

INDAGINI PRELIMINARI SUL RUOLO RIVESTITO DA VOLATILI SELVATICI COME POTENZIALI RESERVOIR DI MICRORGANISMI ANTI-BIOTICO-RESISTENTI

Musa L.¹, Casagrande Proietti P.¹, Stefanetti V.¹, Toppi V.¹, Gobbi M.², Costantino I.³, Aisa F.³, Brescia M.³, Franciosini M.P.¹

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

²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche 'Togo Rosati', 06124 Perugia, Italy.*

³*Ospedale Veterinario Universitario Didattico, Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italia;*

Summary

Recently wild birds are matter of interest from the scientific community as potential spreaders of antibiotic resistance gene in urban and suburban environment also for the ability to migrate long distances in short periods. The aim of this work was to evaluate the antibiotic- susceptibility of commensal *Escherichia coli*, and the possible presence of ESBL *E. coli* and *Salmonella* spp. in some species of wild birds admitted to the Veterinary Hospital (Department of Veterinary Medicine, University of Study, Perugia). Most of the birds were represented by nocturnal and diurnal raptors and came from WildUmbria, a wildlife rescue center, showed traumatic lesions (hunting injuries, traumatic shock etc.). Cloacal swabs were collected before possible antimicrobial treatments. A total of 70 *E. coli* isolates were obtained from 70 samples (100%), while *Salmonella* spp. was not detected unlike other works documenting the presence of this microorganism in magpies, crows, gulls. Ampicillin, (61.42%); ($P < 0.001$), amoxicillin with clavulanic acid (42.85%); ($P < 0.001$) and ciprofloxacin (18.57%), were found to be the antibiotics against which bacterial strains displayed the highest prevalence of resistance. This is not surprising since these molecules are widely used in both veterinary and human medicine. It should also be reported that 10 out of 70 isolates (14.28%) showed multidrug-resistant (MDR) profile with the constant presence of beta lactam category. Five out of 70 *E. coli* isolates (7.14%) were Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) and four showed a multi-resistance profile and 2 displayed resistance to imipenem, often considered of last choice against human infections by "super resistant" bacteria. All *E. coli* isolates were sensitive to colistin with value MIC < 2 mg/L. Lack of resistance to colistin by *E. coli* isolates, in line with what it is reported in the literature, is likely due in part to the use off-label of this molecule in the veterinary sector. Diet, which for some species is represented by carcasses (rabbits, hares, badgers, rats, rodents), municipal and livestock waste could be responsible for the presence of the resistant gene in wildlife.

INTRODUZIONE

In questi ultimi anni l'interesse della comunità scientifica si è rivolto verso gli animali selvatici, volatili inclusi, quali potenziali soggetti sentinella in grado di rivelare il livello di contaminazione ambientale, in particolare del suolo, da parte di batteri veicoli di geni responsabili di antibiotico-resistenza (Bonnedahl e Järhult et al. 2014). Va considerato

inoltre che questi animali possono acquisire microrganismi resistenti da diverse nicchie ecologiche e nel caso di alcuni volatili, di diffonderli anche in aree geografiche diverse, vista la loro capacità di ricoprire lunghe distanze in breve tempo attraverso i percorsi migratori (Wang et al. 2017). Molti sono i fattori che contribuiscono alla contaminazione del suolo da parte di batteri/geni della resistenza: acque di scarico provenienti da allevamenti intensivi, discariche e impianti di trattamento delle acque reflue e la stessa fauna selvatica tramite anche l'escrezione fecale (Tardón et al. 2021). *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. sono considerati alcuni tra i batteri maggiormente responsabili della co-circolazione dei geni di resistenza tra l'ambiente, gli animali e l'uomo in quanto considerate specie in cui la selezione dei geni di resistenza è avvenuta più rapidamente nel corso degli anni, a seguito dell'uso diffuso di antimicrobici (Seiffert et al. 2013). Lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare il profilo di antibiotico-resistenza di ceppi di *E.coli* commensali, l'eventuale presenza di *E.coli*, *E.coli* ESBL e *Salmonella* spp. isolati in volatili selvatici ricoverati presso l'Ospedale Didattico Veterinario di Perugia (Dipartimento di Medicina Veterinaria-DMV).

