

DIFFUSIONE DI SALMONELLE MULTI-RESISTENTI E DEI DETERMINANTI GENETICI DI ANTIMICROBICO RESISTENZA NELLA FILIERA ANTIBIOTIC-FREE DEL POLLO DA CARNE DEL CENTRO ITALIA

Di Francesco C.E.^{1*}, Ferri G.¹, Smoglica C.¹, Festino A.R.¹, Ruffini F.², Marsilio F.¹, Vergara A.¹

¹ Università degli Studi di Teramo, Facoltà di Medicina Veterinaria, Loc. Piano D'Accio, 64100, Teramo, Italia

² Gesco Cons. Coop a r.l., 64020 Teramo, Italia.

* Presenting author

Summary

In this study a comparison of antibiotic resistance genes (ARGs) and multidrug resistant (MDR) *Salmonella* spp. strains between conventional and antibiotic-free broiler flocks were performed. At farm level, litter samples were screened by end-point PCR protocols, able to amplify ARGs against the most commonly used molecules in veterinary medicine along with selected Critically Important Antibiotics (CIA), reserved to human therapies. At slaughterhouse the carcasses obtained from both farming systems were sampled to identify resistant *Salmonella* spp. Based on the phenotypic resistance profiles of the strains, the related ARGs were investigated. A significant difference was observed for ARGs distribution between conventional and antibiotic-free litter samples, with particular regard for tetracyclines genes (*tet*) that were mostly detected in antibiotic-free flocks. *Salmonella* Typhi, Thiphymurium and Enteritidis serovars resulted equally distributed in carcasses of both investigated groups, all strains showing MDR profiles. These results are in line with previous investigations, raising concerns about the effective role of alternative meat production systems in reduction of MDR bacteria and their genetic determinants.

INTRODUZIONE

L'antimicrobico resistenza (AMR) rappresenta un problema emergente di sanità pubblica che coinvolge non solo la salute umana, ma anche quella degli animali e dell'ambiente (Hernando-Amado et al., 2019). Negli animali da reddito tale fenomeno è stato favorito dall'uso diffuso o eccessivo degli antibiotici, in passato impiegati anche per scopi preventivi e/o di metafilassi, e attualmente somministrati esclusivamente per il trattamento delle infezioni batteriche, che trovano nei sistemi intensivi di allevamento le condizioni favorevoli per diffondersi (de Mesquita Souza Saraiva, 2022). La pressione selettiva esercitata dalle terapie antibiotiche ha permesso la diffusione e il mantenimento nell'ambiente di batteri resistenti a più classi di molecole antimicrobiche (batteri multi-resistenti), capaci di trasferire ad altre cellule batteriche i relativi geni di antimicrobico resistenza, molti dei quali localizzati su elementi genetici mobili (Yang et al., 2019).

Al fine di ridurre la diffusione di batteri resistenti e la loro trasmissione ai consumatori attraverso il consumo di prodotti contaminati di origine animale, il settore zootecnico ha sviluppato sistemi alternativi di allevamento "senza uso di molecole antibiotiche" in grado di soddisfare la crescente domanda da parte dei consumatori, sempre più attenti all'acquisto di prodotti più sostenibili, sani e rispettosi del benes-

sere animale. In particolare, la filiera avicola ha visto crescere notevolmente le linee “antibiotic-free” e biologiche che hanno registrato un incremento del 20% negli anni 2020/2021 rispetto al biennio precedente (ISMEA, 2021). Gli effetti che gli allevamenti antibiotic-free possono avere sulla diffusione dell’AMR non sono ancora del tutto conosciuti e i dati relativi alla reale diffusione di batteri resistenti e multi-resistenti e dei relativi determinanti genetici in questi sistemi alternativi non vengono ancora raccolti e monitorati in maniera sistematica e standardizzata, ma risultano ancora frammentari e disomogenei (Millmann et al., 2013; Bailey et al., 2020; Musa et al., 2021; Salerno et al., 2022).

Scopo del presente lavoro è stato di comparare la diffusione negli allevamenti di broiler convenzionali e antibiotic-free dei geni responsabili di AMR e di determinare i profili di resistenza antibiotica in ceppi di *Salmonella enterica* isolati a partire dalle carcasse a fine macellazione provenienti dalla stessa filiera produttiva.

