezza alimentare, numerose aziende avicole si sono rivolte a linee di prodotti ottenute da allevamenti antibio-

tic- free e biologici ottenuti senza o limitando l'uso di antibiotici. In alternativa all'impiego degli antimicrobici attualmente il controllo delle malattie in campo avicolo, soprattutto per *E. coli*, si basa in prevalenza sulla qualità dell'ambiente e del management e sull'utilizzo di prodotti alternativi quali prebiotici , probiotici e vaccini autogeni (Fanatico et al., 2009; Diaz-Sanchez et al., 2015; Koutsianos et al., 2020). L'azione esercitata dal sistema di allevamento, nel controllo dei batteri resistenti agli antibiotici nelle carcasse di pollo (Cui et al., 2005; Miranda et al., 2008), presenta spesso aspetti contraddittori. Da studi condotti da Kim et al. (2018) è emerso che nel caso di *Enterococcus* spp. i tassi di contaminazione batterica erano inferiori nelle carcasse di pollo biologico rispetto alle carcasse di pollo ottenuto da allevamenti convenzionali, così come il livello di resistenza a determinati antibiotici e la presenza di ceppi multiresistenti. Al contrario, Parker et al. (2016) hanno dimostrato la presenza di Salmonelle ESBL in prodotti a base di carne di pollo ottenuti da allevamenti antibiotic-free ed inoltre la mancanza di differenze tra i loro geni ESBL e quelli di Salmonelle isolate da prodotti a base di carne di pollo allevato tradizionalmente. L'obbiettivo di questo lavoro è stato quello di contribuire a definire il ruolo giocato da diverse tipologie di allevamento (convenzionale, biologico e antibiotic-free) nell'influenzare la suscettibilità antimicrobica dei ceppi di *E. coli* e la diffusione di *E. coli* ESBL, in campioni prelevati al macello da soggetti all'arrivo e alla macellazione

## MATERIALI E METODI

*Campionamento*

Un totale di 406 ceppi di *E. coli* sono stati isolati da tamponi cloacali e da campioni di pelle al macello. In particolare, 135 *E. coli* sono stati raccolti da polli convenzionali (C) (68 ceppi da tamponi cloacali e 67 da campioni di pelle), 131 da polli allevati senza antibiotici (AF ) (64 ceppi da tamponi cloacali e 67 da campioni di pelle), 140 da polli biologici (O) (70 ceppi da tamponi cloacali e 70 da campioni di pelle). I tamponi cloacali (7 per ogni allevamento) sono stati eseguiti individualmente all'arrivo al macello e campioni di pelle (7 per ogni allevamento) sono stati anche raccolti individualmente dalle carcasse alla uscita del tunnel di refrigerazione. Sono stati considerati dieci allevamenti per ogni tipologia di allevamento esaminata.

*Isolamento e identificazione di E. coli e di E.coli ESBL*

Sia i tamponi cloacali che i campioni di pelle sono stati posti in un terreno di pre-arricchimento costituito da acqua peptonata (BPW) in un rapporto di 1:10 e sono stati quindi incubati a 37° C per 18-24 ore in aerobiosi; 0. 1 ml di ciascun campione diluito è stato seminato su agar MacConkey e su agar MacConkey, aggiunto a una bassa concentrazione (1 mg /L) di cefotaxime (Thermo Fisher Scientific, MI, Italia). Le piastre sono state incubate per 24 ore a 37 ° C in condizioni aerobiche. Tutte le colonie con morfologia tipica di *E. coli* sono state selezionate e confermate da test biochimici (ISO). Per tutti gli *E. coli*, la produzione di ESBL è stata confermata dal test del disco combinato con cefotaxime e ceftazidime da sole e in combinazione con acido clavulanico e dal metodo di microdiluizione utilizzando piastre beta-lattamasi a spettro esteso Sensititre ™ (Thermo Fisher Scientific, MI, Italia). I risultati sono stati valutati secondo le linee guida del Clinical and

Laboratory Standards Institute (CLSI).

*Test di sensibilità agli antibiotici*
Per valutare la suscettibilità antimicrobica, tutti gli isolati di *E. coli* sono stati analizzati su piastre di agar Mueller-Hinton (Thermo Fisher Scientific, MI, Italia), contenenti ampicillina (AMP) (10 µg), cefotaxime (CTX) (30 µg), ceftazidime ( CAZ) (30 µg), amoxicillina / acido clavulanico (AMC) (30 µg), acido nalidixico (NA) (30 µg), ciprofloxacina (CIP) (5 µg), trimetoprim / sulfametossazolo (SXT) (25 µg), ( TET) tetraciclina (30 µg), gentamicina (CN) (10 µg). Le piastre sono state incubate a 37 ° C per 24 ore in condizioni di aerobiosi .