MATERIALI E METODI

Campionamento

Un totale di 70 tamponi cloacali è stato prelevato da differenti specie di volatili selvatici al momento del ricovero nell'Ospedale Didattico, DMV, per eseguire il prelievo prima che venissero iniziate possibili terapie con antimicrobici. La maggior parte dei volatili, rappresentata da rapaci notturni e diurni, proveniva dal Centro di recupero animali selvatici "WildUmbria" e presentava alla visita clinica, lesioni riconducibili ad eventi traumatici (ferite da caccia, traumi da urti etc). Poiane e gheppi sono risultate le specie maggiormente investigate tra i rapaci diurni mentre civetta e assiolo tra quelle notturne (Tabella 1).

Tabella 1: Elenco e numero dei volatili selvatici testati in base all'Ordine di appartenenza

Specie	Numero
Rapaci diurni	29
Rapaci notturni	13
Passeriformi	8
Apopoidi	4
Columbiformi	7
Upupidi	1
Piciformes	2
Galliformi	2
Caprimulgiformes	1
Ardeidi	3

Isolamento e identificazione di *E. coli*

Per l'isolamento di *E.coli*, i campioni sono stati posti in terreno di pre-arricchimento costituito da acqua peptonata tamponata (BPW) in rapporto 1:10 e quindi sono stati incubati a 37 °C per 18-24 ore in aerobiosi. Da ciascun campione così diluito è stata prelevata una quantità pari a 0.1 ml di soluzione e quindi seminata su agar MacConkey, incubato per 24 h a 37 °C in condizione di anaerobiosi. Le

colonie con una morfologia riferibile a *E. coli* sono state tipizzate mediante appropriate prove biochimiche.

Isolamento e identificazione di Salmonella. spp

I campioni sono stati diluiti in proporzione di 1:10 con soluzione peptonata e incubati a 37 °C per 18 h in terreno di pre-arricchimento. Successivamente aliquote pari 0,1 ml sono state trasferite in 10 ml nel terreno selettivo di Rappaport Vassiliadis (Thermo Fisher Scientific, Rodano, MI) e incubato a 42 °C per 24 h. 10 µl delle diverse colture sono stati seminati su piastre di cromogeno (Liofilchem s.r.l, Roseto degli Abruzzi, Te, Italia) ed incubate a 37 °C per 24 h. Le colonie riconducibili a *Salmonella* spp., (ISO-6579) sono state sottoposte a tipizzazione tramite agglutinazione diretta con antisieri specifici seguendo lo schema di Kaufmann-White-Le Minor.

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

La suscettibilità antimicrobica è stata valutata con il metodo di Kirby-Bauer per i seguenti antibiotici e classe di appartenenza (Tabella 2): imipenem (IMP) (10 µg), ceftaxime (FOX) (30 µg), cefepime (FEP) (30 µg), cefotaxime (CTX) (30 µg), ceftazidime (CAZ) (30 µg), ampicillina (AMP) (10 µg), amoxicillina/acido clavulanico (AMC) (30 µg)b cloramfenicolo (CHL) (30 µg), azitromicina (AZM) (15 µg), acido nalidixico (NA) (30 µg), ciprofloxacina (CIP) (5 µg), tetraciclina (TE) (30 µg), sulfamethozaole/trimethoprim (SMX) (25 µg), gentamicina (CN) (10 µg). Per la colistina, la valutazione della suscettibilità è stata effettuata in triplicato mediante microdiluzione in piastra (cut-off >2 mg/L). Per tutti i ceppi di *E. coli* è stata valutata la produzione di ESBL tramite il test sinergico a doppio disco (DDST) e tramite la microdiluzione in piastra (Sensititre™ ESBL plates, Thermo Fisher Scientific, Milan, Italy). I risultati sono stati valutati seguendo i breakpoint stabiliti da EUCAST.

