

ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI B-LATTAMASI A SPETTRO ESTESO (ESBL) IN CINGHIALI E SUINI IN SVEZZAMENTO ED INGRASSO DECEDUTI CON E SENZA SINTOMATOLOGIA ENTERICA

EXTENDED-SPECTRUM B-LACTAMASES-PRODUCING ESCHERICHIA COLI (ESBL) IN WILD BOARS AND WEANING AND FATTENING DISEASED PIGS WITH AND WITHOUT DIARRHEA

BALDO V.¹, PITOZZI A.¹, BONIOTTI M.B.¹, SALOGNI C.¹, GIOVANNINI S.¹, SCALI F.¹, AGNOLETTI F.², MAZZOLINI E.², PASQUALI P.³, ALBORALI G.L.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale Della Lombardia e Dell'Emilia Romagna;

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale Delle Venezie;

³Istituto Superiore di Sanità.

Parole Chiave: *E. coli*, antibiotico resistenza, ESBL, suini, cinghiali

Key Words: *E. coli*, antimicrobial resistance, ESBL, pigs, wild boars

RIASSUNTO

Questo studio si propone di investigare la prevalenza e le caratteristiche molecolari di ceppi di *Escherichia coli* (*E. coli*) produttori di Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) isolati da suini allevati nelle categorie svezzamento ed ingrasso e deceduti con sintomatologia enterica e non enterica e da cinghiali vissuti in ambiente naturale. Nel 2018 sono stati raccolti 1109 ceppi di *E. coli*, di cui 522 sono stati identificati come *E. coli* con fenotipo che produce ESBL. 215 *E. coli* produttori di ESBL sono stati testati mediante PCR e tutti sono stati confermati. I 215 ceppi di *E. coli* produttori di ESBL sono stati ulteriormente suddivisi in base al gruppo filogenetico ed al pattern di resistenza genica. I ceppi di *E. coli* produttori di ESBL hanno presentato un diverso tipo di β -lattamasi, con *bla*_{CTX-M} nell'89.4% dei suini con sintomatologia enterica e 84.3% nei suini non enterici mentre nei cinghiali la prevalenza è stata dell'87.9%. *bla*_{SHV} è stato trovato nel 6% di suini sia con sintomatologia enterica che non enterica mentre 1.5% nei cinghiali, *bla*_{TEM} 63.6% e 69.9% nei suini enterici e non enterici e *bla*_{CMY} è stato rilevato nel 12.1%, 13.3% e 9.1% rispettivamente suini enterici, non enterici e cinghiali. I dati ottenuti evidenziano che nei cinghiali la prevalenza di *E. coli* ESBL produttori è inferiore a quanto rilevato nei suini. Nonostante ciò la presenza del 14% di *E. coli* ESBL produttori mette comunque in evidenza un significativo ruolo dell'ambiente nella diffusione dell'antibiotico resistenza.

ABSTRACT

The aims of this study was to investigate the prevalence and molecular characteristics of *Escherichia coli* Extended-Spectrum β -Lactamases (ESBL) producers isolated from pigs reared in the weaning and fattening categories, dead with enteric and non-enteric symptoms or isolated from hunted wild boars. During 2018 a total of 1109 *E. coli* isolates were collected. Of those, 522 *E. coli* were identified as ESBL-producing phenotype. 215 ESBL producers were tested by PCR confirming ESBL genotype. These were further grouped according to phylogenetic background and genetic relatedness. *E. coli* ESBL producers harbored different β -lactamases, with *bla*_{CTX-M} in 89.4% pigs with enteric diseased and

84.3% non enteric diseased while 87.9% in wild boars. *bla*_{SHV} was detected in 6% of pigs while 1.5% of wild boars, *bla*_{TEM} in 63.6% and 69.9% of enteric and non enteric diseased pigs and *bla*_{CMY} in 12.1%, 13.3% and 9.1% of enteric, non enteric pigs and wild boars respectively. These data suggest that the prevalence of ESBL *E. coli* in wild boars is less than in pigs. Although a significant percentage of ESBL *E. coli* producers highlights a significant role of the environment in the spread of the antimicrobial resistance.

INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza (AMR) è un problema di rilevanza mondiale con una valenza "One Health" che sta sempre più coinvolgendo oltre all'uomo e agli animali anche l'ambiente (Wasył D. *et al.*, 2018). Numerosi sono i microrganismi che concorrono a rendere complesso il problema della resistenza agli antimicrobici e, fra questi, i ceppi di *Escherichia coli* (*E. coli*) produttori di β -lattamasi a spettro esteso (ESBL). *E. coli* è un microrganismo commensale, ubiquitario e patogeno responsabile di infezioni intestinali ed extraintestinali in animali e uomini. E' riconosciuto che i ceppi commensali e patogeni sono in grado di condividere lo stesso ambiente (Wu *et al.*, 2013). Le cefalosporine sono ritenute un trattamento efficace anche nei confronti di patogeni gram-negativi ed in particolare delle infezioni causate da *E. coli* multi-resistenti (Sanchez S. J. *et al.*, 2013). Negli ultimi anni la resistenza alle β -lattamasi, ed in particolare alle cefalosporine di terza e quarta generazione, è notevolmente aumentata diventando un importante problema di sanità pubblica (Agersø e Aarestrup, 2013). Uno dei più preoccupanti segnali è rappresentato dall'emergenza delle extended-spectrum β -lactamases (ESBL) in grado di inattivare β -lattamici quali cefalosporine di terza, quarta generazione e aztreonam (Liu *et al.*, 2015). Inoltre in microrganismi ESBL produttori è stata osservata l'associata resistenza ad antimicrobici non β -lattamici quali fluorochinoloni, aminoglicosidi, e sulfonamidi spesso usati anche per il trattamento di patogeni nell'allevamento suino (Tian *et al.*, 2009, Tian *et al.*, 2012; Yuan *et al.*, 2009).

L'aumento della prevalenza di *E. coli* produttori di ESBL, oltre a rendere sempre più difficile il controllo delle patologie nel suino, si pone come un serio problema di sanità pubblica. Gli animali allevati per la produzione di alimenti possono rappresentare un reservoir per microrganismi resistenti agli antimicrobici quali *E. coli* ESBL produttori che, attraverso la catena alimentare o il contatto diretto, possono contribuire alla diffusione o al mantenimento dell'AMR nell'ambiente e in ambito umano. Tuttavia è riconosciuto che i microrganismi ESBL produttori sono presenti anche in animali da compagnia, animali degli zoo e animali selvatici. Fra questi ultimi il cinghiale rappresenta uno degli indicatori più importanti per valutare la pressione selettiva che l'ambiente subisce e la sua esposizione a geni di resistenza trasmessi da microrganismi di origine animale ed umana (Dahms C. *et al.*, 2015).

Lo scopo del presente studio è di valutare la prevalenza e le caratteristiche molecolari di *E. coli* produttori di ESBL isolati da cinghiali vissuti in ambiente naturale e da suini di diverse età allevati e deceduti con sintomatologia enterica e non enterica.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Lo studio è stato attuato nel 2018 su un totale di 1109 ceppi di *E. coli* isolati da suini in

svezzamento ed ingrasso deceduti in presenza (314) e in assenza (336) di sintomatologia clinica enterica e da cinghiali abbattuti durante la stagione di caccia (459). I campioni di feci o contenuto intestinale sono stati sottoposti ad indagini batteriologiche e di biologia molecolare al fine di evidenziare la presenza di ceppi di *E. coli* ESBL produttori e di procedere alla caratterizzazione fenotipica e genotipica.

Prelievo, stoccaggio e trasporto al laboratorio dei campioni

I campioni di feci o contenuto intestinale da sottoporre a tale prova, una volta prelevati secondo le modalità previste da standards internazionali [e.g. EN ISO 707:2008 (IDF 50:2008)], sono stati conservati a 2-8°C e trasportati entro 24 ore al laboratorio. I campioni sono stati sottoposti ad isolamento, identificazione ed in parte a determinazione del gruppo filogenetico e dei geni di resistenza.

