

STUDIO FENOTIPICO E GENOTIPICO DELLA SUSCETTIBILITÀ ALLA COLISTINA DI *ESCHERICHIA COLI* E *SALMONELLA INFANTIS* ISOLATI IN POLLI DA CARNE

Musa L.¹, Casagrande Proietti P.¹, Stefanetti V.¹, Toppi V.¹, Marenzoni M. L.¹, Shtylla Kika T.², Blasi F.³, Branciarri R.¹, Franciosini M. P.¹

¹Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia;

²Facoltà di Medicina Veterinaria, Università Agricola di Tirana, Tirana, Albania;

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', 06124 Perugia, Italy.

Summary

Colistin has been recently reassessed as a last-line treatment option in the therapeutic treatment against multidrug resistant bacteria in humans. The main objective of our research was to investigate the susceptibility of *E. coli* and *S. Infantis* to colistin in broiler chickens, as these microorganisms are considered of interest in Public Health. Another purpose was to determine the spread of ESBL (Producing Broad-Spectrum β -Lactamase) bacteria following the alarmism related to possible transmission to man, directly or through the consumption of meat chicken derived products. Our results showed that all *E. coli* were colistin-susceptible and *mcr* negative. Three isolates of *S. Infantis* were *mcr* positive and colistin resistant, showing a MIC range of 4-8 mg/L. The low prevalence of resistance is likely due to both a different susceptibility of *Salmonella* spp to colistin and to an off label (or restricted) use of this antimicrobial in poultry. The WGS (whole genome sequence) evidenced in two strains *mcr*-1.2. variant. To our knowledge is the first report of this variant in meat chickens. The ESBL prevalence, high for both *E. coli* (24,1%) and *S. Infantis* (82,3%) justifies the progressive concern for the safety of the chicken by- products meat.

INTRODUZIONE

La colistina appartenente alla classe delle polimixine è un antibiotico attivo nei confronti di numerosi batteri gram negativi ed è stato usato in Medicina Veterinaria per lungo tempo non solo come agente terapeutico e preventivo nelle infezioni da Gram-negativi (Kieffer et al., 2017) ma anche come promotore di crescita in alcune specie di interesse zootecnico (Rhouma et al., 2016; Kumar et al., 2020). Il manifestarsi di forme resistenza nel corso del tempo ne ha causato una limitazione dell'impiego, che attualmente nel pollame è in deroga e subordinato solo a quei casi in cui gli antibiotici testati risultano inefficaci nei confronti del microorganismo isolato.

Recentemente, dopo un periodo di sospensione del suo impiego in umana per i possibili effetti nefrotossici (Lim et al., 2010), si è assistito ad un rinnovato interesse per la colistina come antibiotico "last resort" (di ultima scelta) in Medicina Umana da impiegare in corso di infezioni sostenute da batteri gram negativi multiresistenti, soprattutto *Enterobacteriaceae* (Biswas et al, 2012; Azzopardi et al., 2013; Poirel et al., 2017). La World Health Organization (WHO, 2018) pertanto ha riclassificato la colistina nella categoria di farmaci di importanza critica per la medicina Umana,