MATERIALI E METODI

Sulla base dei risultati ottenuti in una precedente indagine, che ha coinvolto allevamenti convenzionali di broiler e tacchini del Centro Italia (Di Francesco et al., 2021), sono stati selezionati n. 3 allevamenti convenzionali (C1-C3) e n. 3 allevamenti antibiotic-free (AF1-AF3) di broiler ubicati in Abruzzo e appartenenti alla stessa filiera produttiva integrata. L’analisi degli allevamenti ha riguardato campioni di lettiera raccolti a pochi giorni dall’accasamento dei pulcini (7-10 gg) e a fine ciclo, prima della macellazione dei capi (35-40 gg di età degli animali).

Al fine di ottenere una valutazione rappresentativa della reale diffusione ambientale dei geni di AMR, indipendentemente dalle specie batteriche presenti, è stato eseguito uno screening biomolecolare, mediante protocolli di PCR, per l’amplificazione diretta di geni target specifici per la resistenza batterica nei confronti di antibiotici comunemente impiegati nella pratica clinica veterinaria (tetracicline, lincomicina, aminoglicosidi, chinoloni; nitrofurani; sulfonamidici e beta-lattamici), insieme ad alcune molecole classificate come criticamente importanti per la medicina umana (CIA) e, pertanto, ad uso esclusivo per le terapie delle infezioni umane (cloramfenicolo, vancomicina e carbapenemi) (EMA, 2022) (**Tabella 1**). A tal fine, il DNA totale è stato ottenuto da ciascun campione di lettiera mediante il protocollo automatizzato previsto dal Maxwell® 11 Instrument e utilizzando il Maxwell kit® 11 Tissue DNA Purification (Promega, Italy).

Le carcasse di broiler, provenienti dalla stessa filiera produttiva degli allevamenti oggetto di indagine, sono state sottoposte a campionamento al termine della linea di macellazione, mediante spugne sterili (Polywipes® RPM Technology, LLC, USA), utilizzate su tutta la superficie cutanea di ciascuna carcassa, e successivamente immerse in acqua peptonata sterile (BPW; LIOFILCHEM® s.r.l., Italia). Le spugne sono state raggruppate in 36 pool, ciascuno costituito da 5 spugne, per un totale di n. 18 campioni provenienti dalle carcasse di broiler degli allevamenti convenzionali e n. 18 campioni provenienti dalle carcasse di broiler degli allevamenti antibiotic-free. I campioni di spugne così raccolti sono stati utilizzati per l’isolamento di *Salmonella* spp. seguendo la relativa procedura (UNI EN ISO6579-1:2020), al fine di valutare il rischio di trasmissione all’uomo attraverso il consumo delle carni avicole.

Per ciascun ceppo batterico isolato, la specie di appartenenza e il relativo profilo di AMR sono stati determinati mediante il sistema automatizzato VITEK® 2

(bioMérieux, France), mentre la caratterizzazione della sierovariante è stata ottenuta mediante PCR (Park et al., 2009). I valori della minima concentrazione inibente (MIC) per ciascuna molecola sono stati interpretati utilizzando come riferimento i breakpoints della European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2021).

Sulla base dei risultati ottenuti dalle prove di sensibilità agli antibiotici, è stato effettuato lo screening molecolare dei geni responsabili della resistenza, a partire dal DNA batterico estratto mediante bollitura, e impiegando gli stessi primers utilizzati per l'analisi delle lettiera degli allevamenti.

Infine, è stata effettuata l'analisi statistica, mediante il software STATA (2019), per valutare eventuali differenze nella distribuzione dei geni di resistenza tra le due tipologie di allevamento, applicando il T-test ($p < 0.05$) e per comparare i profili di resistenza fenotipica dei ceppi batterici isolati dalle carcasse dei due gruppi, applicando il test chi-quadro (χ^2) ($p < 0.05$).

Tabella 1. Elenco dei geni di resistenza amplificati mediante PCR a partire dai campioni di lettiera e carcasse