Tabella 2: Classe di appartenenza e antibiotici testati nel test di suscettibilità antimicrobica Kirby-Bauer e microdiluzione in piastra*

Antibiotici	Classe
Imipenem	Beta-lattamici
cefoxitina	
Cefepime	
Cefotaxime	
Ceftazidime	
Ampicillina	
Amoxicillina/acido clavulanico	
Cloramfenicolo	
Azitromicina	Macrolidi
Acido Nalidixico	Chinoloni
Ciprofloxacina	
Tetraciclina	Tetracicline
Sulfametoxazolo	Sulfamidici
Gentamicina	Aminoglicosidi
Colistina*	Polimixine

Analisi statistica

Si è effettuata un'analisi statistica, considerando i selvatici come unica categoria, al fine di valutare se le variazioni di suscettibilità di tutti gli isolati di *E. coli* nei confronti degli antibiotici testati fossero significative. L'analisi statistica è stata effettuata applicando il test statistico del Chi-quadro tramite il programma JASP (Versione 14.1) e i risultati sono stati considerati statisticamente significativi per valori di $P \leq 0,05$.

RISULTATI

In totale sono stati isolati 70 ceppi di *E. coli* mentre non è stata isolata alcuna *Salmonella* spp. Cinquantanove ceppi di *E. coli* hanno mostrato un'elevata prevalenza di resistenza alla ampicillina (84,28%); ($P < 0,001$), seguita dalla resistenza alla amoxicillina associata ad acido clavulanico con 30 isolati resistenti (42,85%); ($P < 0,001$). La resistenza a ciprofloxacina e cefotaxime ha presentato valori pari a 18,57% e 17,14 % rispettivamente. Un'elevata suscettibilità è stata riscontrata nei confronti di cloramfenicolo (94,28%) e azitromicina (97,14%). Tutti gli isolati sono risultati sensibili alla colistina (Tabella 3). Dieci isolati su 70 (14,28%) hanno mostrato un profilo di multiresistenza, sempre inclusivo della categoria dei beta-lattamici, con il pattern di resistenza a 4 classi di antibiotici maggiormente rappresentato (6/10, 60%) (Tabella 4). In 2 di questi isolati era presente la resistenza alla imipenem. Cinque su 70 isolati di *E. coli* (7,14%) erano ESBL e quattro hanno mostrato profili di multi-resistenza, 2 dei quali includevano resistenza all'imipenem.

Tabella 3: Numero e percentuale degli isolati di *E. coli* resistenti agli antibiotici testati

	Numero (S)	%	Numero (R)	%
Imipenem	64	91,42	6	5,57
Cefoxatina	65	92,85	5	7,14
Cefepime	63	90,00	7	10,00
Cefotaxime	58	82,85	12	17,14
Ceftazidime	62	88,57	8	11,42
Ampicillina	11	15,71	59	84,28
Amoxicillina/acido clavulanico	40	57,14	30	42,85
Cloramfenicolo	66	94,28	4	5,70
Azitromicina	68	97,14	2	2,85
Acido Nalidixico	64	91,42	6	5,57
Ciprofloxacina	57	81,42	13	18,57
Tetraciclina	62	88,57	8	11,42
Sulfametoxazolo	60	85,71	10	14,28
Gentamicina	62	88,57	8	11,42
Colistina	70	100	0	0
ESBL	65	92,85	5	7,14

Tabella 4: Pattern di multiresistenza degli isolati di *E. coli*

Pattern	Pattern di multiresistenza	<i>E. coli</i> (N)	<i>E. coli</i> (%)
3	BETA/CHIN/AMINO	1	10
	BETA/TET/SXT	1	10
4	BETA/CHIN/TET/SXT	3	30
	BETA/CHIN/SXT/AMINO	2	20
	BETA/MACRO/CHIN/SXT	1	10
5	BETA/MACRO/CHIN/TET/SXT	1	10
6	BETA/MACRO/CHIN/TET/SXT/AMINO	1	10

BETA (Beta-lattamici), MACRO (Macrolidi), CHIN (Chinoloni), TET (Tetracicline), SXT (Sulfamidici), AMINO (Aminoglicosidi)

