

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI IN *E. COLI* ISOLATI IN ALLEVAMENTI DI SUINI A CICLO CHIUSO: INTERFACCIA ANIMALI-UOMO-AMBIENTE

ANTIMICROBIALS RESISTANCE IN E. COLI FROM FARROW-TO-FINISH PIG FARMS: THE ANIMALS-HUMAN -ENVIRONMENT INTERFACE

CIBIN V.¹, DRIGO M.², TIENGO A.¹, ANTONELLO K.¹, MANCIN M.¹,
LOSASSO C.¹, RICCI A.¹

¹Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie;

²Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) – Università degli Studi di Padova;

Parole chiave: antimicrobico resistenza, allevamenti suini, *E. coli*

Key words: antimicrobial resistance, pig farms, *E. coli*

RIASSUNTO

L'utilizzo degli antimicrobici, anche negli animali allevati a scopo zootecnico, è la principale causa dell'insorgenza dell'antibiotico resistenza, i cui rischi per l'uomo, gli animali e l'ambiente sono ampiamente riconosciuti a livello mondiale.

Il monitoraggio della resistenza agli antimicrobici (AR) attraverso la determinazione del profilo di resistenza in batteri indicatori, quali *E. coli*, rappresenta un utile strumento per valutare lo *status* del fenomeno.

Al fine di approfondire le conoscenze sulle modalità di diffusione della AR in nicchie ecologiche correlate all'allevamento del suino, sono stati sottoposti a monitoraggio intensivo due allevamenti a ciclo chiuso.

I risultati ottenuti permettono di osservare che la frequenza di *E. coli* resistenti alle molecole testate si differenzia tra le diverse fasi produttive con la fase di svezzamento maggiormente critica; in particolare in questa fase risulta elevata la percentuale di *E. coli* resistenti alla colistina, antimicrobico identificato come *CIA* e per il quale sono state recentemente pubblicate delle raccomandazioni sull'utilizzo negli animali.

Nel complesso, gli antibiotici per i quali i batteri isolati negli animali mostrano più frequentemente resistenza sono: ampicillina, cloramfenicolo, sulfametossazolo, tetraciclina e trimethoprim, che corrispondono alle molecole cui sono più frequentemente resistenti i batteri isolati in liquame, acqua del canale adiacente il terreno fertirrigato e nei campioni fecali delle persone che lavorano negli allevamenti.

ABSTRACT

The use of antimicrobials, also in food producing animals, is the principal cause of antimicrobial resistance, which risks for human beings, animals and environment are widely recognized at global level.

Monitoring of antimicrobial resistance (AR) based on the determination of antimicrobial resistance profile of commensal bacteria, such as *E. coli*, is a useful tool to evaluate the phenomenon *status*.

With the aim to deep our knowledge on how AR disseminate to ecological niches pig farms related, two farrow-to-finish pig farms have been submitted to intensive monitoring.

Results show that the occurrence of *E. coli* resistant to tested antimicrobials is different

among the different production phases with weaning as the most critical; in particular in this phase there is a significant percentage of isolates that displays resistance to colistin, which is considered a *CIA* antimicrobial and which use in animals should follow specific rules.

Generally most of the *E. coli* isolated from animals showed resistance towards the following antimicrobials: ampicillin, chloramphenicol, sulphamethoxazole, tetracycline and trimethoprim and an analogous result was obtained as regards isolates from liquid manure, water from the fertilized soil and from faecal samples of the persons working in the farms.

INTRODUZIONE

Nei suini allevati a scopi zootecnici gli antimicrobici vengono utilizzati sia per trattare che per prevenire infezioni batteriche, contribuendo così a migliorare lo stato sanitario degli animali. L'utilizzo degli antimicrobici contribuisce però innegabilmente all'acquisizione di resistenza agli stessi da parte di batteri patogeni e commensali (Rosengren et al., 2007). Il fenomeno della antimicrobico resistenza (AR) ed i conseguenti potenziali rischi per l'uomo, gli animali e l'ambiente rappresentano un problema ampiamente riconosciuto a livello mondiale.

La relazione tra'utilizzo degli antimicrobici e sviluppo di resistenze nelle popolazioni batteriche esposte è stata largamente dimostrata e la necessità di mettere in atto strategie per un utilizzo più responsabile e prudente di questi farmaci, anche negli animali allevati a scopi zootecnici, è condivisa a livello globale (WHO, 2011; WHO, 2015).

L'uso prudente in medicina veterinaria è particolarmente orientato a quelle molecole definite *CIA* ovvero *critically important antimicrobials* il cui utilizzo è ancora efficace per contrastare alcune importanti infezioni batteriche nell'uomo, dovute in particolare a batteri multi resistenti (Commission Notice, 2015/C299/04).

Mentre la selezione di batteri resistenti agli antimicrobici è sicuramente dipendente dall'esposizione agli stessi, le modalità con cui le resistenze sono mantenute nelle comunità microbiche e/o diffuse anche in nicchie ecologiche diverse da quelle primariamente esposte (ad esempio dagli animali all'uomo), sono molteplici e rendono particolarmente complessa la definizione di questo fenomeno nella sua interezza (Heinemann et al., 2000; Allen et al., 2010; Sengupta et al., 2013).