*Analisi statistica*
Sono stati utilizzati modelli lineari generalizzati (GLM) per valutare l'effetto dell'allevamento (tre livelli: allevamenti convenzionali, antibiotic-free e biologici) e il tipo di campione (due livelli: prelievi cutanei e tamponi cloacali). Il logit multinomiale e cumulativo erano rappresentati dalla distribuzione di probabilità e la funzione di collegamento, rispettivamente, e utilizzate per valutare ciascuna resistenza agli antibiotici classificata come sensibile, intermedia e resistente. Per analizzare *E. coli* ESBL, distribuzione binomiale e logit sono stati utilizzati rispettivamente come modello di distribuzione di probabilità e funzione di collegamento. Inoltre, sono stati utilizzati z-test con correzione Bonferroni per confrontare le proporzioni delle colonne. Per valutare i fattori che influenzano il numero di ceppi di resistenza, sono stati utilizzati la distribuzione di Poisson e la funzione Log link. I pattern di multiresistenza che includevano ≥10 eventi per variabile (EPV) (Peduzzi et al., 1995) sono stati codificati come 0 (negativo) e 1 (positivo) e analizzati mediante modelli lineari generalizzati GLM. Questi modelli hanno utilizzato la distribuzione binomiale e logit come distribuzione di probabilità e funzione di collegamento, rispettivamente, e hanno valutato l'effetto dell'allevamento e del tipo di campione. Le distribuzioni all'interno delle variabili categoriche sono state valutate utilizzando il test chi quadrato come test di bontà per l'adattamento, assumendo che tutte le categorie siano uguali. Un valore P <0,05 è stato considerato statisticamente significativo. Tutte le analisi sono state eseguite utilizzando il software di analisi statistica SPSS versione 25.0 (IBM Inc., Chicago, IL, USA).

## RISULTATI
Indipendentemente dal sistema di allevamento e dal tipo di campione, il numero più alto di *E. coli* resistente è stato osservato per l'ampicillina (76,6%), seguito da tetraciclina (68,4%), acido nalidixico (43,6%), trimetoprim / sulfametossazolo (40,1%) e amoxicillina / acido clavulanico (35,7%). In totale, il 30,5% e il 29,6% dei ceppi sono risultati resistenti rispettivamente a cefotaxime e ciprofloxacina e l'11,8% e il 10,8% dei ceppi erano resistenti rispettivamente alla gentamicina e alla ceftazidima .Confrontando la suscettibilità degli isolati in base al sistema di allevamento (Tabella 1), i livelli più alti di resistenza per ampicillina (89,6% P = 0,002), cefotaxime (43,7%; P = 0,001), acido nalidixico (57,8%; P = 0,001), ciprofloxacina (44,4%; P <0,001) e trimetoprim / sulfametossazolo (62,2%; P> 0,001) sono stati osservati in *E. coli* isolato da campioni di pollo allevato in maniera convenzionale. È stata riscontrata una elevata prevalenza di ceppi di *E. coli*

resistenti in campioni AF, O e C per la tetraciclina (rispettivamente 71%, 65,7% e 68,9%). Rispetto al tipo di campioni, sono state riscontrate differenze nella resistenza antimicrobica per amoxicillina / acido clavulanico e ciprofloxacina (P <0,01)( Tabella 1). La maggior parte degli *E. coli* isolati dai polli convenzionali ha mostrato un pattern di multi-resistenza a tre antimicrobici (35,1%), con prevalenza del profilo beta-lattamici/trimetoprim-sulfametossazolo/tetraciclina (P <0,001) e a quattro antimicrobici (31,3%) con prevalenza di un profilo beta-lattamici/chinoloni / trimetoprim-sulfametossazolo/tetraciclina (P <0,001)(Tabella 2). I ceppi di *E. coli* isolati da campioni O e AF hanno rivelato un pattern di co-resistenza del 29,2% e del 39,0%, rispettivamente con prevalenza del profilo beta-lattamici/tetraciclina (P <0,001). Il numero di *E. coli* resistente ai beta-lattamici/tetraciclina isolati da campioni C era inferiore a quello riscontrato per campioni O e AF (P <0,05), mentre gli isolati di *E. coli* da polli C hanno mostrato un pattern di multi-resistenza verso beta-lattamici/chinoloni / trimetoprim-sulfametossazolo / tetraciclina significativamente più alto rispetto a quello osservato per allevamenti O e AF (P <0,05; Tabella 3). Settantadue ceppi di *E. coli* ESBL (18,6%) sono stati isolati da tutti i campioni; in particolare per quanto riguarda quelli cloacali 19 (27,9%) sono stati isolati da C, 7 (10,9%) da AF e 9 (12,9%) da O . Gli isolati di *E. coli* ESBL dalla pelle sono stati 1 da O(1,4%), 15 da AF (22,4%) e 21 da C (31,3%) (p <0,001)( Tabella 4).