DISCUSSIONE

Gli uccelli selvatici negli ultimi anni sono diventati oggetto di interesse da parte della comunità scientifica per il ruolo da loro svolto come “marker” rivelatori del grado di contaminazioni ambientale, aree urbane e suburbane incluse. In tale ottica si collocano gli studi sempre più frequenti, talvolta con risultati discordanti, riguardanti gli animali selvatici quali carrier di batteri/geni della resistenza nell’ecosistema (Guenther et al. 2010) they could likewise contribute to the dissemination of antimicrobial resistant bacteria in the environment. The aim of this study was therefore to get first insights into the antimicrobial resistance status among *E. coli* isolated from wild small mammals in rural areas. We tested 188 faecal isolates from eight rodent and one shrew species originating from Germany. Preselected resistant isolates were screened by minimal inhibitory concentration (MIC). In questa ricerca, le specie più frequentemente monitorate provenivano dal Centro di recupero “WildUmbria” ed erano rappresentate in maniera preponderante da volatili appartenente all’ordine degli Strigiliformi quali poiana e gheppio, tra i rapaci diurni, e civetta e assiolo tra i rapaci notturni. Queste specie erano recapitate al Centro soprattutto a causa di incidenti stradali, ferite a arma da fuoco, predazione e più raramente in seguito a intossicazioni e avvelenamenti, analogamente a quanto si verifica in altri centri (Dessalvi et al. 2021) the analyses focused upon the cause, provenance and species of hospitalised animals, the seasonal distribution of recoveries and the outcomes of hospitalisation in the different species. In addition, an in-depth analysis of the anthropogenic causes was conducted, with a particular focus on attempts of predation by domestic animals, especially cats. Significantly, 96.8% of animals hospitalised came from Liguria, the region in north-western Italy where CRAS is located, with 44.8% coming from the most populated and urbanised areas of Genoa, indicating a positive correlation between population density and the number of recoveries. A total of 5881 wild animals belonging to 162 species were transferred to CRAS during the six years study period. The presence of summer migratory bird species and the high reproductive rates of most animals in summer resulted in a corresponding seasonal peak of treated animals. Birds represented 80.9% of entries;

mammals accounted for 18.6% of hospitalisations; and about 0.5% of the entries were represented by reptiles and amphibians. Species protected by CITES and/or in IUCN Red List amounted to 8% of the total number of individuals. Consistent with results recorded elsewhere from Italy and other European countries, 53.9% of the specimens treated were released in nature; 4.7% were euthanised and 41.4% died. There was a significant difference between taxa in the frequency of individuals that were released, died or euthanised due to the intrinsic characteristics of species (more resistant or more adaptable to captivity than others. Va sottolineato che in tutti i soggetti è stata riscontrata una resistenza significativa degli isolati di *E. coli* alla ampicillina, seguita dall'amoxicilina, associata ad acido clavulanico in relazione al fatto che queste 2 molecole sono ampiamente utilizzate in medicina umana (Gilbert et al. 1974), mentre in campo veterinario l'amoxicillina è particolarmente impiegata nel corso di infezioni respiratorie nei mammiferi (Landers et al. 2012) e nei volatili in patologie enteriche sostenute da *Clostridium* spp. (Salvarani et al. 2012). È verosimile quindi supporre che i risultati ottenuti in questo caso siano la conseguenza di una contaminazione dei soggetti testati dovuta alle acque reflue degli allevamenti e dei centri urbani convergenti nell'ambiente. Il riscontro di *E. coli* resistenti a cefotaxime, beta lattamico di terza generazione, è un dato di interesse se si considera che, nonostante il divieto di utilizzo di cefalosporine negli animali da reddito, incluso il pollame, la resistenza alle cefalosporine è riportata in diverse specie di interesse zootecnico quali bovini al pascolo (Markland et al. 2019) e polli e galline allevati industrialmente. In questo ultimo caso si tratterebbe di contaminazione per via verticale dovuta alla trasmissione di geni della resistenza da parte dei riproduttori, in relazione alla struttura di produzione piramidale che caratterizza il settore avicolo (Musa et al. 2020). Gli isolati di *E. coli* sono risultati per la maggior parte sensibili ai macrolidi, rappresentati in questo lavoro da azitromicina, e al cloramfenicolo. Unica eccezione è costituita dagli isolati di *E. coli* provenienti da succiacapra e rondone, entrambi specie migratorie e pertanto in grado di trasportare i geni di resistenza a lunga distanza. L'azitromicina non viene comunemente usata negli allevamenti zootecnici sebbene abbia dato risultati confortanti nella terapia delle criptosporidiosi nel bovino (Yagci et al. 2017) e l'uso del cloramfenicolo è vietato in diversi Paesi negli animali da reddito (Benford et al. 2014). Va comunque specificato che i macrolidi, in particolare la tilosina, in virtù anche del tempo di sospensione pari a zero, è largamente impiegata in ambito veterinario, nelle infezioni sostenute da Micoplasmi e gram positivi (de Jong et al. 2021). Non è stato osservato nessun fenomeno di resistenza nei confronti della colistina. 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, 2019). Il profilo fenotipico di resistenza a 4 classi di antibiotici è stato quello maggiormente rappresentato e in 2 di questi isolati si è osservata anche la resistenza all'imipenem, una cefalosporina di ultima generazione, spesso considerata nel trattamento di super infezioni batteriche in pazienti umani (Wu et al. 2014). Cinque isolati su 70 sono risultati ESBL e, ad eccezione di uno, sono risultati caratterizzati da un profilo di multiresistenza. I batteri ESBL rappresentano una grave minaccia per la salute pubblica a livello globale e come è noto sono responsabili di gravi malattie infettive nell'uomo e negli animali, spesso a carattere setticemico (Ewers et al. 2012) using multilocus sequence typing (MLST, pertanto la