Antibiotico	Geni di resistenza	Bibliografia primers*
Aminoglicosidi	<i>aadA2</i> ; <i>aac(3)IV</i> ; <i>aadB</i>	Prasertsee et al., 2016; Kozak et al., 2009
Ampicillin	<i>bla_{TEM}</i> ; <i>bla_{PSE}</i>	Kikuvu et al., 2010
Carbapenemi	IMP; OXA-48; NDM; KPC	Hatrongjit et al. 2018
Chinoloni	<i>parC</i>	El-Tayeb et al., 2017
Cloramfenicolo	<i>catA1</i>	Kikuvu et al., 2010
Lincomycin	<i>lnuA</i> ; <i>lnuB</i>	Lina et al., 1999; Bozdogan et al., 1999
Linezolid	<i>cfr</i> ; <i>optrA</i> ; <i>poxtA</i>	Bender et al. 2019
Nitrofurantoina	<i>nfsA</i> ; <i>nfsB</i>	Garcia et al., 2017
Quinupristin/ Dalfopristin	<i>vatD</i> ; <i>vgaA</i> ; <i>vgaB</i> ; <i>vgbB</i> ; <i>msrC</i> ; <i>vgbA</i> ; <i>ermB</i> ; <i>vatE</i>	Shaw et al., 2018
Tetraciclina	<i>tetA</i> ; <i>tetB</i> ; <i>tetC</i> ; <i>tetL</i> ; <i>tetM</i> ; <i>tetK</i> ; <i>tetA(P)</i> ; <i>tetB(P)</i>	Kikuvu et al., 2010; Trzcinski et al. 2000; Aminov et al. 2001; Gevers et al. 2003; Lyras and Rood, 1996; Aminov et al., 2001
Trimethoprim/ Sulfamethoxazolo	<i>sul1</i> ; <i>sul2</i> ; <i>sul3</i>	Costa et al., 2008
Vancomicina	<i>vanA</i> ; <i>vanB</i> ; <i>vanC1</i> ; <i>vanC2</i> ; <i>vanD</i> ; <i>vanM</i> ; <i>vanN</i>	Nomura et al., 2018

*Aminov et al. (2001). *J. Appl. Environ. Microbiol.* 67, 22-32. Bender et al. (2019). *J. Microbiol. Methods.* 160, 101-103. Bozdogan et al. (1999). *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 925-929. Costa et al. (2008). *Microbial. Drug Resist.* 14, 71-77. El-Tayeb et al. (2017). *Braz. J Microbiol.* 48, 499-508. Garcia et al. (2017). *Microbial Drug Resist.* 23, 405-412. Gevers et al (2003). *J. Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1270-1275. Hatrongjit et al. (2018). *MethodsX.* 5, 532-536. Kikuvu et al. (2010). *J. Infect. Develop. Count.* 4, 243-248. Kozak et al. (2009). *J. Appl. Environ. Microbiol.*

75, 559-566. Lina et al., (1999). *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 1062–1066. Lyras et al (1996). *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 2500-2504. Nomura et al. (2018). *J. Microbiol. Methods.* 145, 69-72. Prasertsee, et al. (2016). *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 6, 390-395. Shaw et al (2018). *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 37, 959-967. Trzcinski et al. (2000). *J. Antimicrob. Chemother.* 45, 763-770.

RISULTATI

Negli allevamenti convenzionali i geni di resistenza *catA1* (per il cloramfenicolo), *aadA2* (per gli aminoglicosidi), *sul2* (per i sulfamidici) e *blaTEM* (per l'ampicillina) sono stati amplificati in tutti i campioni, seguiti dai geni *tet* (tetracicline), fatta eccezione per *tetB(P)* e *tetC*. Nessuna positività è stata osservata per le PCR specifiche per i geni di resistenza per vancomicina, carbapenemi, chinoloni, nitrofurantoina, linezolid e quinopristina/dalfopristina.

Nella linea antibiotic-free i geni *aadA2*, *sul1*, *sul2*, *blaTEM*, e *msrC* (specifico per la resistenza ai macrolidi) sono stati amplificati in tutti gli allevamenti, mentre tutti i geni *tet* sono risultati presenti in almeno un allevamento. Il gene *vatE* (specifico per quinopristina/dalfopristina) è stato amplificato in un allevamento antibiotic-free (**Grafico 1**). Una differenza significativa è stata osservata nella distribuzione di geni di resistenza tra le due tipologie di lettiera (p=0.02).