## DISCUSSIONE

L'emergere della resistenza agli antibiotici negli animali e nell'uomo ha portato a cambiamenti nel settore zootecnico finalizzati ad una sempre più progressiva riduzione dell'uso degli antimicrobici, sia come metafilassi che come strumenti terapeutici. Sono aumentate le aziende con una gestione che prevede l'uso di antibiotici solo se strettamente necessario, come nel caso di allevamenti biologici e antibiotic-free. Nel nostro lavoro, indipendentemente dalla tipologia di campionamento e di allevamento, è stato riscontrato un numero elevato di ceppi resistenti di *E. coli* per ampicillina, tetraciclina e acido nalidixico, seguiti da trimetoprim sulfametossazolo e amoxicillina acido clavulanico. Tutte queste molecole, utilizzate da anni nella terapia e prevenzione del pollame, hanno favorito la selezione di batteri resistenti (Wassenaar et al., 2005) condivisibili con la popolazione umana tramite contaminazione alimentare o ambientale, nonché mediante contatto diretto con gli animali (Diarra et al., 2007; Ljubojevic et al., 2016;). Il numero di ceppi di *E. coli* resistenti ad ampicillina, acido nalidixico, cefotaxime, ciprofloxacina, trimetoprim/sulfametossazolo è risultato significativamente più alto nei campioni di pollo allevato convenzionalmente, supportando l'ipotesi che l'uso di antibiotici in questo management possa esercitare una pressione selettiva sulla comunità microbica, facilitando così la persistenza e il trasferimento dei geni di resistenza tra le specie batteriche (Wright et al., 2010; Andersson et al., 2012). Uno studio recente ha mostrato una maggiore prevalenza di resistenza tra gli isolati di *E. coli* dai tacchini da carne convenzionali rispetto ai tacchini antibiotic-free e biologici, ma non sono state osservate differenze nella suscettibilità antimicrobica negli isolati di *E. coli* ottenuti da polli da carne (Davis et al., 2018). Mollenkopf et al. (2014) non hanno isolato batteri resistenti a farmaci antimicrobici di importanza critica, come cefalosporine, polimixine, chinoloni e macrolidi (WHO, 2019) tra i prodotti a base

di pollo biologico e quelli originati dall'allevamento convenzionale. Nel nostro lavoro, un certo numero di ceppi di *E. coli* resistenti alla tetraciclina e all'ampicillina sono stati isolati anche da campioni biologici e antibiotic-free nonostante l'assenza dell'uso di antimicrobici. In tal caso non deve essere trascurata l'azione esercitata dall'ambiente esterno, spesso contaminato da batteri resistenti del suolo o tramite feci di uccelli selvatici (Rizzo et al., 2013; Boy-Roura et al., 2018). E' da segnalare anche la presenza di ceppi resistenti nei pulcini di un giorno, probabilmente infettati per via verticale (Bortolaia et al., 2010; Jiménez-Belenguer et al., 2016). È tuttavia possibile la contaminazione nell'incubatoio stesso o durante il trasporto in azienda ( Projahn et al., 2018); in questo momento, infatti, la colonizzazione precoce di batteri resistenti potrebbe essere favorita anche dalla presenza di una flora intestinale immatura e non sufficientemente competitiva (Persoons et al., 2011). Considerando la tipologia dei campioni, il numero di ceppi di *E. coli* isolati da campioni cloacali sensibili per amoxicillina / acido clavulanico è risultato maggiore rispetto a quello di *E. coli* isolati in campioni di pelle. In questo contesto potrebbe svolgere un ruolo il periodo di digiuno a cui è sottoposto il pollo prima del trasporto al macello, al fine di ridurre il rilascio di feci. Non c'è dubbio che il macello rappresenti un ambiente responsabile della contaminazione crociata da parte di batteri resistenti, soprattutto durante la fase di scottatura, iugulazione ed eviscerazione del pollame (Gregova et al., 2012). La prevalenza di un pattern di resistenza a quattro antibiotici è risultata più alta nei campioni convenzionali rispetto a quelli biologici e antibiotic-free. I profili di multi-resistenza erano spesso rappresentati da tetraciclina, trimetoprim /sulfametossazolo e molecole incluse nella classe dei beta-lattamici e dei chinoloni, a causa del loro uso estensivo negli allevamenti avicoli nel corso degli anni. È noto che la resistenza multipla ai farmaci è frequente a osservarsi nel pollame (Amador et al., 2019) e gli *E. coli* isolati da broiler industriali mostrano resistenza a molteplici agenti antibatterici usati nella terapia umana ( Nhung et al., 2017; EFSA, 2018). Inoltre, il grado di multi-resistenza negli isolati di *E. coli* è più elevato nei polli da carne rispetto ad altri gruppi di animali da allevamento (Hanon et al., 2015). Chuppava et al. (2019) hanno mostrato che lo stretto contatto con la lettiera per la maggior parte del ciclo di produzione del pollo da carne allevato in maniera convenzionale può influenzare la quantità di ceppi multi-resistenti . I nostri risultati concordano con indagini precedenti che riportavano resistenza in *E. coli* isolato da allevamenti di pollame convenzionali a molte classi di antibiotici, inclusi i fluorochinoloni β-lattamici, tetracicline e sulfonamidi (Amador et al., 2019; Chuppava et al., 2019). I polli convenzionali hanno mostrato la percentuale più alta di *E. coli* ESBL, nei campioni cloacali e cutanei, seguiti dai polli antibiotic-free, mentre i polli biologici hanno mostrato la percentuale più bassa specialmente nei campioni di pelle. Il valore più basso si è osservato per i campioni di pollo biologico, supportando l'ipotesi che questi soggetti, a differenza di quanto si verifica nel convenzionale, potendo usufruire di parchetti esterni, limitano il contatto con la lettiera e quindi con le feci. I nostri risultati non sono in accordo con precedenti indagini condotte su prodotti a base di carne di pollo sia biologici che convenzionali, che non hanno riportato differenze considerevoli nel numero di *E. coli* ESBL (Cohen Stuart et al., 2012). Negli ultimi anni, i batteri ESBL provenienti da prodotti alimentari di origine animale hanno rappresentato una minaccia allarmante per la salute pubblica, poiché i