Isolamento ed identificazione di *E. coli* produttori di ESBL o AmpC

La caratterizzazione fenotipica è stata effettuata secondo un procedimento che prevede una fase di pre-arricchimento, seguita da isolamento selettivo, subcoltura, identificazione e stoccaggio dei ceppi *E. coli* ESBL fenotipo positivo.

La prima fase di pre-arricchimento consiste nel mettere a contatto un'aliquota del materiale con acqua peptonata tamponata (BPW) in rapporto 1:10. Dopo aver incubato il campione a 37±1°C per 18-22 ore viene eseguito un trapianto su una piastra di agar MacConkey addizionato di 1 mg/L di cefotaxime (McCC) per garantire l'isolamento di colonie singole di *E. coli* produttore di ESBL o AmpC.

Sulla base della colorazione e delle caratteristiche morfologiche sono state selezionate le colonie sospette di *E. coli* produttori di ESBL/AmpC (EUCAST, WHO, 2014).

Gruppo filogenetico e geni di resistenza

Una percentuale significativa dei ceppi di *E. coli* risultati ESBL fenotipo positivo è stata sottoposta alla caratterizzazione molecolare. A tal fine, una singola colonia batterica per campione è stata risospesa in 250µl di acqua DNase-Rnase free e il DNA è stato estratto attraverso lisi-bollitura (98°C per 10minuti).

Lo schema analitico seguito per caratterizzare ciascun campione ha previsto come step iniziale l'identificazione del gruppo filogenetico attraverso una PCR multiplex (Clermont O. *et al.*, 2013).

Il rilevamento dei geni di resistenza presenti è stato eseguito tramite un pannello di reazioni PCR. Una PCR multipla è stata utilizzata per l'identificazione dei geni del gruppo CTX-M la cui positività, singola o multipla, identifica i 4 principali gruppi CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9 e CTX-M8/25 (Woodford N. *et al.*, 2006). Singole reazioni PCR sono state utilizzate per l'identificazione del gene SHV (Arlet G. *et al.*, 1997), per il gene TEM (Mabilat C. *et al.*, 1990) e per il gene AmpC di tipo plasmidico CMY-2 (Dierilkx C. *et al.*, 2010).

Analisi Statistica

La significatività statistica relativa alla distribuzione dei diversi gruppi filogenetici e dei geni di resistenza nelle tre categorie di animali (suini con sintomatologia enterica, suini con sintomatologia non enterica e cinghiali) è stata valutata con il test esatto del chi-quadrato.

RISULTATI

Dei 1109 campioni testati per la ricerca del fenotipo ESBL, 522 ceppi di *E. coli* hanno espresso il fenotipo per ESBL.

Nei suini con sintomatologia enterica 208 su 314 nei suini con sintomatologia non enterica 248 su 336 mentre nei cinghiali 66 su 459 hanno espresso fenotipo caratteristico per ESBL. I risultati della caratterizzazione fenotipica sono riportati nella Tabella 1. Sono stati isolati ceppi di *E. coli* produttori di ESBL nel 73.8% dei campioni di contenuto intestinale o feci prelevati in suini con sintomatologia non enterica, nel 66.2% dei campioni provenienti da suini con sintomatologia enterica e 14.4% degli isolati provenienti da cinghiali.

Dei 522 campioni risultati positivi per il fenotipo ESBL, 215 sono stati processati in PCR per la conferma delle caratteristiche filogenetiche e dei geni di resistenza. La presenza di geni di resistenza è stata evidenziata in tutti i 215 ceppi isolati e risultati positivi alle indagini di screening fenotipico batteriologico.

Tab. 1 – Caratterizzazione fenotipica di ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati da suini con sintomatologia enterica e non e da cinghiali. I numeri con diverso numero di asterischi sono statisticamente differenti.

Tab. 1 – Phenotype of *E. coli* ESBL isolated from pigs with and without enteric disease and wild boars. The numbers with different number of asterisks are statically different.