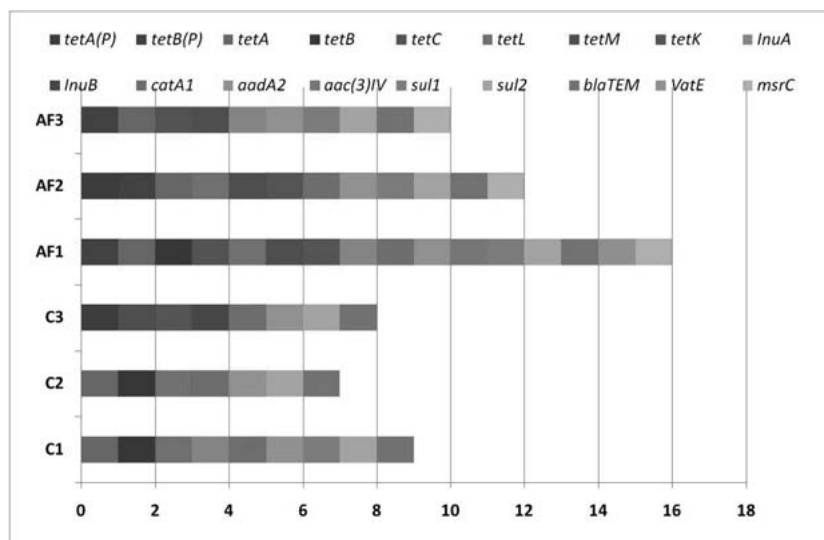


Grafico 1. Distribuzione de geni di resistenza amplificati a partire dai campioni di lettiera prelevati negli allevamenti convenzionali (C1-C3) e antibiotic-free (AF1-AF3)

Le indagini microbiologiche delle carcasse hanno permesso di isolare n. 14 ceppi di *Salmonella enterica* ugualmente distribuiti tra le due linee di macellazione, appartenenti al sierovarianti Typhi, Thiphymurium ed Enteritidis.

Le prove di sensibilità agli antibiotici hanno evidenziato profili di resistenza multipla in tutti i ceppi di *Salmonella* (**Tabella 2**), non evidenziando alcuna differenza significativa tra le due tipologie di allevamento di origine degli isolati (p>0.05).

I geni di resistenza amplificati a partire dal DNA batterico sono risultati essere correlati alle resistenze per tetracicline, aminoglicosidi, nitrofurani, sulfamidici, beta-lattamici, chinoloni, linezolid, quinopristina/dalfopristina, lincomicina e carbapenemi (**Tabella 2**).

Tabella 2. Profili fenotipici e genetici dei ceppi di *Salmonella* isolati dalle carcasse di broiler

ID	Ceppo	Allevamento	Resistenza fenotipica	Geni di resistenza
1	<i>Salmonella</i> Typhi*	AF1	AK; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; OXA-48</i>
2	<i>Salmonella</i> Typhi*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; OXA-48</i>
3	<i>Salmonella</i> Typhi*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TSZ; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; sul1; sul2</i>
4	<i>Salmonella</i> Typhi*	C1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL</i>
5	<i>Salmonella</i> Typhi*	C1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; bla_{TEM}; tetA; tetB; tetC; oprA</i>
6	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL</i>
7	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	AF1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetL</i>
8	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	C1	AK; AML; AMP; CXT; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; OXA-48</i>
9	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	C1	AK; GEN; NIT; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC; tetL; OXA-48</i>
10	<i>Salmonella</i> Typhimurium*	C2	AK; CXT; GEN; NIT; TET	<i>parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetC</i>
11	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	C1	NIT; QPD; STP; TET; VAN	<i>parC; 1tetM; tetL; InuB</i>
12	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	C2	AK; GEN; NIT; TET	<i>parC; tetB; tetC</i>
13	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	AF2	AK; GEN; NIT; TSZ; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetL; sul1; sul2</i>
14	<i>Salmonella</i> Enteritidis*	AF2	AK; AML; AMP; CXT; GEN; TET	<i>aadA2; parC; nfsA; nfsB; tetA; tetB; tetL</i>

AML: amoxicillina; AMP: ampicillina; CIP: ciprofloxacina; CTX: cefotaxime; CZD: ceftazidime; ERP: ertapenem; MRM: meropenem; NIT: nitrofurantoina; PTZ: piperacillina-tazobactam; TET: tetracicline; TSZ: trimethoprim-sulfamethoxazolo.

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti confermano il ruolo delle lettiere e delle deiezioni animali nella diffusione ambientale dei determinanti di AMR, che, attraverso varie fonti (prodotti di origine animale, reflui, vegetali, altre specie animali) possono raggiungere l'uomo

e comprometterne la salute, rendendo più difficoltosa la scelta di opzioni terapeutiche efficaci in medicina umana (EFSA, 2021).