giustificando l'esecuzione di più frequenti studi di monitoraggio della resistenza nei confronti di questa molecola mostrata da alcuni batteri tra i quali *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* diffusi in campo umano e veterinario. Nell'ambito della popolazione di Salmonelle, *S. Infantis* è considerata un sierotipo emergente a livello europeo, particolarmente diffusa lungo l'intera filiera avicola, non solo negli allevamenti di broiler, ma anche negli allevamenti di tacchini e nei prodotti derivati, configurandosi come il sierotipo più diffuso dopo *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (EFSA, 2019). Recentemente la resistenza alla colistina è stata attribuita al gene, plasmide-mediato, *mcr 1* descritto nel 2015 per la prima volta in *E. coli* (Liu et al., 2016). Da allora in quasi tutti i Paesi del mondo sono stati rilevati i geni *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* con le loro varianti e subvarianti in ceppi di *E. coli* e *Salmonella* ssp. isolati nell'uomo, animali ed alimenti di origine animale, a testimonianza della continua evoluzione del meccanismo di resistenza genetica a questa molecola (Borowiak et al., 2017; Kawanishi et al., 2017; Yin et al., 2017; Carfora et al., 2018; Portes et al., 2021). Recentemente in ceppi di *S. Typhimurium* isolati da suini e vitelli è stato evidenziato anche il gene *mcr-9*. (Diaconu et al., 2021). Obiettivi del presente lavoro sono stati l'analisi fenotipica della suscettibilità alla colistina, la determinazione di ESBL e la valutazione genotipica della presenza del gene *mcr* in ceppi di *E. coli* e *S. Infantis* isolati da polli da carne.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Un totale di 174 ceppi di *E. coli* (Centro Italia, 2019-2020) e 85 ceppi di *Salmonella* *Infantis* (Nord, Centro e Sud Italia, 2016-2019) sono stati isolati da polli da carne broiler *Ross 308* in allevamento e alla macellazione nell'arco temporale 2019-2020. I ceppi di *E. coli* provenienti dall'allevamento ($n = 81$) sono stati isolati da campioni cloacali e campioni ambientali, i ceppi provenienti alla macellazione ($n = 93$) sono stati isolati da campioni cutanei e contenuto cecale. I ceppi di *S. Infantis* sono stati isolati in allevamento (campioni cloacali) ($n=13$) e alla macellazione (campioni ambientali, campioni cutanei, fegato e prodotti lavorati) ($n=72$).

Isolamento e identificazione di E. coli e S. Infantis

L'isolamento di *E. coli* e *S. Infantis* è stato eseguito secondo le metodiche tradizionali. Tutte le colonie con morfologia tipica di *E. coli* sono state selezionate e confermate da test biochimici (ISO). L'identificazione di *S. Infantis* è stata eseguita mediante la tipizzazione sierologica (IZS dell'Umbria e delle Marche).

Test di suscettibilità antimicrobica e determinazione di ESBL degli isolati di E. coli e S. Infantis

La suscettibilità antimicrobica è stata testata mediante determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) utilizzando il metodo di microdiluizione in piastra (FRCOL plates, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy) con concentrazioni scalari di colistina. Per tutti i ceppi di *E. coli* e *S. Infantis* la produzione di ESBL è stata confermata dal test sinergico a doppio disco (DDST) e tramite la microdiluizione in piastra (Sensititre™ ESBL plates, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy). I risultati sono stati valutati mediante i breakpoint di EUCAST. (>2 mg/L). Il profilo fenotipico di antibiotico-resistenza degli isolati di *S. Infantis* è stato valutato mediante il test di Kirby-Bauer ed i risultati sono stati pubblicati in uno studio precedente (Casagrande Proietti et al., 2020). In tutti gli isolati di *E. coli* è stata eseguita l'analisi fenotipica del profilo di

antibiotico-resistenza mediante microdiluizione in piastra (MIC) (dati non pubblicati).
Multiplex PCR

Il DNA genomico è stato estratto dalle colonie utilizzando il kit GenElute™Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germania) secondo il protocollo del produttore. I campioni sono stati analizzati tramite spettrofotometro e mediante l'elettroforesi su gel di agarosio all'1% per determinare rispettivamente la quantità e la qualità del DNA estratto. L'amplificazione mediante Multiplex PCR dei geni *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5* è stata eseguita come precedentemente riportato nello studio di Rebelo et al., (2018). L'elettroforesi su gel è stata utilizzata per l'analisi dei prodotti della PCR, utilizzando gel di agarosio a 1,2%.

Sequenziamento genomico (WGS)

Un nanogrammo di DNA genomico è stato utilizzato per la preparazione delle librerie, utilizzando il kit Illumina Nextera XT. Dopo normalizzazione, le librerie sono state sequenziate su piattaforma Illumina MiSeq in paired-end (2x300 cicli). Il dato grezzo di sequenziamento è stato valutato con il software FastQC, e le sequenze con qualità inferiore a 20 (Phred Score) e/o lunghezza inferiore a 70 nucleotidi sono state rimosse. L'assemblaggio è stato effettuato con il software Spades v. 3.14 e trattenuti solo gli scaffolds più lunghi di 200 nucleotidi. Le sequenze genomiche ottenute sono state valutate con il software Quast ed annotate con Prokka. I geni di antibiotico-resistenza e la presenza di repliconi plasmidici sono stati identificati con il software STARAMR.