beta-lattamici sono comunemente usati in medicina umana, da soli o associati agli inibitori delle beta-lattamasi. Un recente studio ha riportato che i cloni di *E. coli* resistenti alle cefalosporine, rilevati nell'uomo, sono frequentemente associati a malattie umane e provengono da prodotti alimentari di origine animale (Lazarus et al., 2015), sebbene altri studi abbiano dimostrato che il contributo del pollame è limitato (Borjesson et al 2016; Dorado-Garcia et al., 2018).

## CONCLUSIONI

I nostri risultati hanno dimostrato che i sistemi di allevamento giocano un ruolo nel determinismo della resistenza agli antibiotici poiché i campioni provenienti da allevamenti convenzionali hanno presentato il numero più alto sia di ceppi di *E. coli* resistenti alla maggior parte degli antimicrobici testati sia di ceppi con profili di multi-resistenza. Un contatto limitato con la lettiera e la possibilità di usufruire di parchetti esterni durante la loro vita produttiva potrebbe giustificare il numero più basso di *E. coli* ESBL riportato nei campioni biologici. Tuttavia, non va trascurato che un numero di ceppi di *E. coli* resistenti sono stati riscontrati anche da campioni provenienti da soggetti biologici e antibiotic-free. In questo contesto la trasmissione verticale e / o la contaminazione precoce alla schiusa potrebbero rivestire un ruolo determinante insieme alla contaminazione da parte dell'ambiente esterno nel caso dell'allevamento biologico. Sono necessari ulteriori studi per approfondire le nostre conoscenze relativamente al circuito epidemiologico della resistenza agli antibiotici a partire da monitoraggi frequenti e continui della catena di produzione del pollo al fine di ottimizzare le misure di biosicurezza e garantire la sicurezza del prodotto finale.

**Tabella 1**. Effetto della tipologia del campione e dei diversi sistemi di allevamento sulla suscettibilità degli isolati di *E. coli*

| | | Allevamento | | | | | | Valore P | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | AF | | O | | C | | | | |
| | | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | Allevamento | Campione | Interazione |
| AMP | Resistente | 89a | 67.9% | 101a | 72.1% | 121b | 89.6% | | | |
| | Intermedio | 13a | 9.9% | 12a,b | 8.6% | 3b | 2.2% | **0.002** | 0.154 | 0.051 |
| | Sensibile | 29a | 22.1% | 27a | 19.3% | 11b | 8.1% | | | |
| CAZ | Resistente | 12a,b | 9.2% | 8b | 5.7% | 24a | 17.8% | | | |
| | Intermedio | 13a | 9.9% | 2b | 1.4% | 10a | 7.4% | **0.001** | 0.791 | 0.230 |
| | Sensibile | 106a | 80.9% | 130b | 92.9% | 101a | 74.8% | | | |
| CTX | Resistente | 31a | 23.7% | 34a | 24.3% | 59b | 43.7% | | | |
| | Intermedio | 8a | 6.1% | 4a | 2.9% | 5a | 3.7% | **0.001** | 0.520 | **0.003** |
| | Sensibile | 92a | 70.2% | 102a | 72.9% | 71b | 52.6% | | | |
| AMC | Resistente | 44a | 33.6% | 44a | 31.4% | 57a | 42.2% | | | |
| | Intermedio | 26a | 19.8% | 16a | 11.4% | 24a | 17.8% | 0.114 | **0.002** | **0.016** |
| | Sensibile | 61a | 46.6% | 80b | 57.1% | 54a | 40.0% | | | |
| NA | Resistente | 44a | 33.6% | 55a | 39.3% | 78b | 57.8% | | | |
| | Intermedio | 12a | 9.2% | 2b | 1.4% | 4a,b | 3.0% | **0.001** | 0.683 | 0.087 |
| | Sensibile | 75a | 57.3% | 83a | 59.3% | 53b | 39.3% | | | |
| CIP | Resistente | 27a | 20.6% | 33a | 23.6% | 60b | 44.4% | | | |
| | Intermedio | 15a | 11.5% | 24a | 17.1% | 28a | 20.7% | **<0.001** | **0.005** | **0.008** |
| | Sensibile | 89a | 67.9% | 83a | 59.3% | 47b | 34.8% | | | |
| SXT | Resistente | 44a | 33.6% | 35a | 25.0% | 84b | 62.2% | | | |
| | Intermedio | 8a | 6.1% | 4a,b | 2.9% | 1b | 0.7% | **<0.001** | 0.952 | **0.038** |
| | Sensibile | 79a | 60.3% | 101a | 72.1% | 50b | 37.0% | | | |
| TET | Resistente | 93a | 71.0% | 92a | 65.7% | 93a | 68.9% | | | |
| | Intermedio | 5a | 3.8% | 5a | 3.6% | 0a | 0.0% | 0.645 | 0.642 | 0.326 |
| | Sensibile | 33a | 25.2% | 43a | 30.7% | 42a | 31.1% | | | |
| CN | Resistente | 15a,b | 11.5% | 10b | 7.1% | 23a | 17.0% | | | |
| | Intermedio | 9a | 6.9% | 5a,b | 3.6% | 1b | 0.7% | 0.185 | 0.775 | 0.083 |
| | Sensibile | 107a | 81.7% | 125a | 89.3% | 111a | 82.2% | | | |

