

ALIMENTI E ANTIMICROBICO RESISTENZA

# ***Escherichia coli* antibiotico-resistenti: un problema di salute pubblica nella filiera della carne suina?**



<sup>1</sup>MARTINA REGA, <sup>1</sup>LAURA ANDRIANI, <sup>2</sup>ANTONIO POETA, <sup>2</sup>GIORGIO MICAGNI, <sup>3</sup>FEDERICO SPINOSO,  
<sup>1</sup>SILVIA BONARDI, <sup>1</sup>MAURO CONTER, <sup>1</sup>CRISTINA BACCI

<sup>1</sup>Unità Operativa di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma

<sup>2</sup>Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) sede Reggio Emilia

<sup>3</sup>Azienda Unità Sanitaria Locale (AUSL) sede Modena

**L**a resistenza antimicrobica è uno dei rischi più significativi, in quanto la diminuzione della sensibilità dei microrganismi ai farmaci comunemente usati si ripercuote sempre più sulla salute umana, animale e dell'ambiente [1-3]. Questo fenomeno impatta anche sulla gestione degli animali da reddito e l'attenzione è sempre maggiore nei prodotti alimentari che da essi derivano [4-6]. Il monitoraggio della resistenza

antimicrobica nella catena alimentare è stato istituito dalla Direttiva UE 2003/99 sulle zoonosi e agenti zoonotici [7]. La Commissione europea, sotto la guida scientifica dell'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), ha fornito informazioni e decisioni preziose per la definizione di popolazioni animali, categorie alimentari e pericoli microbiologici legati al fenomeno [8].

Un buon bioindicatore per il monitoraggio dell'antimicrobico resistenza è *Escherichia coli* (*E. coli*), in quanto batterio ubiquitario e commensale del tratto intestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, in grado di acquisire resistenze multi-farmaco per le sue caratteristiche morfologiche e replicative [9,10]. Le carni di maiale e di pollame sono state identificate come fonte di trasferimento all'uomo di microrganismi resistenti agli antimicrobici e, una recente indagine, ha stimato che esiste una probabilità dell'1,5% di esposizione a *E. coli* resistenti attraverso il consumo di carne [11].

Gli alimenti di origine animale possono essere contaminati, da batteri resistenti agli antimicrobici, in fase di macellazione degli animali o di lavorazione e manipolazione degli alimenti. Ad aumentare il rischio interviene la capacità dei batteri di trasferire, ad altri, componenti genetiche legate all'antibiotico resistenza attraverso la coniugazione. La manipolazione degli alimenti di origine animale e la crescente domanda di carne cruda, da parte del consumatore finale, aumentano il rischio di contaminazione crociata tra alimenti [12]. Come noto, i processi di trasformazione degli alimenti prolungano la durata di conservazione dei prodotti, ciononostante, le cellule batteriche stressate o danneggiate in modo sub-letale possono essere una fonte di DNA batterico libero, compresa l'eventuale presenza di geni di resistenza antimicrobica [11, 13].

L'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS) ha classificato alcuni agenti antimicrobici come "Antimicrobici di Importanza Critica" (CIA) per la salute umana, definendo il rischio legato all'uso di questi farmaci [14].

Le molecole antimicrobiche impiegate nel presente studio sono CIA ad "alta o altissima priorità", appartenenti alle classi dei  $\beta$ -lattamici (cefalosporine di 3<sup>a</sup> e 4<sup>a</sup> generazione, carbapenemi, monobattami e penicilline), chinoloni, aminoglicosidi, polimixine e glicilciline. Questa classificazione si basa sulla disponibilità di terapie antimicrobiche alternative per il trattamento di infezioni batteriche gravi, in particolare nei confronti dei microrganismi che possono essere trasmessi all'uomo o acquisire geni di resistenza da una fonte non umana [15]. Dal 2010 al 2020 le vendite di antimicrobici veterinari sono diminuite del 30% [16, 17], nonostante ciò, l'Italia è uno dei Paesi dell'Unione Europea con le maggiori vendite di antimicrobici veterinari, dopo Germania, Spagna, Regno Unito, Francia e Polonia [18].