SPECIE E CATEGORIA ANIMALE	<i>E.coli</i> TESTATI PER FENOTIPO ESBL	N° CEPPI (%) CON FENOTIPO POSITIVO
SUINI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA	314	208 (66,2)*
SUINI CON SINTOMATOLOGIA NON ENTERICA	336	248 (73,8)**
CINGHIALI	459	66 (14,4)***
TOTALE	1109	522

Dei 208 ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati in suini deceduti con sintomatologia enterica 140 provenivano da animali in svezzamento e 68 da suini all'ingrasso. Dei 248 ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati in suini deceduti con sintomatologia non enterica 199 provenivano da animali in svezzamento e 49 da suini all'ingrasso (Tabella2).

Tab. 2 – Caratterizzazione fenotipica di ceppi *E. coli* ESBL produttori isolati in suini allevati in svezzamento ed ingrasso con sintomatologia enterica e non. I numeri con diverso numero di asterischi sono statisticamente differenti.

Tab. 2 – Phenotype of *E. coli* ESBL isolated from diseased pigs of different age with and without enteric disease The numbers with different number of asterisks are statically different.

SPECIE E CATEGORIA ANIMALE		<i>E. coli</i> TESTATI PER FENOTIPO ESBL	N° CEPPI (%) CON FENOTIPO POSITIVO
SUINI CON SINTOMATOLOGIA ENTERICA (N°=314)	SVEZZAMENTO	210	140 (66.7)*
	INGRASSO	104	68 (65.4)*
SUINI CON SINTOMATOLOGIA NON ENTERICA (N°=336)	SVEZZAMENTO	258	199 (77.1)**
	INGRASSO	78	49 (62.8)*

I gruppi filogenetici testati (A, B1, B2, C, D, E, F) sono stati tutti evidenziati sia nei suini che nei cinghiali.

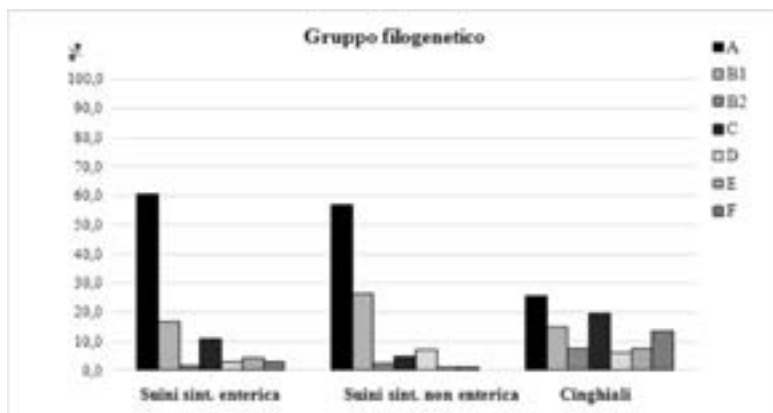
Nella Figura 1 vengono riportati i risultati dell’analisi del gruppo filogenetico che ha evidenziato che il gruppo filogenetico predominante è A sia nei suini con sintomatologia non enterica (56.6%), sia nei suini con sintomatologia non enterica (60.6%) che nei cinghiali (25.8%).

Nei suini con sintomatologia enterica esso è seguito da B1 (16.7%), C (10.6%), E (4.5%), D (3.0%), F (3.0%) e B2 (1.5%) mentre nei suini con sintomatologia non enterica da B1(26.5%), D (7.2%), C (4.8%), B2 (2.4%), E (1.2%) e F (1.2%).

Nei cinghiali il gruppo filogenetico C (19.7%) precede in ordine B1 (15.2%), F (13.6%), B2 (7.6%), E (7.6%) e D (6.1%).

Fig. 1 – Gruppi filogenetici di *E. coli* ESBL isolati da suini con e senza sintomatologia enterica e da cinghiali.

Fig. 1 – Phylogenetic groups of *E. coli* ESBL isolated from pigs with and without enteric disease and wild boars.