RISULTATI

Test suscettibilità antimicrobica alla colistina ed ESBL (Beta-lattamasi a spettro esteso)

I ceppi di *E. coli* sono risultati tutti sensibili alla colistina (MIC range, 0.5–1 mg/L). Per quanto concerne *S. Infantis*, 3 ceppi (3,5%) hanno mostrato resistenza alla colistina. Un ceppo isolato dalla pelle del collo di un broiler nel 2016 in un macello del sud Italia ha mostrato una MIC di 4 mg/L, gli altri due ceppi isolati nel 2017 al macello da fusi di polli provenienti da allevamenti del Nord Italia hanno presentato una MIC pari a 8 mg/L. La MIC degli isolati suscettibili alla colistina è oscillata da 0,5 -1 mg/L solo in 1 ha mostrato valori di 2 mg/L. Quarantadue /174 (24,1 %) isolati di *E. coli* 85 (82,3%) ceppi di *S. Infantis* erano ESBL positivi. I risultati relativi al profilo fenotipico di antibiotico-resistenza dei 3 ceppi di *S. Infantis* colistina-resistenti sono riportati in tabella 1.

Multiplex PCR

In tutti gli isolati di *E. coli* non sono stati rilevati i geni *mcr-1/ mcr-5*. I tre isolati di *S. Infantis* colistina- resistenti hanno presentato il gene *mcr- 1*.

Sequenziamento genomico (WGS)

I risultati del profilo genotipico dell'antibiotico-resistenza sono illustrati in tabella 1. In merito al gene *mcr-1* in un isolato è stata rilevata la variante *mcr-1.1*, in due isolati è stata evidenziata la variante *mcr-1.2*. Tutti gli isolati presentavano anche i geni *bla*CTX-M-1 che media la resistenza al cefotaxime, *sul 1*, (resistenza ai sulfamidici) *tet(A)* (resistenza alla tetraciclina) e *df*rA1, *df*rA14 che mediano la resistenza al trimetoprim. In 2 ceppi sono stati evidenziati anche il gene *aph(3')*-Ia (resistenza agli aminoglicosidi), i geni *gyrA* (D87G) e *parC* che mediano la resistenza ai chinoloni e *qacE* (resistenza ai quaternari) rispettivamente.

Tabella 1: Profilo genotipico e fenotipico di 3 isolati di *S. Infantis* colistina-resistenti

N.	Origine	Matrice	Anno	Profilo genotipico AMR	Profilo fenotipico AMR
1	Sud Italia	Pelle del collo (macello)	2016	<i>bla</i> CTX-M-1, <i>sul</i> 1, <i>tet</i> (A), <i>mcr</i> 1.1, <i>dfr</i> A1, <i>dfr</i> A14	ACIColCtxCzFpSxtTe
2	Nord Italia	Fusi di pollo (macello)	2017	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>bla</i> CTX-M-1, <i>dfr</i> A1, <i>dfr</i> A14, <i>gyr</i> A (D87G), <i>mcr</i> -1.2, <i>par</i> C (T57S), <i>qac</i> E, <i>sul</i> 1, <i>tet</i> (A)	ACIColCpCtxFpNaSxtTe
3	Nord Italia	Fusi di pollo (macello)	2017	<i>aph</i> (3')-Ia, <i>bla</i> CTX-M-1, <i>dfr</i> A1, <i>dfr</i> A14, <i>gyr</i> A (D87G), <i>mcr</i> -1.2, <i>par</i> C (T57S), <i>qac</i> E, <i>sul</i> 1, <i>tet</i> (A)	ACIColCtxFpNaSxtTe

A=ampicillina, Cl=cefalexina, Col=Colistina, Cp=ciprofloxacina, Ctx=cefotaxime, Cz=ceftazidime, Fp=cefepime, Na=acido nalidixico, Sxt=trimetoprim + sulfametossazolo, Te=tetraciclina