Il seguente studio è stato quindi progettato e condotto focalizzandosi sulla filiera alimentare della carne suina in una prospettiva "from farm to fork". Le feci, le carcasse e i prodotti carnei (carne fresca, prodotti carnei stagionati e fermentati) di suino sono stati analizzati lungo l'intera catena di produzione alimentare. Sono stati isolati e testati *E. coli*, per valutarne i profili di antibiotico resistenza e le similitudini filogenetiche. È stato, quindi, studiato il potenziale coinvolgimento delle fasi di produzione degli alimenti nella trasmissione di batteri resistenti agli antimicrobici al consumatore [19].

## La raccolta dei campioni

I campioni, raccolti nel periodo 2020-2022, da otto diversi allevamenti suinicoli (A, B, C, D, E, F, G, H), siti nelle province di Modena e Reggio Emilia (Emilia-Romagna, Italia), comprendevano feci, carcasse e prodotti carnei (carne fresca, prodotti carnei stagionati e fermentati). I campioni fecali sono stati raccolti da 30 suini, per azienda, utilizzando tamponi rettali. Ogni suino è stato contrassegnato con una marca auricolare e seguito nella filiera di produzione alimentare. L'uso di trattamenti antimicrobici sugli animali è stato monitorato per i quattro mesi precedenti la macellazione, mediante la raccolta di prescrizioni elettroniche.

I capi selezionati sono stati indagati anche in fase di macellazione e dalle carcasse sono stati prelevati campioni, mediante l'impiego di spugne pre-inumidite (norma ISO 17604:2015 [20], Reg. CE 2073/05 [21]). Sono state inoltre, prelevate porzioni di carne fresca (25 g) e parti di carcassa destinate alla produzione di prodotti carnei stagionati (coppa/pancetta) e fermentati (salame). I prodotti sono stati campionati, esclusivamente, dai capi che avevano mostrato la presenza di batteri antibiotico resistenti dai tamponi fecali. I prodotti carnei trasformati sono stati analizzati al termine dei processi di stagionatura (coppa, pancetta) e di fermentazione (salame). Il numero totale di campioni raccolti è stato di 245 tamponi fecali, 225 spugne, 62 campioni di carne fresca, 15 prodotti stagionati e 7 prodotti fermentati. Tutti i campioni sono stati inviati all'Unità Operativa di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie, Università di Parma.

## La valutazione dell'antimicrobico resistenza

A seguito dell'arricchimento dei campioni sono stati isolati e identificati gli *E. coli*, come indicato dalla norma UNI EN ISO 16649-2:2001 [22] e la stessa procedura è stata applicata a tutte le matrici campionate.

*E. coli* sono stati sottoposti a test di suscettibilità antimicrobica, nei confronti di una serie di molecole di seguito riportate, definendone la Concentrazione Minima Inibente (MIC) [23]:

- $\beta$ -lattamici: meropenem (MERO: sensibile (S) $\leq$ 0,25 - resistente (R) $>$ 8), piperacillina/tazobactam (P/T4: S $\leq$ 8 - R $>$ 16), amoxicillina/clavulanico (AUGC: S $<$ 8 - R $>$ 8), ceftolozane/tazobactam (C/T4: S $\leq$ 1 - R $>$ 1), cefotaxime (FOT: S $<$ 1 - R $>$ 2), ceftazidime (TAZ: S $<$ 1 - R $>$ 4), ceftazidime/tazobactam (CZA: S $\leq$ 8 - R $>$ 8), imipenem (IMI: S $\leq$  2 - R $>$ 8), ertapenem (ETP: S $\leq$  0,5 - R $>$ 1);
- aztreonam (AZT: S $\leq$ 1 - R $>$ 4);
- aminoglicosidi: amikacina (AMI: S $\leq$ 8 - R $>$ 16), gentamicina (GEN: S $\leq$ 2-R $>$ 4), tobramicina (TOB: S $\leq$ 2 - R $>$ 4);
- chinoloni: ciprofloxacina (CIP: S $\leq$ 0,25 - R $>$ 0,5);
- polimixina: colistina (COL: S $\leq$ 2 - R $>$ 2);
- glicilciline: tigeciclina (TGC: S $\leq$ 1 - R $>$ 2);
- sulfamidici: sulfametossazolo/trimetoprim (SXT: S $\leq$ 2 -R $>$ 4).