loro presenza nella fauna selvatica e nell'ambiente è fonte di crescente preoccupazione (Guenther et al. 2017) although recent studies have also shown chromosomal integration, e.g. in clinical *E. coli* isolates of ST38. As ESBL-producing *E. coli* are also found in nonclinical settings, we were interested in determining whether chromosomally integrated ESBL genes occur in ST38 isolates from non-clinical habitats, e.g. wildlife. Methods: Four ESBL-producing *E. coli* isolates of ST38 originating from Mongolian birds of prey sampled in 2015 were subjected to a detailed analysis in terms of phenotypic resistance, plasmid profiling and WGS, followed by the determination of genotypic resistance factors including the chromosomal integration of ESBL and carbapenemase genes. Results: Results based on phenotypic and genotypic plasmid profiling, contiguous sequence (contig. *Salmonella* spp. non è stata isolata nei volatili testati in questo studio, a differenza di altri lavori che documentano la presenza di tale microrganismo in gazze, cornacchie, e gabbiani (Palmgren et al. 2006; Rubini et al. 2016) 1998-2000, 1047 faecal swabs from Black-headed gulls were sampled at one location in Southern Sweden. *Salmonella* spp. was found in 28 individuals (2.7%. Va comunque riportato che la prevalenza di *Salmonella* spp. nei rapaci, i quali sono stati gli uccelli maggiormente monitorati, è generalmente minore di quanto si verifica in altri tipi volatili, quali gazze, cornacchie, gabbiani (Millán et al. 2004; Vogler et al. 2021) and 7.2% (9/123).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti hanno messo in evidenza nei selvatici la presenza di isolati di *E. coli* resistenti ad ampicillina e amoxicillina associata ad acido clavulanico, riconducibile a una verosimile contaminazione ambientale ma anche all'alimentazione che per alcune specie è rappresentata da carcasse (conigli, lepri, tassi, ratti, roditori) possibili carrier di geni di resistenza. E' da sottolineare il riscontro di resistenza a beta lattamici in tutti gli isolati di *E. coli* multiresistenti ed inoltre la presenza di alcuni ceppi resistenti a cefalosporine di III generazione, dovuta prevalentemente a fonti di contaminazione ambientale di origine umana. Questi risultati, confermando la bibliografia consultata, sottolineano la necessità di incrementare studi di monitoraggio al fine di meglio definire il ruolo degli animali selvatici nel circuito dell'antibiotico resistenza e di meglio determinare il potenziale rischio che rivestono per l'uomo come fonte di batteri/geni di resistenza.