DISCUSSIONE

In relazione alla rivalutazione dell'uso in Medicina Umana della colistina, come ultima opzione nel trattamento di super infezioni, sostenute in special modo da gram negativi (Andrade et al., 2020), il principale obiettivo della nostra ricerca è stato quello di valutare nei polli da carne la suscettibilità di isolati di *E. coli* e *S. Infantis* alla colistina, in quanto microrganismi considerati significativi in campo umano e veterinario. Altro scopo è stato quello di determinare la diffusione di *E.coli* e *Salmonella* spp ESBL in risposta all'allarmante incremento di infezioni causate da *Enterobacteriaceae* produttrici di β -lattamasi ad ampio spettro in umana. Nel nostro lavoro 3 isolati su 85 (3,5%) provenienti da polli da carne al macello sono risultati resistenti con valori di MIC oscillanti di 4-8 mg/L. In un precedente lavoro Carfora et al., (2018) hanno evidenziato in polli da carne una prevalenza di resistenza alla colistina da parte di *S. Infantis* di 1,2%

Agero et al (2012) avevano precedentemente riportato distribuzioni di MIC nei confronti della colistina per isolati di *Salmonella* appartenenti a diversi sierotipi, con *S. Dublin* e *S. Enteritidis*, che presentavano valori di MIC più elevati rispetto ad altri sierotipi, quali *S. Typhimurium* e *S. Infantis*. Dati confermati successivamente anche da studi di monitoraggio condotti da EFSA (2014) su polli da carne e

galline ovaiole che hanno mostrato che gli isolati di *Salmonella* spp. resistenti alla colistina appartenevano perlopiù a *S. Enteritidis*, la quale mostrava una resistenza intrinseca a questa molecola, attribuita di recente ad una differenza nell'espressione dell'antigene somatico (Ricci et al., 2020). Va inoltre ricordato che dati relativi alla resistenza della *Salmonella* spp. a colistina possono variare anche in relazione all'area geografica in virtù del differente impiego di questo farmaco (EMA, 2016; Apostolakos et al., 2018). Il sequenziamento completo dei 2 isolati di *S. Infantis* resistenti alla colistina ha dimostrato la presenza del gene *mcr* 1.2, descritto in primis in Toscana nel plasmide IncX4 su un isolato di *Klebsiella pneumoniae* proveniente dall'uomo (Di Pilato et al., 2016). Successivamente questa variante sempre associata al plasmide IncX4 è stata riscontrata a livello di *S. Blockley* e *E. coli* intestinali nel tacchino all'ingrasso (Alba et al., 2018). A nostra conoscenza questa è la prima segnalazione della variante *mcr* 1.2 nel pollo. La capacità delle "cassette" geniche *mcr* di muoversi da un plasmide all'altro (IncI2, IncX4, IncHI2, and IncP) e/o all'interno del cromosoma è estremamente significativo ai fini di una possibile inserzione in plasmidi presenti in isolati multiresistenti e anche di una "creazione" di megaplasmidi come documentato in Italia da Franco et al. (2015) in *S. Infantis* e successivamente in Svizzera (Hindermann et al., 2017) e negli Stati Uniti (Tate et al., 2017). Studi condotti su isolati ESBL resistenti alla colistina di *S. Infantis* provenienti broiler e prodotti derivati ha messo in evidenza la presenza della variante *mcr* 1.1 (Carfora et al., 2018). Un elevato numero di isolati di *Salmonella* spp (70/85) è risultato ESBL, inclusi i 3 isolati resistenti alla colistina, seppure queste caratteristiche non risultano necessariamente associate come evidenziato già in un precedente lavoro (Casagrande Proietti et al., 2020). Tutti i ceppi di *E. coli* sono risultati suscettibili alla colistina e negativi per la presenza dei geni *mcr* 1-*mcr* 5. In studi recenti eseguiti in Italia da Alba et al., (2018), Niero et al., (2018) e Pesciaroli et al. (2019), su ceppi di *E. coli* isolati da polli da carne è emerso che la prevalenza di resistenza alla colistina è rispettivamente del 5,9%, 2% e 1,8%. In generale nei Paesi dell'Unione Europea la prevalenza di resistenza alla colistina da parte di *E. coli* risulta tendenzialmente bassa sebbene si possano avere delle variazioni in relazione al maggiore uso del farmaco in alcuni stati membri (EFSA 2017). Nel nostro lavoro il numero degli ESBL è risultato alto anche per *E. coli*, (42 su 174) come già riportato per *Salmonella* spp, a testimonianza che il pollo sia una potenziale fonte di trasmissione diretta o indiretta, attraverso il consumo dei suoi prodotti, per l'uomo (Lazarus et al., 2014).