Tutti i ceppi, che hanno mostrato lo stesso pattern di resistenza nelle feci, nelle carcasse e nei prodotti carnei freschi e trasformati isolati dallo stesso capo, sono stati sottoposti ad analisi filogenetica al fine di valutare la possibile trasmissione “from farm to fork”. La determinazione della somiglianza filogenetica degli isolati è stata eseguita utilizzando la *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus* PCR (ERIC-PCR), come descritto da Ventura *et al.* 2003 [24].

## I risultati ottenuti

*E. coli* è stato isolato da campioni fecali (243 su 245), di carcasse (225 su 225), di carne fresca (62 su 62), di prodotti fermati (7 su 7) e prodotti stagionati (8 su 15).

Le resistenze antimicrobiche sono state maggiormente rilevate nei confronti delle molecole SXT, TOB e GEN, come riportato nella figura 1.

In particolare, circa il 60% degli *E. coli* isolati dalle feci e dalle carcasse ed in media il 36% degli isolati dai prodotti carnei sono risultati resistenti a SXT. La resistenza a TOB è stata osservata circa nel 50%, nel 40% e nel 30% degli *E. coli* isolati rispettivamente da feci, carcasse e prodotti carnei. La resistenza alla GEN è stata rilevata nel 30%, 20% e 11% degli *E. coli* isolati lungo la catena alimentare (feci, carcasse e prodotti carnei). Degli isolati dalle feci, solo un ceppo (0,4%) è risultato resistente a MERO e uno (0,4%) resistente a TAZ. Solo un *E. coli* isolato dalle carcasse (0,4%) ha mostrato resistenza a FOT. La presenza di isolati da feci e carcasse resistenti a AZT, TGC o COL non è stata riscontrata invece nei ceppi isolati da prodotti carnei (Figura 1). Tutti gli isolati individuati lungo la catena alimentare hanno mostrato una sensibilità a C/T, P/T4, CZA, IMI, EPT.

I pattern di resistenza antibiotica manifestati dagli isolati, lungo l'intera catena alimentare (feci, carcasse, prodotti carnei), sono di seguito riportati: SXT; SXT-TOB; AMI-GEN-TOB-SXT. Le similitudini filogenetiche tra i microorganismi che presentavano questi profili sono state valutate a livello biomolecolare (tabella 1).

Nell'azienda A, è stata rilevata la resistenza a SXT in isolati da feci, carne fresca e prodotti stagionati del Capo 3 e sono state confermate somiglianze filogenetiche tra i diversi ceppi. Inoltre, nello stesso allevamento, è stata rilevata la stessa resistenza in *E. coli* di provenienza fecale, di carcasse e di carne fresca nel Capo 8. In questo caso, le somiglianze filogenetiche sono state riscontrate solo tra gli isolati da feci e carcasse. Negli allevamenti C e G sono stati trovati *E. coli* resistenti a

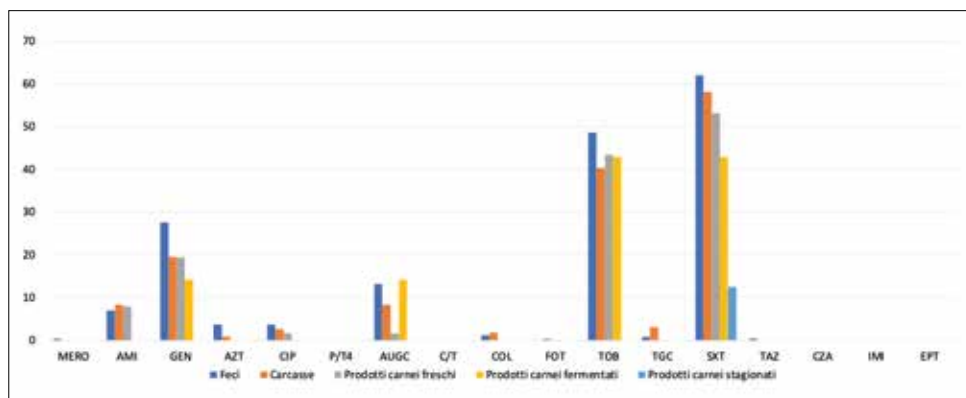


Figura 1. Prevalenza di *E. coli* resistenti agli antimicrobici isolati da feci, carcasse e prodotti a base di carne