BIBLIOGRAFIA

1. Benford, Diane, Sandra Ceccatelli, Bruce Cottrill, Michael DiNovi, Eugenia Dogliotti, Lutz Edler, Peter Farmer, et al. 2014. "Scientific Opinion on Chloramphenicol in Food and Feed." *EFSA Journal* 12 (11): 3907. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2014.3907>.
2. Bonnedahl, Jonas, and Josef D. Järhult. 2014. "Antibiotic Resistance in Wild Birds." *Uppsala Journal of Medical Sciences* 119 (2): 113–16. <https://doi.org/10.3109/03009734.2014.905663>.
3. Dessalvi, Gabriele, Enrico Borgo, and Loris Galli. 2021. "The Contribution to Wildlife Conservation of an Italian Recovery Centre." *Nature Conservation* 44 (May): 1–20. <https://doi.org/10.3897/NATURECONSERVATION.44.65528>.
4. Ewers, C., A. Bethe, T. Semmler, S. Guenther, and L. H. Wieler. 2012. "Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing and AmpC-Producing *Escherichia Coli*

- from Livestock and Companion Animals, and Their Putative Impact on Public Health: A Global Perspective.” *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 18 (7): 646–55. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2012.03850.X>.
5. Gilbert, D. N. 1974. “Comparison of Amoxicillin and Ampicillin in the Treatment of Urinary Tract Infections.” *The Journal of Infectious Diseases* 129 (Supplement_2): S231–34. https://doi.org/10.1093/INFDIS/129.SUPPLEMENT_2.S231.
 6. Guenther, Sebastian, Mirjam Grobbel, Katrin Heidemanns, Mathias Schlegel, Rainer G. Ulrich, Christa Ewers, and Lothar H. Wieler. 2010. “First Insights into Antimicrobial Resistance among Faecal Escherichia Coli Isolates from Small Wild Mammals in Rural Areas.” *The Science of the Total Environment* 408 (17): 3519–22. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2010.05.005>.
 7. Guenther, Sebastian, Torsten Semmler, Annegret Stubbe, Michael Stubbe, Lothar H. Wieler, and Katharina Schaufler. 2017. “Chromosomally Encoded ESBL Genes in Escherichia Coli of ST38 from Mongolian Wild Birds.” *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72 (5): 1310–13. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKX006>.
 8. Jong, Anno de, Myriam Youala, Ulrich Klein, Farid El Garch, Shabbir Simjee, Hilde Moyaert, Markus Rose, et al. 2021. “Minimal Inhibitory Concentration of Seven Antimicrobials to Mycoplasma Gallisepticum and Mycoplasma Synoviae Isolates from Six European Countries.” <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1861216> 50 (2): 161–73. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1861216>.
 9. Landers, Timothy F., Bevin Cohen, Thomas E. Wittum, and Elaine L. Larson. 2012. “A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential.” *Public Health Reports (Washington, D.C. : 1974)* 127 (1): 4–22. <https://doi.org/10.1177/003335491212700103>.
 10. Markland, Sarah, Thomas A. Weppelmann, Zhengxin Ma, Shinyoung Lee, Raies A. Mir, Lin Teng, Amber Ginn, et al. 2019. “High Prevalence of Cefotaxime Resistant Bacteria in Grazing Beef Cattle: A Cross Sectional Study.” *Frontiers in Microbiology* 10 (feburay): 176. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2019.00176/BIBTEX>.
 11. Millán, J., G. Aduriz, B. Moreno, R. A. Juste, and M. Barral. 2004. “Salmonella Isolates from Wild Birds and Mammals in the Basque Country (Spain).” *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 23 (3): 905–11. <https://doi.org/10.20506/RST.23.3.1529>.
 12. Musa, Laura, Patrizia Casagrande Proietti, Raffaella Branciani, Laura Menchetti, Sara Bellucci, David Ranucci, Maria Luisa Marenzoni, and Maria Pia Franciosini. 2020. “Antimicrobial Susceptibility of Escherichia Coli and ESBL-Producing Escherichia Coli Diffusion in Conventional, Organic and Antibiotic-Free Meat Chickens at Slaughter.” *Animals : An Open Access Journal from MDPI* 10 (7): 1–12. <https://doi.org/10.3390/ANI10071215>.
 13. Palmgren, H., A. Aspán, T. Broman, K. Bengtsson, L. Blomquist, S. Bergström, M. Sellin, R. Wollin, and B. Olsen. 2006. “Salmonella in Black-Headed Gulls (Larus Ridibundus); Prevalence, Genotypes and Influence on Salmonella Epi-