Nonostante la linea antibiotic-free non preveda l'impiego di molecole antimicrobiche, la filiera avicola investigata in questo studio ha dimostrato un'ampia diffusione di geni di resistenza, sollevando dubbi sull'effettivo ruolo delle produzioni alternative nella riduzione dell'AMR. È probabile che il ridotto numero di allevamenti campionati possa aver influito su tale risultato, anche se i dati disponibili in bibliografia non sono del tutto univoci nel considerare il ruolo protettivo degli allevamenti senza uso di antibiotici nei confronti della selezione dei fattori di AMR. In particolare, un'ampia diffusione del gene *tetM* è stata recentemente riportata in campioni fecali di galline ovaiole e broiler di allevamenti antibiotic-free in Australia (Liu et al., 2020), così come il gene *tetA* è risultato particolarmente abbondante in un allevamento della stessa tipologia, ubicato in Nord-Italia (Salerno et al., 2022).

In effetti, le tetracicline rappresentano ancora una delle classi di antibiotici maggiormente prescritte per gli animali da reddito in Italia, nonostante sia stato possibile osservare nello stesso periodo una forte contrazione del loro utilizzo soprattutto rispetto ad altri Paesi UE (EMA, 2021). A conferma di ciò, la filiera avicola investigata in questo studio ha considerevolmente ridotto l'impiego delle tetracicline per i trattamenti terapeutici degli animali, escludendo questa tipologia di molecole anche negli allevamenti convenzionali (Dr. Ruffini, comunicazione personale).

Tuttavia, non è possibile escludere che i geni di resistenza riscontrati negli allevamenti antibiotic-free siano la conseguenza dei trattamenti antibiotici eseguiti in passato, in grado di esercitare una pressione selettiva a lungo termine nell'ambiente (Khine et al., 2022), o che siano presenti altre fonti di contaminazione ambientale (acqua, alimenti o volatili selvatici) che non sono state oggetto di indagine (EFSA, 2021; Storey et al., 2022).

Sulla base di queste informazioni sarebbe utile predisporre Piani di Sorveglianza dell'AMR che includano diverse tipologie di campioni biologici e/o ambientali nelle filiere alimentari di origine animale e che possano monitorare nel tempo un'eventuale riduzione della disseminazione dei pattern di resistenza nelle produzioni alternative.

Le indagini microbiologiche eseguite sulle carcasse provenienti dalle stesse tipologie di allevamento hanno ulteriormente evidenziato un quadro contraddittorio nei confronti della linea antibiotic-free, poiché i profili di AMR non sembrano essere influenzati dalla tipologia produttiva. Infatti, tutti i ceppi di *Salmonella*, indipendentemente dalla loro origine, hanno mostrato profili di resistenza multipla (beta-lattamici, nitrofurani, sulfamidici e tetracicline), risultando positivi anche ai rispettivi geni di resistenza *tet*, *sul*, e *nfs*, suggerendo un rischio di trasmissione al consumatore di questi patogeni.

I dati disponibili in letteratura riportano una diversa distribuzione di *E. coli* antibiotico-resistenti negli allevamenti avicoli antibiotic-free in relazione alla molecola considerata, ad esempio più alta per tigecciclina, azitromicina e gentamicina, e sensibilmente più bassa per quanto riguarda cefotaxime, ceftazidime e ciprofloxacina, mentre i ceppi multi-resistenti appaiono ugualmente distribuiti (Musa et al., 2021). Al contrario, il sistema di allevamento non sembra influire sulla probabilità di isolare ceppi resistenti di *Salmonella*, *E. coli* e *Campylobacter* spp. da carne avicola (Milman et al., 2013; Dixie et al., 2014).

Anche in questo caso sarebbe auspicabile svolgere ulteriori indagini per escludere eventuali altre fonti di contaminazione diversi dagli allevamenti di origine, probabilmente collegate alle possibili cross-contaminazioni che si possono verificare lungo la catena di macellazione.

CONCLUSIONI

In questo studio è stato applicato un approccio multidisciplinare, basato su metodi di coltura-indipendenti e tecniche microbiologiche più tradizionali, e coinvolgendo l'intera filiera produttiva del pollo da carne, partendo dagli allevamenti fino alla macellazione degli animali, al fine di ottenere un'ampia valutazione del livello di diffusione dei determinanti di AMR nel settore avicolo. I profili di resistenza riscontrati sono quelli relativi alle molecole più comunemente impiegate nella pratica clinica veterinaria, ma sono state evidenziate anche resistenze nei confronti di antibiotici criticamente importanti per la salute umana. La filiera antibiotic-free non sembra influire sulla distribuzione di *Salmonelle* multi-resistenti, sottolineando l'esigenza di approfondire le indagini nei confronti dei sistemi alternativi di allevamento, sempre più richiesti dal consumatore perché percepiti come efficaci nel produrre alimenti più sostenibili e sani.