I valori in ogni riga seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo (P <0,05; metodo di Bonferroni). In grassetto i valori di probabilità significativi
Ampicillina (AMP), cefotaxime (CTX), ceftazidima (CAZ), amoxicillina / acido clavulanico (AMC), acido nalidixico (NA), ciprofloxacina (CIP), trimetoprim / sulfametossazolo (SXT), tetraciclina (TET) e gentamicina.
AF=Antibiotic-free; O=Biologico;C=Convenzionale

**Tabella 2**. Pattern di resistenza dei ceppi di *E. coli* isolati da soggetti provenienti da allevamenti antibiotic-free (AF) , biologico (O) e convenzionale (C)

| Pattern | Allevamento | | | | | | Pattern di resistenza antimicrobica | Allevamento | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AF | | O | | C | | | AF | | O | | C | |
| | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % |
| 1 | 28 | 23.3% | 37 | 27.2% | 10 | 7.6% | | | | | | | |
| 2 | 35 | 29.2% | 53 | 39.0% | 23 | 17.6% | BL/CN | 1 | 0.3% | 0 | 0.0% | 0 | 0.0% |
| | | | | | | | BL/CHIN | 4 | 1.0% | 13 | 3.4% | 3 | 0.8% |
| | | | | | | | BL/SXT | 0 | 0.0% | 6 | 1.6% | 12 | 3.1% |
| | | | | | | | BL/TET | 26 | 6.7% | 25 | 6.5% | 7 | 1.8% |
| | | | | | | | CHIN/CN | 0 | 0.0% | 1 | 0.3% | 1 | 0.3% |
| | | | | | | | CHIN/SXT | 0 | 0.0% | 1 | 0.3% | 0 | 0.0% |
| | | | | | | | CHIN/TET | 2 | 0.5% | 7 | 1.8% | 0 | 0.0% |
| | | | | | | | SXT/TET | 1 | 0.3% | 0 | 0.0% | 0 | 0.0% |
| | | | | | | | TET/CN | 1 | 0.3% | 0 | 0.0% | 0 | 0.0% |
| 3 | 32 | 26.7% | 23 | 16.9% | 46 | 35.1% | BL/CHIN/CN | 0 | 0.0% | 1 | 0.3% | 0 | 0.0% |
| | | | | | | | BL/CHIN/SXT | 3 | 0.8% | 2 | 0.5% | 11 | 2.8% |
| | | | | | | | BL/CHIN/TET | 12 | 3.1% | 15 | 3.9% | 20 | 5.2% |
| | | | | | | | BL/SXT/TET | 14 | 3.6% | 3 | 0.8% | 12 | 3.1% |
| | | | | | | | BL/TET/CN | 2 | 0.5% | 1 | 0.3% | 2 | 0.5% |
| | | | | | | | CHIN/SXT/ TET | 1 | 0.3% | 1 | 0.3% | 1 | 0.3% |
| 4 | 20 | 16.7% | 19 | 14.0% | 41 | 31.3% | BL/CHIN/ SXT/CN | 0 | 0.0% | 0 | 0.0% | 2 | 0.5% |
| | | | | | | | BL/CHIN/ SXT/TET | 19 | 4.9% | 17 | 4.4% | 32 | 8.3% |
| | | | | | | | BL/CHIN/TET/ CN | 0 | 0.0% | 2 | 0.5% | 4 | 01.0% |
| | | | | | | | BL/SXT/TET/ CN | 1 | 0.3% | 0 | 0.0% | 3 | 0.8% |
| 5 | 5 | 4.2% | 4 | 2.9% | 11 | 8.4% | BL/CHIN/ SXT/TET/CN | 5 | 1.3% | 4 | 1.0% | 11 | 2.8% |