CONCLUSIONI

I nostri risultati hanno messo in evidenza globalmente una resistenza moderata alla colistina da parte degli isolati di *S. Infantis*, in linea con quanto riportato in letteratura, dovuto in parte all'attento uso di questa molecola nel settore veterinario e a una diversa suscettibilità esibita dalle varie specie di *Salmonella*. Il sequenziamento completo del genoma ha messo in evidenza la variante *mcr* 1.2 finora non descritta nel pollo da carne che testimonia la complessità genetica, in continua evoluzione, tipica della resistenza a questo principio attivo. In ultimo l'elevato numero di *E. coli* e *Salmonelle* ESBL riscontrato soprattutto al mattatoio conferma la preoccupazione per la sicurezza del prodotto finale per il consumatore.

BIBLIOGRAFIA

1. Agero Y, Torpdahl M, Zachariasen C, Seyfarth A, Hammerum AM, Nielsen EM. 2012. Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Foodborne Pathog Dis* 9:367–369. doi:10.1089/fpd.2011.1015.
2. Alba P, Leekitcharoenphon P, Franco A, Feltrin F, Ianzano A, Caprioli A, Stravino F, Hendriksen RS, Bortolaia V, Battisti A. Molecular Epidemiology of Mcr-Encoded Colistin Resistance in Enterobacteriaceae From Food-Producing Animals in Italy Revealed Through the EU Harmonized Antimicrobial Resistance Monitoring. *Front. Microbiol.* 2018, 0 (JUN), 1217. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01217>.
3. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms* 2020, 8 (11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS8111716>.
4. Apostolakis I, Piccirillo A. A Review on the Current Situation and Challenges of Colistin Resistance in Poultry Production. *Avian Pathol.* 2018, 47 (6), 546–558. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1524573>.
5. Azzopardi EA, Ferguson EL, Thomas DW. Colistin Past and Future: A Bibliographic Analysis. *J. Crit. Care* 2013, 28 (2), 219.e13-219.e19. <https://doi.org/10.1016/J.JCRC.2012.04.008>.
6. Biswas S, Brunel JM, Dubus JC, Reynaud-Gaubert M, Rolain JM. Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 2012, 10 (8), 917–934. <https://doi.org/10.1586/ERI.12.78>.
7. Borowiak M, Fischer J, Hammerl JA, Hendriksen RS, Szabo I, Malorny B. Identification of a Novel Transposon-Associated Phosphoethanolamine Transferase Gene, Mcr-5, Conferring Colistin Resistance in d-Tartrate Fermenting *Salmonella* Enterica Subsp. Enterica Serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 2017, 72 (12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX327>.
8. Carfora V, Alba P, Leekitcharoenphon P, Ballarò D, Cordaro G, Di Matteo P, Donati V, Ianzano A, Iurescia, M, Stravino F, Tagliaferri T, Battisti A, Franco A. Colistin Resistance Mediated by Mcr-1 in ESBL-Producing, Multidrug Resistant *Salmonella* Infantis in Broiler Chicken Industry, Italy (2016–2017). *Front. Microbiol.* 2018, 0 (AUG), 1880. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2018.01880>.
9. Countries should reduce use of colistin in animals to decrease the risk of antimicrobial resistance | European Medicines Agency <https://www.ema.europa.eu/en/news/countries-should-reduce-use-colistin-animals-decrease-risk-antimicrobial-resistance> (accessed Aug 23, 2021).
10. Di Pilato V, Arena F, Tascini C, Cannatelli A, Henrici De Angelis L, Fortunato S, Giani T, Menichetti F, Rossolini GM. Mcr-1.2, a New Mcr Variant Carried on a Transferable Plasmid from a Colistin-Resistant KPC Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strain of Sequence Type 512. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016, 60 (9), 5612–5615. <https://doi.org/10.1128/AAC.01075-16>.
11. Diaconu EL, Alba P, Feltrin F, Matteo P. Di; Iurescia, M.; Chelli, E.; Donati, V.; Marani, I.; Giacomi, A.; Franco, A.; Carfora, V. Emergence of IncHI2 Plasmids With Mobilized Colistin Resistance (Mcr)-9 Gene in ESBL-Producing, Multidrug-Resistant *Salmonella* Typhimurium and Its Monophasic Variant ST34 From Food-Producing Animals in Italy. *Front. Microbiol.* 2021, 12. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.705230>.