Dall'analisi molecolare sono stati rilevati i geni di resistenza CTX-M, SHV, CMY e TEM la cui frequenza è riportata in Figura 2.

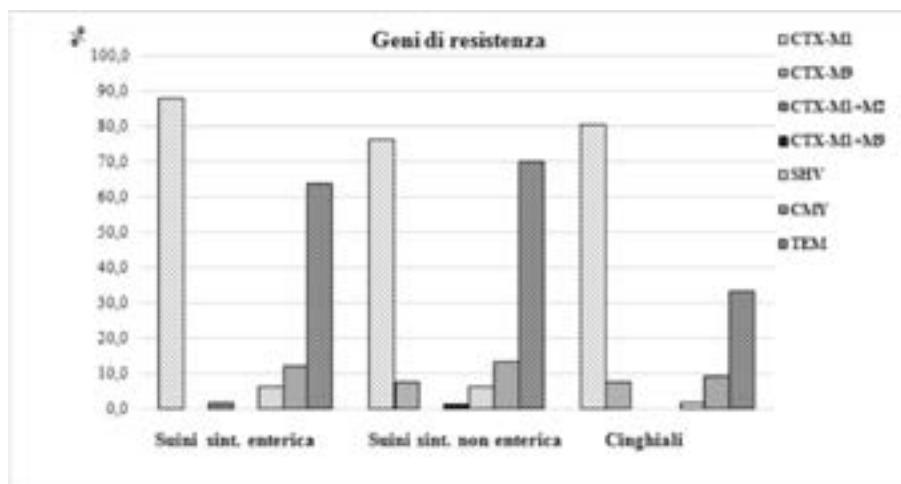
Nei suini con sintomatologia enterica sono stati evidenziati CTX-M1 (87.9%), TEM (63.6%), CMY (12.1%) e SHV (6.1%). Inoltre in un solo campione è stata evidenziata la presenza della combinazione CTX-M1+M2.

Nei suini con sintomatologia non enterica i geni prevalenti sono CTX-M1 (75.9%) e TEM (69.9%); a seguire CMY (13.3%), CTX-M9 (7.2%) e SHV (6.0%). Solo in un campione è stata evidenziata la presenza della combinazione CTX-M1+M9.

Nei cinghiali sono stati osservati i geni CTX-M1 (80.3%) e TEM (33.3%) seguiti dai geni CMY (9.1%), CTX-M9 (7.6%) e da un solo caso di presenza del gene SHV (1.5%).

Fig. 2 – Caratterizzazione genotipica e geni di resistenza in *E. coli* ESBL isolati da suini con e senza sintomatologia enterica e da cinghiali.

Fig. 2 – Molecular characterization and genes *E. coli* ESBL isolated from pigs with and without enteric disease and wild boars.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

La prevalenza di *E. coli* ESBL produttori isolati in animali produttori di alimenti è in continuo aumento in tutto il mondo (Liebana *et al.*, 2013). Il presente lavoro rappresenta un contributo per lo studio della prevalenza e la caratterizzazione di *E. coli* produttori di ESBL isolati in suini e cinghiali.

Il 47% degli isolati sottoposti a caratterizzazione fenotipica sono risultati essere ESBL produttori. La prevalenza di *E. coli* ESBL produttori si è dimostrata significativamente più elevata nei suini rispetto ai cinghiali. Fra i suini allevati in svezzamento ed ingrasso la prevalenza è risultata maggiore negli animali deceduti con sintomatologia non enterica rispetto a quelli deceduti con sintomatologia enterica. Negli svezzati con sintomatologia enterica la prevalenza è pressoché identica a quella riscontrata negli ingrassi. Nei suini con sintomatologia non enterica la prevalenza è leggermente superiore negli svezzati rispetto agli ingrassi.

L'analisi dei gruppi filogenetici condotta sui 215 ceppi di *E. coli* ESBL produttori ha dimostrato che i gruppi filogenetici presente nei suini sono gli stessi indipendentemente dalla categoria produttiva e dalla sintomatologia clinica. Nel complesso il gruppo A è risultato prevalere sugli altri gruppi in entrambe le specie.