BL = beta-lattamici (AMP, AMC, CAZ, CTX); CHIN = chinoloni (CIP, NA), SXT = trimetoprim / sulfametossazolo, TET = tetraciclina, CN = gentamicina

**Tabella 3**. Effetto del campione e della tipologia dell'allevamento sui profili di resistenza.

| Pattern di resistenza antimicrobica | Allevamento | | | | | | Valore P | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AF | | O | | C | | Allevamento | Campione |
| | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | | |
| **BL/CHIN** | 4a,b | 2.9% | 13b | 9.3% | 3a | 2.1% | **0.012** | 1.000 |
| **BL/TET** | 26a | 18.6% | 25a | 17.9% | 7b | 5.0% | **0.002** | 0.587 |
| **BL/CHIN/TET** | 12a | 8.6% | 15a | 10.7% | 20a | 14.3% | 0.287 | 0.655 |
| **BL/SXT/ TET** | 14a | 10.0% | 3b | 2.1% | 12°a,b | 8.6% | **0.041** | 0.835 |
| **BL/CHIN/SXT/TET** | 19a | 13.6% | 17a | 12.1% | 32b | 22.9% | **0.041** | 0.165 |
| **BL/CHIN/SXT/TET/CN** | 5a | 3.6% | 4a | 2.9% | 11a | 7.9% | 0.130 | 0.349 |

I valori in ogni riga seguiti dalla stessa lettera non differiscono in modo significativo (P <0,05; metodo di Bonferroni). In grassetto i valori di probabilità significativi
BL = beta-lattamici (AMP, AMC, CAZ, CTX); CHIN = chinoloni (CIP, NA), SXT = trimetoprim / sulfametossazolo, TET = tetraciclina, CN = gentamicina.
AF=Antibiotic-free; O=Biologico;C=Convenzionale

**Tabella 4**. Isolati di *E. coli* ESBL in campioni cloacali e cutanei provenienti da allevamenti antibiotic-free (AF), biologici (O) e convenzionali (C).

| Tipo di campione | | Tipo di allevamento | | | | | | Valore P | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | F | | O | | C | | Allevamento | Campione | Interazione |
| | | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | *E.coli* (No) | % | | | |
| **Cloacale** | **Negativo** | 57a | 89.1% | 61a | 87.1% | 49b | 72.1% | **<0.001** | 0.281 | **0.021** |
| | **Positivo** | 7a | 10.9% | 9a | 12.9% | 19b | 27.9% | | | |
| **Cutaneo** | **Negativo** | 52a | 77.6% | 69b | 98.6% | 46a | 68.7% | | | |
| | **Positivo** | 15a | 22.4% | 1b | 1.4% | 21a | 31.3% | | | |