MERO=meropenem, AUGC= amoxicillina/clavulanico, C/T4= ceftolozane/tazobactam, FOT=cefotaxime, TAZ=ceftazidime, CZA= ceftazidime/tazobactam, IMI=imipenem, ETP=ertapenem, AZT=aztreonam, AMI=amikacina, GEN=gentamicina, TOB=tobramicina, CIP=ciprofloxacina, COL=colistina, TGC=tigeciclina, SXT=solfametossazolo/trimetoprim.

SXT nei campioni di carcasse e nei relativi campioni di carne fresca (rispettivamente Capo 44 e Capo 57) e le somiglianze filogenetiche sono state confermate.

Il pattern di resistenza SXT-TOB è stato il più frequentemente riscontrato. Infatti, negli allevamenti B e H sono stati trovati ceppi di *E. coli* resistenti nelle carcasse e nei campioni di carne fresca del Capo 34 e del Capo 9 rispettivamente (come mostrato nella tabella 1) ma nessuna somiglianza filogenetica è stata evidenziata. Nell'azienda C, un *E. coli* isolato dalle feci (Capo 27) e uno da carcassa (Capo 21) presentano lo stesso pattern SXT-TOB degli isolati di carne fresca (Capo 27 e 21 rispettivamente) ma solo gli isolati dal Capo 27 hanno presentato somiglianze filogenetiche. Nell'azienda G, due ceppi di *E. coli* fecali (Capo 51 e Capo 52) hanno mostrato lo stesso pattern di resistenza dei loro prodotti carnei (carne fresca e prodotti fermentati) con conferma di somiglianze filogenetiche. Nel Capo 55 appartenente alla stessa azienda, sono stati trovati ceppi resistenti a SXT-TOB lungo tutta la catena alimentare ma solo gli isolati da feci e da carcasse sono risultati filogeneticamente correlati. Il pattern AMI-GEN-TOB-SXT è stato riscontrato in *E. coli* isolati dalle feci e dalla carne fresca del Capo 46 nell'azienda F (tabella 1) ma nessuna somiglianza filogenetica è stata evidenziata.

I dati ottenuti sono stati confrontati con le informazioni ricavate dalle prescrizioni elettroniche, raccolte ma nessun trattamento antimicrobico è stato somministrato durante il periodo indagato.

## Considerazioni sui dati ottenuti

I batteri commensali negli animali sono attualmente riconosciuti come un serbatoio di antimicrobico resistenza e, allo

**Tabella 1. *E. coli* AMR isolati nell'intera catena alimentare (feci, carcasse e prodotti carnei dello stesso capo suino)**

Allevamento	Pattern resistenza	Feci	Carcasse	Carne fresca	Prodotti carnei fermentati	Prodotti carnei stagionati
A	SXT	Capo 3		Capo 3		Capo 3
		Capo 8	Capo 8	Capo 8		
B	SXT-TOB		Capo 34	Capo 34		
C	SXT		Capo 44	Capo 44		
		Capo 27		Capo 27		
			Capo 21	Capo 21		
F	AMI-GEN TOB-SXT	Capo 46		Capo 46		
G	SXT		Capo 57	Capo 57		
		Capo 51		Capo 51		
		Capo 52			Capo 52	
		Capo 55	Capo 55	Capo 55		
H	SXT-TOB		Capo 9	Capo 9		

stesso tempo, una fonte di trasmissione. Tuttavia, il ruolo della trasmissione longitudinale di questi batteri direttamente dal bestiame all'uomo, attraverso il consumo dei loro prodotti carnei, è ancora poco conosciuto [25]. Ad amplificare il fenomeno interviene la sempre più elevata richiesta di cibi pronti, di carne cruda o non adeguatamente cotta [26]. La Decisione 2013/652/UE della Commissione Europea [27], esorta al monitoraggio della resistenza antimicrobica in *E. coli* nelle principali popolazioni di animali da produzione alimentare e nei loro prodotti derivati.