12. EUCAST: Clinical breakpoints and dosing of antibiotics https://eucast.org/clinical_breakpoints/ (accessed Sep 1, 2021).
13. Franco A, Leekitcharoenphon P, Feltrin F, Alba P, Cordaro G, Iurescia M, Tolli R, D’Incau M, Staffolani M, Giannatale Edi, Hendriksen RS, Battisti A. Emergence of a Clonal Lineage of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *Salmonella* *Infantis* Transmitted from Broilers and Broiler Meat to Humans in Italy between 2011 and 2014. *PLoS One* 2015, 10 (12). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0144802>.
14. Hindermann D, Gopinath G, Chase H, Negrete F, Althaus D, Zurfluh K, Tall BD, Stephan R, Nüesch-Inderbilen M. *Salmonella* Enterica Serovar *Infantis* from Food and Human Infections, Switzerland, 2010–2015: Poultry-Related Multidrug Resistant Clones and an Emerging ESBL Producing Clonal Lineage. *Front. Microbiol.* 2017, 0 (JUL), 1322. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.01322>.
15. ISO - ISO 16649-1:2018 - Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* — Part 1: Colony-count technique at 44 degrees C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuron <https://www.iso.org/standard/64951.html> (accessed Sep 30, 2021).
16. Kawanishi M, Abo H, Ozawa M, Uchiyama M, Shirakawa T, Suzuki S, Shima A, Yamashita A, Sekizuka T, Kato K, Kuroda M, Koike R, Kijima M. Prevalence of Colistin Resistance Gene *Mcr-1* and Absence of *Mcr-2* in *Escherichia Coli* Isolated from Healthy Food-Producing Animals in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61 (1). <https://doi.org/10.1128/AAC.02057-16>.
17. Kieffer, N.; Aires-de-Sousa, M.; Nordmann, P.; Poirel, L. High Rate of *MCR-1*-Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella Pneumoniae* among Pigs, Portugal - Volume 23, Number 12—December 2017 - Emerging Infectious Diseases Journal - CDC. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, 23 (12), 2023–2029. <https://doi.org/10.3201/EID2312.170883>.
18. Kumar, H.; Chen, B.-H.; Kuca, K.; Nepovimova, E.; Kaushal, A.; Nagraik, R.; Bhatia, S. K.; Dhanjal, D. S.; Kumar, V.; Kumar, A.; Upadhyay, N. K.; Verma, R.; Kumar, D. Understanding of Colistin Usage in Food Animals and Available Detection Techniques: A Review. *Anim.* 2020, Vol. 10, Page 1892 2020, 10 (10), 1892. <https://doi.org/10.3390/ANI10101892>.
19. 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 (3), 439–452. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu785>.
20. Lim LM, Ly N, Anderson D, Yang JC, Macander L, Jarkowski A, Forrest A, Bullitta JB, Tsuji BT. Resurgence of Colistin: A Review of Resistance, Toxicity, Pharmacodynamics, and Dosing. *Pharmacotherapy* 2010, 30 (12), 1279–1291. <https://doi.org/10.1592/PHCO.30.12.1279>.
21. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G, Dong B, Huang X, Yu LF, Gu D, Ren H, X, Chen L, Lv D, He H, Zhou Z, Liang JH, Liu J, Shen. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism *MCR-1* in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet. Infect. Dis.* 2016, 16 (2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7).