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

**BIBLIOGRAFIA**


1. Ahmed, A.M.; Shimamoto, T.; Shimamoto, T. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic Escherichia coli isolated from septicemic broilers. Int. J. Med. Microbiol. 2013, 303, 475–483.
2. Amador, P.; Fernandes, R.; Prudêncio, C.; Duarte, I. Prevalence of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant enterobacteriaceae on portuguese livestock manure. Antibiotics 2019, 8.
3. Andersson, D.I.; Hughes, D. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. Drug Resist. Updat. 2012, 15, 162–172.
4. Börjesson, S.; Ny, S.; Egervärn, M.; Bergström, J.; Rosengren, Å.; Englund, S.; Löfmark, S.; Byfors, S. Limited dissemination of extended-spectrum β-lactamase– and plasmid-encoded AmpC–producing escherichia coli from food and farm animals, sweden. Emerg. Infect. Dis. 2016, 22, 634–640.
5. Bortolaia, V.; Bisgaard, M.; Bojesen, A.M. Distribution and possible transmission of ampicillin- and nalidixic acid-resistant Escherichia coli within the broiler industry. Vet. Microbiol. 2010, 142, 379–386
6. Boy-Roura, M.; Mas-Pla, J.; Petrovic, M.; Gros, M.; Soler, D.; Brusi, D.; Menció, A. Towards the understanding of antibiotic occurrence and transport in groundwater: Findings from the Baix Fluvià alluvial aquifer (NE Catalonia, Spain). Sci. Total Environ. 2018, 612, 1387–1406.
7. Carattoli, A. Animal reservoirs for extended spectrum β-lactamase producers. Clin. Microbiol. Infect. 2008, 14, 117–123.
8. Cavicchio, L.; Dotto, G.; Giacomelli, M.; Giovanardi, D.; Grilli, G.; Franciosini, M.P.; Trocino, A.; Piccirillo, A. Class 1 and class 2 integrons in avian pathogenic Escherichia coli from poultry in Italy. Poult. Sci. 2015, 94, 1202–1208
9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th ed.; CLSI supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2019. 26.
10. Chuppava, B.; Keller, B.; Abd El-Wahab, A.; Sürie, C.; Visscher, C. Resistance reservoirs and multi-drug resistance of commensal escherichia coli from excreta and manure isolated in broiler houses with different flooring designs. Front. Microbiol. 2019, 10.
11. Cohen Stuart, J.; van den Munckhof, T.; Voets, G.; Scharringa, J.; Fluit, A.; Hall, M.L. Van Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. Int. J. Food Microbiol. 2012, 154, 212–214
12. Cui, S.; Ge, B.; Zheng, J.; Meng, J. Prevalence and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. and Salmonella serovars in organic chickens from Maryland retail stores. Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71, 4108–4111.
13. Davis, G.S.; Waits, K.; Nordstrom, L.; Grande, H.; Weaver, B.; Papp, K.; Horwinski, J.; Koch, B.; Hungate, B.A.; Liu, C.M.; et al. Antibiotic-Resistant Escherichia coli from retail poultry meat with different antibiotic use claims. BMC Microbiol. 2018, 18.
14. Diarra, M.S.; Silversides, F.G.; Diarrassouba, F.; Pritchard, J.; Masson, L.; Brousseau, R.; Bonnet, C.; Delaquis, P.; Bach, S.; Skura, B.J.; et al. Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, Clostridium perfringens and Enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in Escheric. Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, 6566–6576

15. Diaz-Sanchez, S.; Moscoso, S.; de los Santos, F.S.; Andino, A.; Hanning, I. Antibiotic use in poultry: A driving force for organic poultry production. Food Prot. Trends 2015, 35, 440–447. 20. Cui, S.; Ge, B.; Zheng, J.; Meng, J. Prevalence and antimicrobial resistance of Campylobacter spp. and Salmonella serovars in organic chickens from Maryland retail stores. Appl. Environ. Microbiol. 2005, 71, 4108–4111.
16. Dorado-García, A.; Smid, J.H.; van Pelt, W.; Bonten, M.J.M.; Fluit, A.C.; van den Bunt, G.; Wagenaar, J.A.; Hordijk, J.; Dierikx, C.M.; Veldman, K.T.; et al. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from humans, animals, food and the environment: A pooled analysis. J. Antimicrob. Chemother. 2018, 73, 339–347.
17. European Food Safety Authority (EFSA); European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA J. 2018, 16.
18. Falgenhauer, L.; Imirzalioglu, C.; Oppong, K.; Akenten, C.W.; Hogan, B.; Krumkamp, R.; Poppert, S.; Levermann, V.; Schwengers, O.; Sarpong, N.; et al. Detection and characterization of ESBL-Producing Escherichia coli from humans and poultry in Ghana. Front. Microbiol. 2019, 9, 3358.
19. Fanatico, A.C.; Owens, C.M.; Emmert, J.L. Organic poultry production in the United States: Broilers. J. Appl. Poult. Res. 2009, 18, 355–366.
20. Gregova, G.; Kmetova, M.; Kmet, V.; Venglovsky, J.; Feher, A. Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from a poultry slaughterhouse. Ann. Agric. Environ. Med. 2012, 19, 75–77.
21. Hanon, J.B.; Jaspers, S.; Butaye, P.; Wattiau, P.; Méroc, E.; Aerts, M.; Imberechts, H.; Vermeersch, K.; Van der Stede, Y. A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal Escherichia coli from several livestock species in Belgium (2011–2014). Prev. Vet. Med. 2015, 122, 443–452
22. Hricová, K.; Röderová, M.; Pudová, V.; Hanulík, V.; Halová, D.; Julínková, P.; Dolejská, M.; Papoušek, I.; Bardo ˇn, J. Quinolone-Resistant escherichia coli in poultry farming. Cent. Eur. J. Public Health 2017, 25, 163–167.
23. Jiménez-Belenguer, A.; Doménech, E.; Villagrá, A.; Fenollar, A.; Ferrús, M.A. Antimicrobial resistance of Escherichia coli isolated in newly-hatched chickens and effect of amoxicillin treatment during their growth. Avian Pathol. 2016, 45, 501–507
24. Kim, Y.J.; Park, J.H.; Seo, K.H. Comparison of the loads and antibiotic-resistance profiles of Enterococcus species from conventional and organic chicken carcasses in South Korea. Poult. Sci. 2018, 97, 271–278.
25. Koutsianos, D.; Gantelet, H.; Franzo, G.; Lecoupeur, M.; Thibault, E.; Cecchinato, M.; Koutoulis, K.C. An assessment of the level of protection against colibacillosis conferred by several autogenous and/or commercial vaccination programs in conventional pullets upon experimental challenge. Vet. Sci. 2020, 7, 80.
26. Laxminarayan, R.; Duse, A.; Wattal, C.; Zaidi, A.K.M.; Wertheim, H.F.L.; Sumpradit, N.; Vlieghe, E.; Hara, G.L.; Gould, I.M.; Goossens, H.; et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. Lancet Infect. Dis. 2013, 13, 1057–1098.
27. Lazarus, B.; Paterson, D.L.; Mollinger, J.L.; Rogers, B.A. Do human extraintestinal escherichia coli infections resistant to expanded-spectrum cephalosporins originate from food-producing animals? A systematic review. Clin. Infect. Dis. 2015, 60, 439–452.