Il rapporto EFSA/ECDC, 2022 [28], riporta valori di resistenza elevati all'ampicillina, al sulfametossazolo, al trimetoprim e alla tetraciclina, in tutte le categorie di animali in Europa.

I risultati evidenziati nel presente studio confermano parzialmente tali dati. Infatti, risulta paragonabile la resistenza al sulfametossazolo mentre sono stati rilevati più alti livelli di resistenza agli aminoglicosidi (GEN e TOB). A supporto, altri studi hanno mostrato la presenza di *E. coli* resistenti agli aminoglicosidi nella carne suina al momento della macellazione, associati a resistenze alla penicillina e alla tetraciclina [29, 30]. I dati relativi alla resistenza alla colistina, all'azitromicina, al cefotaxime, al ceftazidime mostrano una minor diffusione del fenomeno, come riportato anche in altri Paesi Europei. Nessuna resistenza è stata evidenziata in Europa nei confronti del meropenem, rilevata invece nel nostro studio in un solo ceppo isolato dalle feci [28].

Complessivamente, i dati hanno mostrato un esiguo numero di filiere che presentavano ceppi batterici con profili di antimicrobico resistenza simili (12/243) ma su queste, l'indagine filogenetica, mostra il 50% di similitudini batteriche che coinvolgevano i prodotti carnei. Tra queste, le relazioni filogenetiche sono state riscontrate più frequentemente con coinvolgimento degli isolati da carne fresca. In particolare, in tre casi, sono state ritrovate similitudini tra *E. coli* fecali ed

isolati da carne fresca (Capo 3, 27, 51) ed in due casi tra isolati da carcasse e carne fresca (Capo 44 e Capo 57). Solamente in due filiere le relazioni riscontrate, hanno coinvolto anche il prodotto carneo stagionato (Capo 3, 52).

Diversi studi condotti negli Stati Uniti ed in Europa hanno messo in evidenza legami tra microrganismi isolati dalla carne di pollame, maiale e il consumatore finale [30-32].

In particolare, la carne di maiale può essere un serbatoio di batteri resistenti agli antimicrobici che possono essere trasferiti intra ed inter-specie [29]. La sorveglianza della resistenza antimicrobica nella catena di produzione del suino, attraverso la tipizzazione di sequenze *multilocus* (MLST) e il sequenziamento dell'intero genoma ha fornito prove di somiglianze genetiche con isolati da infezioni umane nosocomiali [33, 34].

Questo studio ha evidenziato che è possibile riscontrare la presenza di batteri antibiotico resistenti nei prodotti alimentari, tuttavia, i prodotti carnei trasformati sono risultati, solo occasionalmente, portatori di *E. coli* antibiotico-resistenti. Questo dato conferma che la trasformazione (stagionatura o fermentazione) è sicuramente un processo tecnologico idoneo per il contenimento del fenomeno. È inoltre doveroso sottolineare che la ricerca non ha valutato la potenziale contaminazione crociata, legata alla manipolazione e alla lavorazione degli alimenti da parte dei consumatori, che notoriamente, può rappresentare un ulteriore fattore di rischio [35, 36].

In conclusione, i dati mostrano che il maggior rischio di trasmissione di batteri antibiotico resistenti al consumatore è connesso alla matrice carnea fresca, rispetto ai prodotti carnei stagionati e fermentati. Indagini condotte a livello europeo riportano che, meno della metà dei consumatori, identificano i prodotti carnei come una via trasmissione di batteri resistenti agli antibiotici [36-38]. Ciò rafforza, in un'ottica One

Health, l'importanza della comunicazione chiara ed efficace dei rischi legati all'antibiotico resistenza nella filiera di produzione alimentare.