22. Niero G, Bortolaia V, Vanni M, Intorre L, Guardabassi L, Piccirillo A. High Diversity of Genes and Plasmids Encoding Resistance to Third-Generation Cephalosporins and Quinolones in Clinical *Escherichia Coli* from Commercial Poultry Flocks in Italy. *Vet. Microbiol.* 2018, *216*, 93–98. <https://doi.org/10.1016/J.VETMIC.2018.02.012>.
23. Pesciaroli M, Magistrali CF, Filippini G, Epifanio EM, Lovito C, Marchi L, Marresca C, Massacci FR, Orsini S, Scoccia E, Tofani S, Pezzotti G. Antibiotic-Resistant Commensal *Escherichia Coli* Are Less Frequently Isolated from Poultry Raised Using Non-Conventional Management Systems than from Conventional Broiler. *Int. J. Food Microbiol.* 2020, *314*. <https://doi.org/10.1016/J.IJFOODMICRO.2019.108391>.
24. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial Activity, Susceptibility Testing, and Resistance Mechanisms Encoded by Plasmids or Chromosomes. *Clin. Microbiol. Rev.* 2017, *30* (2), 557–596. <https://doi.org/10.1128/CMR.00064-16>.
25. Portes, A. B.; Rodrigues, G.; Leitão, M. P.; Ferrari, R.; Junior, C. A. C.; Panzenhagen, P. Global Distribution of Plasmid-Mediated Colistin Resistance *Mcr* Gene in *Salmonella*: A Systematic Review. *J. Appl. Microbiol.* 2021, *00*, 1. <https://doi.org/10.1111/JAM.15282>.
26. Proietti, P. C.; Stefanetti, V.; Musa, L.; Zicavo, A.; Dionisi, A. M.; Bellucci, S.; Mensa, A. La; Menchetti, L.; Branciarì, R.; Ortenzi, R.; Franciosini, M. P. Genetic Profiles and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella Infantis* Strains Isolated in Italy in the Food Chain of Broiler Meat Production. *Antibiotics* 2020, *9* (11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110814>.
27. Rhouma, M.; Beaudry, F.; Thériault, W.; Letellier, A. Colistin in Pig Production: Chemistry, Mechanism of Antibacterial Action, Microbial Resistance Emergence, and One Health Perspectives. *Front. Microbiol.* 2016, *0* (NOV), 1789. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2016.01789>.
28. Ricci V, Zhang D, Teale C, Piddock LJV. The O-Antigen Epitope Governs Susceptibility to Colistin in *Salmonella Enterica*. *MBio* 2020, *11* (1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.02831-19>.
29. Tate, H.; Folster, J. P.; Hsu, C. H.; Chen, J.; Hoffmann, M.; Li, C.; Morales, C.; Tyson, G. H.; Mukherjee, S.; Brown, A. C.; Green, A.; Wilson, W.; Dessai, U.; Abbott, J.; Joseph, L.; Haro, J.; Ayers, S.; McDermott, P. F.; Zhaoa, S. Comparative Analysis of Extended-Spectrum- β -Lactamase CTX-M-65-Producing *Salmonella Enterica* Serovar *Infantis* Isolates from Humans, Food Animals, and Retail Chickens in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, *61* (7). <https://doi.org/10.1128/AAC.00488-17>.
30. The European Union One Health 2018 Zoonoses Report. *EFSA journal. Eur. Food Saf. Auth.* 2019, *17* (12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5926>.
31. The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017. *EFSA J.* 2019, *17* (2). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5598>.
32. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2014. *EFSA J.* 2015, *13* (12). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2015.4329>.
33. Yin W, Li H, Shen Y, Liu Z, Wang S, Shen Z, Zhang R, Walsh TR, Shen J, Wang Y. Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *Mcr-3* in *Escherichia Coli*. *MBio* 2017, *8* (3). <https://doi.org/10.1128/MBIO.00543-17>.