28. Ljubojevi´c, D.; Radosavljevi´c, V.; Milanov, D. The role of gulls (Laridae) in the emergence and spreading of antibiotic resistance in the environment. World Poult. Sci. J. 2016, 72, 853–864.
29. Miranda, J.M.; Vázquez, B.I.; Fenti, C.A.; Calo-Mata, P.; Cepeda, A.; Franco, C.M. Comparison of antimicrobial resistance in Escherichia coli, Staphylococcus aureus, and Listeria monocytogenes strains isolated from organic and conventional poultry meat. J. Food Prot. 2008, 71, 2537–2542.
30. Mollenkopf, D.F.; Cenera, J.K.; Bryant, E.M.; King, C.A.; Kashoma, I.; Kumar, A.; Funk, J.A.; Rajashekara, G.; Wittum, T.E. Organic or antibiotic-free labeling does not impact the recovery of enteric pathogens and antimicrobial-resistant escherichia coli from fresh retail chicken. Foodborne Pathog. Dis. 2014, 11, 920–929.
NAQS Environmentfriendly Agricultural Products Certification. Available online: http://www.enviagro.go. kr/portal/en/main.do
31. Nhung, N.T.; Chansiripornchai, N.; Carrique-Mas, J.J. Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: A review. Front. Vet. Sci. 2017, 4, 126. [CrossRef] [PubMed] Animals 2020, 10, 1215 12 of 12 50.
32. Parker, D.; Sniatynski, M.K.; Mandrusiak, D.; Rubin, J.E. Extended-Spectrum β-lactamase producing Escherichia coli isolated from wild birds in Saskatoon, Canada. Lett. Appl. Microbiol. 2016, 63, 11–15.
33. International Standard Organisation. Horizontal Method for Glucuronidase Positive Escherichia Coli Counting-Part 2; BAS EN ISO 16649-2:2001; ISO: Geneva, Switzerland, 2009.
34. Peduzzi, P.; Concato, J.; Feinstein, A.R.; Holford, T.R. Importance of events per independent variable in proportional hazards regression analysis II. Accuracy and precision of regression estimates. J. Clin. Epidemiol. 1995, 48, 1503–1510.
35. Persoons, D.; Haesebrouck, F.; Smet, A.; Herman, L.; Heyndrickx, M.; Martel, A.; Catry, B.; Berge, A.C.; Butaye, P.; Dewulf, J. Risk factors for ceftiofur resistance in Escherichia coli from Belgian broilers. Epidemiol. Infect. 2011, 139, 765–771.
36. Projahn, M.; Daehre, K.; Semmler, T.; Guenther, S.; Roesler, U.; Friese, A. Environmental adaptation and vertical dissemination of ESBL-/pAmpC-producing Escherichia coli in an integrated broiler production chain in the absence of an antibiotic treatment. Microb. Biotechnol. 2018, 11, 1017–1026.
37. Rizzo, L.; Manaia, C.; Merlin, C.; Schwartz, T.; Dagot, C.; Ploy, M.C.; Michael, I.; Fatta-Kassinos, D. Urban wastewater treatment plants as hotspots for antibiotic resistant bacteria and genes spread into the environment: A review. Sci. Total Environ. 2013, 447, 345–360.
38. Tadesse, D.A.; Zhao, S.; Tong, E.; Ayers, S.; Singh, A.; Bartholomew, M.J.; McDermott, P.F. Antimicrobial drug resistance in Escherichia coli from humans and food animals, United States, 1950–2002. Emerg. Infect. Dis. 2012, 18, 741–749.
39. van den Bogaard, A.E.; Stobberingh, E.E. Epidemiology of resistance to antibiotics: Links between animals and humans. Int. J. Antimicrob. Agents 2000, 14, 327–335.
40. Wassenaar, T.M. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and implications for human health. Crit. Rev. Microbiol. 2005, 31, 155–169.
41. World Health Organization (WHO). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th Revision; WHO: Geneva, Switzerland, 2019.
42. Wright, G.D. Antibiotic resistance in the environment: A link to the clinic? Curr. Opin. Microbiol. 2010, 13, 589–594.