## Bibliografia

1. Collignon, P. J.; McEwen, S. A. One Health-Its Importance in Helping to Better Control Antimicrobial Resistance. *Infect Dis Trop Med* 2019, 4(1), 22, doi:10.3390/tropicalmed4010022.
2. George, A. Antimicrobial Resistance (AMR) in the Food Chain: Trade, One Health and Codex. *Infect Dis Trop Med* 2019, 4(1), 54, doi:10.3390/tropicalmed4010054.
3. 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, A. B.; de Oliveira, C. J. B.; Gebreyes, W. A. Antimicrobial resistance in the globalized food chain: a One Health perspective applied to the poultry industry. *Braz J of Microbiol* 2022, 53(1), 465–486, doi:10.1007/s42770-021-00635-8
4. Bacci, C.; Barilli, E.; Frascolla, V.; Rega, M.; Torreggiani, C.; Vismarra, A. Antibiotic Treatment Administered to Pigs and Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* Isolated from Their Feces and Carcasses. *MDR* 2020, 26(9), 1081-1089, doi:10.1089/mdr.2019.0247.
5. Vidovic, N.; Vidovic, S. Antimicrobial Resistance and Food Animals: Influence of Livestock Environment on the Emergence and Dissemination of Antimicrobial Resistance. *Antibiotics* 2020, 9(2), doi:10.3390/antibiotics9020052.
6. Xu, C.; Kong, L.; Gao, H.; Cheng, X.; Wang, X. A Review of Current Bacterial Resistance to Antibiotics in Food Animals. *Front Microbiol* 2022, 13, 1458, doi:10.3389/fmicb.2022.822689/bibtex.
7. Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council. Monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC, OJ 2003, L 325, 31-40, doi:data.europa.eu/eli/dir/2003/99/oj.
8. Aerts, M.; Battisti, A.; Hendriksen, R.; Kempf, I.; Teale, C.; Tenhagen, B. A.; Veldman, K.; Wasyl, D.; Guerra, B.; Liébana, E.; Thomas-López, D.; Belœil, P. A. Technical specifications on harmonised monitoring of antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from food-producing animals and food. *EFSA Journal* 2019, 17(6), doi:10.2903/j.efsa.2019.5709.
9. Paitan, Y. Current trends in antimicrobial resistance of *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 2018, 416, 181–211, doi:10.1007/82\_2018\_110/cover.
10. Ramos, S.; Silva, V.; de Lurdes Enes Dapkevicius, M.; Caniça, M.; Tejedor-Junco, M. T.; Igrejas, G.; Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Production. *Animals* 2020, 10(12), 1–15, doi:10.3390/ani10122239.
11. Verraes, C.; van Boxstael, S.; van Meervenne, E.; van Coillie, E.; Butaye, P.; Catry, B.; de Schaetzen, M. A.; van Huffel, X.; Imberechts, H.; Dierick, K.; Daube, G.; Saegerman, C.; de Block, J.; Dewulf, J.; Herman, L. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *IJERPH* 2013, 10(7), 2643. doi:10.3390/ijerph10072643.
12. Antunes, P.; Novais, C.; Peixe, L. Food-to-Humans Bacterial Transmission. *Microbiol Spectr* 2016, 8(1), doi:10.1128/microbiolspec.MTBP-0019-2016.
13. Amit, S. K.; Uddin, M. M.; Rahman, R.; Islam, S. M. R.; Khan, M. S. A review on mechanisms and commercial aspects of food preservation and processing. *Agric Food Sec* 2017, 6(1), 1–22, doi:10.1186/s40066-017-0130-8/tables/21.
14. World Health Organisation (WHO). Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th ed.; WHO; Publisher: Switzerland, 2018, ISBN: 9789241515528.
15. World Health Organisation (WHO). WHO list of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine (WHO CIA list). Available online: <https://www.who.int/foodsafety/publications/antimicrobials-sixth/en/> (accessed on: February 2020).
16. European Medicine Agency (EMA)- Veterinary Medicine Division. Sales trends (MG/PCU) of antimicrobials VMPs for food-producing animals. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/italy-sales-trends-mg/pcu-antibiotic-veterinary-medicinal-products-food-producing-animals-2010-2021\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/italy-sales-trends-mg/pcu-antibiotic-veterinary-medicinal-products-food-producing-animals-2010-2021_en.pdf) (accessed on October 2022).
17. European Commission-Directorate-General for Health and Food Safety (DG SANTE). Final report of a fact-finding mission carried out in Italy from 08 November 2018 to 16 November 2018 in order to gather information on the prudent use of antimicrobials in animals. Ref. Ares(2019)905480. Available online: [file:///Users/martinarega/Downloads/FINAL\\_SIGNED\\_MR\\_2018-6371\\_EN.pdf%20\(1\).pdf](file:///Users/martinarega/Downloads/FINAL_SIGNED_MR_2018-6371_EN.pdf%20(1).pdf) (accessed October 2022).
18. European Medicine Agency (EMA). Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2019 and 2020. Available online: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-2020-trends-2010-2020-eleventh\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2019-2020-trends-2010-2020-eleventh_en.pdf) (accessed: October 2022).
19. Rega, M.; Andriani, L.; Poeta, A.; Bonardi, S.; Conter, M.; Bacci, C. The Pork Food Chain as a Route of Transmission of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli*: A Farm-to-Fork Perspective. *Antibiotics (Basel)* 2023, 12(2), 376, doi: 10.3390/antibiotics12020376.
20. EN ISO 17604:2015 - Microbiology of the food chain - Carcass sampling for microbiological analysis. International Organization for Standardization, 2001, Geneva, Switzerland.
21. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. OJ 2005, L 388, 1–26, doi: data.europa.eu/eli/reg/2005/2073/oj.