Pur essendo stati ottenuti gli stessi gruppi filogenetici, nei cinghiali è stato possibile notare differenze rispetto ai suini nella distribuzione dei ceppi. Nella fattispecie si evidenzia nei cinghiali una maggior prevalenza dei gruppi C ed F ed una minore prevalenza del gruppo A.

L'analisi molecolare dei geni di resistenza ha evidenziato la maggior prevalenza complessiva di CTX-M1 e di TEM in entrambe le specie.

Quanto ottenuto è in linea con la letteratura europea in merito alla prevalenza dei gruppi filogenetici e dei geni di resistenza nelle diverse specie (Poeta P. *et al.*, 2009; Wasyl D. *et al.*, 2018).

L'elevata prevalenza di *E. coli* ESBL produttori in suini deceduti per patologie enteriche e non enteriche rende sempre più importante ed attuale l'utilizzo di protocolli terapeutici razionali in allevamento. La presenza di geni di resistenza comuni in ceppi di *E. coli* produttori di ESBL isolati in suini allevati ed in cinghiali mette in evidenza un reale rischio di AMR anche in animali non sottoposti a trattamenti farmacologici quali i cinghiali. Ciò enfatizza l'importanza di un costante monitoraggio al fine di conoscere la dinamica di diffusione dei geni di AMR tra animali, uomo ed ambiente ivi comprese le specie selvatiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Wu. G., Day. M. J., Mafura. M. T., Nunez-Garcia. J., Fenner. J. J., Sharma. M. *et al.* (2013). "Comparative analysis of ESBL-positive *Escherichia coli* isolates from animals and humans from the UK". The Netherlands and Germany. *PLoS ONE* 8:e75392. doi: 10.1371/journal.pone.0075392
2. Silva Sanchez. J., Cruz-Trujillo. E., Barrios. H., Reyna-Flores. F., Sanchez Perez. A. Bacterial Resistance C. *et al.* (2013). "Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* pediatric clinical isolates in Mexico". *PLoS ONE* 8:e77968. doi: 10.1371/journal.pone.0077968
3. Agersø. Y. and Aarestrup. F. M. (2013). "Voluntary ban on cephalosporin use in Danish pig production has effectively reduced extended-spectrum cephalosporinase-producing *Escherichia coli* in slaughter pigs". *J. Antimicrob. Chemother.* 68. 569-572. doi: 10.1093/jac/dks427
4. Tian. G. B., Wang. H. N., Zhang. A. Y., Zhang. Y., Fan. W. Q., Xu. C. W., *et al.* (2012). "Detection of clinically important beta-lactamases in commensal *Escherichia coli* of human and swine origin in western China". *J. Med. Microbiol.* 61. 233-238. doi: 10.1099/jmm.0.036806-0
5. Tian. G. B., Wang. H. N., Zou. L. K., Tang. J. N., Zhao. Y. W., Ye. M. Y. *et al.* (2009). "Detection of CTX-M-15, CTX-M-22, and SHV-2 extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in *Escherichia coli* fecal-sample isolates from pig farms in China". *Foodborne Pathog. Dis.* 6. 297-304. doi: 10.1089/fpd.2008.0164
6. Liu. X., Boothe. D. M., Thungrat. K. and Aly. S. (2012). "Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals". *Vet. Microbiol.* 161. 159-168. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.019
7. Yuan. L., Liu. J. H., Hu. G. Z., Pan. Y. S., Liu. Z. M., Mo. J. *et al.* (2009). Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates

- from chickens in Henan Province. China. *J. Med. Microbiol.* 58. 1449–1453. doi: 10.1099/jmm.0.012 229-0
8. Liebana. E., Carattoli. A., Coque. T. M., Hasman. H., Magiorakos. A. P., Mevius. D. *et al.* (2013). “Public health risks of *Enterobacterial* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases or ampC beta-lactamases in food and food-producing animals: An EU perspective of epidemiology. analytical methods. risk factors. and control options”. *Clin. Infect. Dis.* 56. 1030-1037. doi: 10.1093/cid/cis1043
 9. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consulation/EUCAST guidelines detection of resistance mechanism 121222.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consulation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistence_mechanism_121222.pdf)
 10. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST. Version 3.0. http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/
 11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-Fourth Informational Supplement M 100-S24. Wayne. PA. USA: CLSI; 2014
 12. Scientific opinion on the public health risk of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. EFSA Journal 2011; 9(8):2322. http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2322.pdf
 13. WHO. *Antimicrobial resistance: Global report on surveillance*. Geneva: World Health Organization; 2014.
 14. Diwan V. Tamhankar AJ. Khandal RK *et al.* “Antibiotics and antibiotic-resistant bacteria in waters associated with a hospital in Ujjain. India”. *BM. Public Health* 2010; 10: 414
 15. Clermont, O., Christenson, Julia K., Denamur, E. and Gordon, D.M. (2013) “The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-goups”. *Envir Micr Report* 5 (1) 2013, 58-65
 16. Woodford, N., Fagan, E.J. and Ellington, M.J. (2006) “Multiplex PCR for rapid detection og genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamase”. *Antimic Chemot* 2006 Jan; 57 (1):15 4-5
 17. Arlet, G., Rouveau, M. and Philippon, A. “Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β -lactamase”. *Microbiol Lett.* 1997, 1, 152(19):16 3-7
 18. Mabilat, C., *et al* (1990) “Direct sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extended-broad-spectrum β -lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumonia*”. *Plasmid* 1990; 23:27-34
 19. Dierikx, C., *et al* (2010) “Increased detection of extended-spectrum β -lactamase producing *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* isolates from poultry”. *Vet Microbiol* 2010; 145:273-278
 20. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, *et al.* “Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study”. *The Lancet Infect Dis* 2016; 16:161-168
 21. Carmen Dahms, Nils-Olaf Hübner, Annelene Kossow, Alexander Mellmann, Kathleen Dittmann, Axel Kramer. “Occurrence of ESBL-Producing *Escherichia coli* in Livestock and Farm Workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany”. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0143326 November 25, 2015
 22. Dariusz Wasyl, Magdalena Zajęc, Anna Lalak, Magdalena Skarzyńska, Ilona Samcik, Renata Kwit, Artur Jabłoński, Łukasz Bocian, Grzegorz Woźniakowski, Andrzej Hoszowski,

- and Krzysztof Szulowski. “Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Wild Animals in Poland”. *Microbial Drug resistance*, Vol. 24, N°6, 2018. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0148>
23. Patrícia Poeta, Hajer Radhouani, Luís Pinto, António Martinho, Vítor Rego, Rogério Rodrigues, Alexandre Gonçalves, Jorge Rodrigues, Vanesa Estepa, Carmen Torres and Gilberto Igrejas. “Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups”. *Journal of Basic Microbiology* 2009, 49, 584–588
 24. Wietske Dohmen, Alejandro Dorado-García, Marc J. M. Bonten, Jaap A. Wagenaar, Dik Mevius, Dick J. J. Heederik. “Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials”. *PLOS ONE* | <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174094> March 21, 2017 14
 25. Alexandre Goncalves, Carmen Torres, Nuno Silva, Catarina Carneiro, Hajer Radhouani, Celine Coelho, Carlos Araujo, Jorge Rodrigues, Laura Vinue, Sergio Somalo, Patricia Poeta and Gilberto Igrejas. “Genetic Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* Isolates of Pigs from a Portuguese Intensive Swine Farm”. *Foodborne Pathogens And Disease* Volume 7, Number 12, 2010
 26. N. Geser, R. Stephan, P. Kuhnert, R. Zbinden, U. Kaeppli, N. Cernela And H. Haechler. “Fecal Carriage of Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Swine and Cattle at Slaughter in Switzerland”. *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 3, 2011, Pages 446-449