- demiology.” *Epidemiology and Infection* 134 (3): 635. <https://doi.org/10.1017/S0950268805005261>.
14. Rubini, Silva, Cinzia Ravaioli, Sara Previato, Mario D’Incau, Massimo Tassinari, Enrica Guidi, Silvia Lupi, Giuseppe Meriardi, and Mauro Bergamini. 2016. “Prevalence of Salmonella Strains in Wild Animals from a Highly Populated Area of North-Eastern Italy.” *Annali Dell’Istituto Superiore Di Sanita* 52 (2): 277–80. https://doi.org/10.4415/ANN_16_02_21.
 15. Salvarani, Felipe Masiero, Rodrigo Otávio Silveira Silva, Prhiscylla Sadanã Pires, Eduardo Coulaud da Costa Cruz Júnior, Isabella Silva Albefaro, Roberto Maurício de Carvalho Guedes, and Francisco Carlos Faria Lobato. 2012. “Antimicrobial Susceptibility of Clostridium Perfringens Isolated from Piglets with or without Diarrhea in Brazil.” *Brazilian Journal of Microbiology* 43 (3): 1030–33. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822012000300027>.
 16. Seiffert, Salome N., Markus Hilty, Vincent Perreten, and Andrea Endimiani. 2013. “Extended-Spectrum Cephalosporin-Resistant Gram-Negative Organisms in Livestock: An Emerging Problem for Human Health?” *Drug Resistance Updates : Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 16 (1–2): 22–45. <https://doi.org/10.1016/J.DRUP.2012.12.001>.
 17. Tardón, A., E. Bataller, L. Llobat, and E. Jiménez-Trigos. 2021. “Bacteria and Antibiotic Resistance Detection in Fractures of Wild Birds from Wildlife Rehabilitation Centres in Spain.” *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 74 (February). <https://doi.org/10.1016/J.CIMID.2020.101575>.
 18. “The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in Zoonotic and Indicator Bacteria from Humans, Animals and Food in 2017.” 2019. *EFSA Journal* 17 (2). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2019.5598>.
 19. Vogler, Barbara R, Katrin Zurfluh, Prisca Mattmann, Kira Schmitt, Sarah Albin, and Correspondence R Barbara Vogler. 2021. “Low Occurrence of Salmonella Spp. in Wild Birds from a Swiss Rehabilitation Centre.” *Veterinary Record Open* 8 (1): e17. <https://doi.org/10.1002/VRO2.17>.
 20. Wang, Jing, Zhen Bao Ma, Zhen Ling Zeng, Xue Wen Yang, Ying Huang, and Jian Hua Liu. 2017. “The Role of Wildlife (Wild Birds) in the Global Transmission of Antimicrobial Resistance Genes.” *Zoological Research* 38 (2): 55–80. <https://doi.org/10.24272/J.ISSN.2095-8137.2017.003>.
 21. Wu LJ, Jin HJ, and Xu LP. 2014. “Wu LJ, Jin HJ, Xu LP. 2014. Meta-Analysis on Meropenem and Imipenem/Cilastatin Sodium in the Treatment of Bacterial Infection. *World Notes Antibiotics* 35:28–31.” *World Notes Antibiotics* 35: 28–31. <https://doi.org/10.1128/AAC.00385-20>.
 22. Yagci, B B, N Ocal, S Yasa Duru, and M Akyol. n.d. “The Efficacy of a Combination of Azithromycin and Toltrazuril for the Treatment of Calves Naturally Infected with Cryptosporidiosis: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Comparative Clinical Trial.” *Original Paper Veterinarni Medicina* 62 (06): 308–14. <https://doi.org/10.17221/125/2015-VETMED>.