22. EN ISO 16649-2:2001; Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs—Horizontal Method for the Enumeration of Beta- Glucuronidase-Positive *Escherichia coli*-Part 2: Colony-Count Technique at 44 Degrees C Using 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Beta-D-Glucuronide. International Organization for Standardization, 2001, Geneva, Switzerland.
23. European Committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST). v\_10.0\_Breakpoint\_Tables 2022. Available online: [https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_10.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_10.0_Breakpoint_Tables.pdf) (accessed: January 2020).
24. Ventura, M.; Meylan, V.; Zink, R. Identification and tracing of *Bifidobacterium* species by use of enterobacterial repetitive intergenic consensus sequences. *Appl Environ Microbiol* 2003, 69(7), 4296–4301, doi:10.1128/aem.69.7.4296-4301.2003.
25. Lugsomya, K.; Yindee, J.; Niyomtham, W.; Tribuddharat, C.; Tummaruk, P.; Hampson, D. J.; Prapasarakul, N. Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* Isolated from Pigs and Pork Derived from Farms Either Routinely Using or Not Using In-Feed Antimicrobials. *Microb Drug Resist* 2018, 24(7), 1054-1066, doi:10.1089/mdr.2018.0154.
26. Rega, M.; Carmosino, I.; Bonilauri, P.; Frascolla, V.; Vismarra, A.; Bacci, C. Prevalence of ESL, AmpC and Colistin-Resistant *E. coli* in Meat: A Comparison between Pork and Wild Boar. *Microorganisms* 2021, 9, 214, doi:10.3390/microorganisms9020214.
27. 2013/652/EU: Commission Implementing Decision of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria (notified under document C(2013) 7145), OJ 2013, L 303, 26-39, doi: data.europa.eu/eli/dec\_impl/2013/652/oj.
28. 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 2019–2020. *EFSA J* 2022, doi: 10.2903/j.efsa.2022.7209.
29. Heidemann Olsen, R.; Yan, H.; Nie, Q.; Meng, H.; & Shi, L. Antimicrobial Resistance and Resistance Genes in Aerobic Bacteria Isolated from Pork at Slaughter. *J Food Prot* 2016, 79(4), 589-597, doi:10.4315/0362-028X.JFP-15-455.
30. 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.; de Koeijer, A.; Dohmen, W.; Schmitt, H.; Liakopoulos, A.; Pacholewicz, E.; Lam, T. J. G. M.; Velthuis, A. G.; Heuvelink, A.; Gonggrijp, M. A.; van Duijkeren, E.; van Hoek, A.H.A.M.; de Roda Husman, A.N.; Blaak, H.; Havelaar, A.H. ; Mevius, D.J.; Heederik, D. J. J. Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis. *J Antimicrob Chemoter* 2018, 73, 339-347, doi:10.1093/jac/dkx397.
31. Novais, C.; Coque, T. M.; Sousa, J. C.; Peixe, L. v. (2006). Antimicrobial resistance among faecal enterococci from healthy individuals in Portugal. *Clin Microbiol Infect* 2006, 12(11), 1131-1134, doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01542.x.