BIBLIOGRAFIA

1. Bailey M, Taylor R, Brar J, Corkran S, Velásquez C, and Novoa-Rama E, (2020). Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Salmonella* from Antibiotic-Free Broilers During Organic and Conventional Processing. *J. Food Prot.* 83, 491-496.
2. de Mesquita Souza Saraiva, M.; Lim, K.; do Monte, D.F.M.; Givisiez, P.E.N.; Alves, L.B.R.; de Freitas Neto, O.C.; Kariuki S; Júnior AB, de Oliveira CJB, and Gebreyes WA. (2022). Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. *Braz J Microbiol.* 53(1):465-486.
3. Di Francesco CE, Smoglica C, Profeta F, Farooq M, Di Giannatale E, Toscani T, and Marsilio F. (2021) Research Note: Detection of antibiotic-resistance genes in commercial poultry and turkey flocks from Italy. *Poult Sci.*, 100(5):101084.
4. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ (2021). Role played by the environment in the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR) through the food chain. *EFSA J.* 19, e06651.
5. EUCAST (2021). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. [https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/\(accessed%20on%2030th%20September%202021\)./](https://www.eucast.org/clinical_breakpoints/(accessed%20on%2030th%20September%202021)./)
6. European Medicines Agency. European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, (2021). 'Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020'. (EMA/58183/2021).
7. Hernando-Amado S, Coque TM, Baquero F, and Martínez JL. (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiol.* 4, 1432–1442.
8. ISMEA, Istituto di Servizi per il Mercato Agricolo Alimentare. Il Biologico nel 2021 e il futuro del settore. Available online at file:///C:/Users/cedifrancesco/

- Downloads/Agricoltura biologica Overview 2022 040722.pdf.
9. Khine NO, Lugsomya K̄, Niyomtham W, Pongpan T̄, Hampson DJ, and Prapasaraku, N. (2022). Longitudinal Monitoring Reveals Persistence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* on a Pig Farm Following Cessation of Colistin Use. *Front Vet Sci.* 9:845746.
 10. Liu Y, Dyall-Smith M, Marenda M, Hu HW, Browning G, and Billman-Jacobe H. (2020). Antibiotic Resistance Genes in Antibiotic-Free Chicken Farms. *Antibiotics (Basel).*, 9(3):120.
 11. Millman JM, Waits K, Grande H, Marks AR, Marks JC, and Price LB. (2013). Prevalence of antibiotic-resistant *E. coli* in retail chicken: comparing conventional, organic, kosher, and raised without antibiotics. *F1000Res.* 2, 155.
 12. Mollenkopf DF, Cenera JK, Bryant EM, King CA, Kashoma I, Kumar A, Funk JA, Rajashekhara G, and Wittum TE. (2014). 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.* (12):920-9.
 13. Musa L, Proietti PC, Marenzoni ML, Stefanetti V, Kika TS, Blasi F, (2021). Susceptibility of Commensal *E. coli* Isolated from Conventional, Antibiotic-Free, and Organic Meat Chickens on Farms and at Slaughter toward Antimicrobials with Public Health Relevance. *Antibiotics.* 10, 1321.
 14. Salerno B, Furlan M, Sabatino R, Di Cesare A, Leati M, Volanti M, Barco L, Orsini M, Losasso C, and Cibir V. (2022). Antibiotic resistance genes load in an antibiotic-free organic broiler farm. *Poult Sci.*, 101(3):101675.
 15. Storey N, Cawthraw S, Turner O, Rambaldi M, Lemma F, Horton R, Randall L, Duggett NA, Abu Oun M, Martelli F, and Anjum MF. (2022). Use of genomics to explore AMR persistence in an outdoor pig farm with low antimicrobial usage. *Microbial genomics.* 8(3):000782.
 16. Yang Y, Ashworth AJ, Willett C, Cook K, Upadhyay A, Owens PR, Ricke SC, DeBruyn JM and Moore PA Jr. (2019). Review of Antibiotic Resistance, Ecology, Dissemination, and Mitigation in U.S. Broiler Poultry Systems. *Front. Microbiol.* 10:2639.