32. Donabedian, S. M.; Thal, L. A.; Hershberger, E.; Perri, M. B.; Chow, J. W.; Bartlett, P.; Jones, R.; Joyce, K.; Rossiter, S.; Gay, K.; Johnson, J.; Mackinson, C.; Debess, E.; Madden, J.; Angulo, F.; Zervos, M. J. Molecular characterization of gentamicin-resistant Enterococci in the United States: Evidence of spread from animals to humans through food. *J Clin Microbiol* 2003, 41(3), 1109-1113 doi:10.1128/jcm.41.3.1109-1113.2003.
33. Sirichokchatchawan, W.; Apiwatsiri, P.; Pupa, P.; Saenkankam, I.; Khine, N. O.; Lekagul, A.; Lugsomya, K.; Hampson, D. J.; Prapasarakul, N. Reducing the Risk of Transmission of Critical Antimicrobial Resistance Determinants From Contaminated Pork Products to Humans in South-East Asia. *Front Microbiol* 2021, 12, 689015, doi:10.3389/fmicb.2021.689015.
34. Bonardi, S.; Cabassi, C.S.; Manfreda, G.; Parisi, A.; Fiaccadori, E.; Sabatino, A.; Cavirani, S.; Bacci, C.; Rega, M.; Spadini, C.; Iannarelli, M.; Crippa, C.; Ruocco, F.; Pasquali, F. Survey on Carbapenem-Resistant Bacteria in Pigs at Slaughter and Comparison with Human Clinical Isolates in Italy. *Antibiotics* 2022, 11(6), 777, doi: 10.3390/antibiotics11060777.
35. Sacher-Pirklbauer, A.; Klein-Jöbstl, D.; Sofka, D.; Blanc-Potard, A. B.; Hilbert, F. Phylogenetic groups and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* from different meat species. *Antibiotics* 2021, 10(12), doi:10.3390/antibiotics10121543.
36. Rega, M.; Andriani, L.; Cavallo, S.; Bonilauri, P.; Bonardi, S.; Conter, M.; Carmosino, I.; Bacci, C. Antimicrobial Resistant *E. coli* in Pork and Wild Boar Meat: A Risk to Consumers. *Foods* 2022, 11(22), 3662, doi:10.3390/foods11223662.
37. Ritter, G. D.; Acuff, G. R.; Bergeron, G.; Bourassa, M. W.; Chapman, B. J.; Dickson, J. S.; Opengart, K.; Salois, M. J.; Singer, R. S.; Storrs, C. (2019). Antimicrobial-resistant bacterial infections from foods of animal origin: understanding and effectively communicating to consumers. *Ann N Y Acad Sci* 2019, 1441(1), 40-49, doi:10.1111/nyas.14091.
38. German Federal Institute for Risk Assessment (BfR). BfR study on risk perception: the majority of German consumers believe that animal farming is the cause of antimicrobial resistance - Available online: [https://www.bfr.bund.de/en/press\\_information/2015/03/bfr\\_study\\_on\\_risk\\_perception\\_the\\_majority\\_of\\_german\\_consumers\\_believe\\_that\\_animal\\_farming\\_is\\_the\\_cause\\_of\\_antimicrobial\\_resistance-192759.html](https://www.bfr.bund.de/en/press_information/2015/03/bfr_study_on_risk_perception_the_majority_of_german_consumers_believe_that_animal_farming_is_the_cause_of_antimicrobial_resistance-192759.html) (Accessed: October 2022).
39. European Food Safety Authority (EFSA). EU Insights – Perceptions on the human health impact of antimicrobial resistance (AMR) and antibiotics use in animals across the EU. *Efsa sp* 2017, doi:10.2903/sp.efsa.2017.EN-1183.