Il monitoraggio della resistenza agli antimicrobici nelle popolazioni animali attraverso la determinazione del profilo di resistenza in batteri indicatori, quali *E. coli*, rappresenta un utile strumento per valutare lo *status* del fenomeno, il suo evolversi nel tempo e la potenzialità di diffusione delle resistenze nell'ambiente e nell'uomo (EFSA, 2008).

Al momento sono ancora scarsi gli studi a livello nazionale che descrivono la frequenza e diffusione della resistenza agli antimicrobici in *E. coli* isolati nei suini destinati alla produzione di alimenti.

Scopo di questo studio è approfondire la resistenza antimicrobica in allevamenti di suini a ciclo chiuso ed esplorarne le modalità di diffusione in nicchie ecologiche correlate all'allevamento stesso e che possono svolgere un ruolo importante nella diffusione di AR all'uomo, sia attraverso gli alimenti ma anche per esposizione diretta.

MATERIALI E METODI

Sono stati selezionati due allevamenti di suini a ciclo chiuso (successivamente identificati come azienda A e azienda B) localizzati nel territorio di competenza dell'IZS_{Ve} sulla base dei seguenti criteri: isolamento dell'allevamento e del suo ambiente circostante da altre realtà produttive zootecniche, presenza di aree contigue all'allevamento fertirrigate di routine con liquame proveniente unicamente dal sito produttivo, motivazione degli

allevatori a partecipare allo studio, eventuale presenza di canali di irrigazione accessibili. Ciascun allevamento è stato sottoposto a campionamento in due diversi istanti temporali, fine autunno e fine primavera.

Il campionamento è stato disegnato con l'obiettivo di collezionare sia materiale fecale dei suini nelle diverse fasi produttive che matrici ambientali, quali liquame, terreno fertirrigato e acqua dai canali di irrigazione adiacenti il terreno. Sono stati inoltre esaminati campioni fecali degli operatori coinvolti nella gestione dell'allevamento (collezionati in una unica occasione).

Per quanto riguarda i suini, le fasi produttive sottoposte a campionamento sono le seguenti: svezzamento, magronaggio, ingrasso, sala parto, gestazione e verri. Ciascuna sessione di campionamento ha previsto il campionamento di feci, liquame, terreno ed acqua, come di seguito descritto:

Feci: Al fine di garantire il campionamento rappresentativo di materiale fecale per ciascuna fase produttiva si è definito di procedere alla raccolta di 1 pool di feci, assemblando almeno tre box dalla stanza di campionamento, per un totale di 3 campioni (pool di feci) per fase produttiva, avendo cura, per ciascuna fase, di includere animali di diversa età.

Liquame: sono stati prelevati 3 campioni attraverso l'immersione di un contenitore in tre punti diversi nella vasca a cielo aperto.

Acqua: si è proceduto a prelevare due campioni per sessione di campionamento, uno nella parte vicina alla sponda, uno nel mezzo del canale.

Terreno: sono stati effettuati campioni di terreno in funzione di eventuali differenze di destinazione d'uso e dell'intervento di fertirrigazione.

In laboratorio i campioni di materiale fecale, acqua e terreno sono stati analizzati singolarmente, mentre i tre campioni di liquame sono stati riuniti in un unico pool per l'analisi. I campioni sono stati analizzati entro 48 ore dal conferimento, come di seguito descritto, ai fini dell'isolamento di *E. coli*.

Feci e Liquame: 90 ml di brodo di arricchimento TSB (Tryptone Soya Broth) sono stati addizionati a 10 grammi di campione iniziale. Le piastre di McC (MacConkey agar) successivamente seminate sono state incubate a 37 ± 1 °C per 24 ore.

Terreno: si è proceduto con una pre-incubazione del TSB di 4 ore a $37 \pm$ °C prima della semina in piastra.

Acqua: 9 ml di TSB sono stati addizionati ad 1 ml di acqua; dopo una pre-incubazione di 4 ore a 37 ± 1 °C si è proceduto a semina in McC.

Da ciascuna piastra di McC dopo 24 ore di incubazione si è proceduto a selezionare fino a 5 colonie singole sospette *E. coli* che sono state sottoposte a prove biochimiche-enzimatiche mediante gallerie di identificazione Api 20E (bioMérieux).

Ogni isolato confermato *E. coli* è stato sottoposto alla determinazione della Minima Concentrazione Inibente (MIC) utilizzando la tecnica di micro diluizione in brodo attraverso l'impiego di piastre commerciali Sensititre. Il valore di MIC è definito come la più bassa concentrazione di antibiotico che inibisce la crescita dei batteri. La differenza tra ceppi resistenti e sensibili, si è ottenuta comparando il valore di MIC ottenuto con il valore di cut-off epidemiologico (ECOFF) definito dall'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST).

Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: Ampicillina (Amp), Cefotaxime (Cef), Ceftazidime (Cez), Cloramfenicolo (Chl), Ciprofloxacina (Cip), Colistina (Col), Gentamicina (Gen), Meropenem (Mero), Acido Nalidixico (Nal), Sulfametossazolo (Smx), Tetraciclina (Tet), Tigeciclin (Tgc), Trimethoprim (Tmp).

Analisi dei dati

I dati relativi alla determinazione della MIC sono stati sottoposti ad analisi statistica descrittiva al fine di evidenziare la frequenza di *E. coli* resistenti alle molecole testate per

ciascuna azienda, e per le diverse fasi produttive/matrici entro la stessa azienda. Al fine di verificare se esistano differenze significative tra le due aziende in termini di percentuale di isolati resistenti a ciascuna molecola è stato utilizzato il test Z. Valori di *p* inferiori a 0.10 sono considerati significativi. Inoltre i dati sono stati organizzati anche al fine di valutare la distribuzione di frequenza di isolati multi-resistenti, focalizzando l'attenzione sugli isolati con resistenze maggiori o uguali a 4 molecole. Per l'analisi statistica è stato utilizzato il software STATA12.

RISULTATI

Sono stati isolati e sottoposti a determinazione della MIC in totale 423 *E. coli*, di cui, per quanto riguarda l'azienda A: 180 da animali (30 per ogni categoria produttiva), 10 da liquame e 15 da uomo e per quanto riguarda l'azienda B: 185 da animale (sempre 30 per fase produttiva ad eccezione dei verri in cui sono stati isolati 35 ceppi da 7 campioni), 10 da liquame, 20 da uomo e 3 da acqua. In nessuno dei campioni di terreno sono stati isolati *E. coli*.

In tabella 1 viene riportata la percentuale di isolati risultati resistenti a ciascuna molecola testata per fase produttiva/matrice per ciascuna azienda.

Per quanto riguarda l'acqua due delle tre colonie isolate sono risultate sensibili a tutti gli antibiotici testati mentre la terza è risultata resistente a: ampicillina, cloramfenicolo, tetraciclina, trimetoprim e sulfametossazolo.

In tabella 2 viene riportata la significatività del test statistico Z che permette di evidenziare le differenze tra le due aziende in termini di percentuale di isolati resistenti per ciascuna molecola e matrice.

Per quanto riguarda la valutazione della multi-resistenza, si è focalizzata l'attenzione sugli isolati da animali che sono risultati resistenti ad un numero di molecole uguale o maggiore di 4. Dei 365 *E. coli* da animale isolati complessivamente, 55 (15%) sono risultati sensibili a tutte le molecole testate, 310 (84.9%) sono risultati resistenti ad almeno una molecola, il 64% è risultato resistente ad un numero di molecole maggiore o uguale a 4.

Nel grafico 1 viene presentata la distribuzione di *E. coli* isolati nelle diverse categorie produttive risultati multiresistenti (maggiore o uguale a 4) focalizzando l'attenzione sui profili di multi-resistenza (ovvero combinazioni di molecole) maggiormente osservati.

Per quanto riguarda gli isolati da uomo, 14 sono risultati multiresistenti di cui 6 con profili equivalenti a quelli maggiormente osservati negli animali: 3 isolati sono risultati AmpSmxTetTmp e 3 AmpChlSmxTetTmp.

Tabella 1

ANTIMICROBICO (ECOFF)	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B	AZ A	AZ B
	SVEZZAMENTO	MAGRONAGGIO	INGRASSO	SALA PARTO	GESTAZIONE	VERRI	LIQUAME	UOMO								
Ampicillin (>8)	96.7	96.7	100.0	86.7	43.3	53.3	13.3	83.3	33.3	70.0	76.7	94.3	70.0	71.4	33.3	60.0
Cefotaxime (>0.25)	6.7	0.0	0.0	0.0	3.3	0.0	13.3	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ceftazidime (>0.5)	10.0	3.3	0.0	0.0	3.3	0.0	13.3	0.0	10.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Chloramphenicol (>16)	50.0	60.0	36.7	50.0	20.0	26.7	0.0	33.3	6.7	20.0	33.3	17.1	50.0	14.3	33.3	30.0
Ciprofloxacina (>0.064)	0.0	6.7	6.7	6.7	0.0	10.0	3.3	43.3	3.3	16.7	13.3	2.9	0.0	14.3	0.0	0.0
Colistin (>2)	73.3	56.7	16.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.3	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Gentamicin (>2)	40.0	23.3	16.7	3.3	0.0	0.0	13.3	3.3	3.3	13.3	10.0	0.0	40.0	0.0	0.0	0.0
Meropenem (>0.125)	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Nalidixic Acid (>16)	0.0	3.3	3.3	6.7	0.0	6.7	0.0	33.3	0.0	16.7	6.7	2.9	0.0	0.0	0.0	0.0
Sulphamethoxazole (>64)	93.3	96.7	100.0	93.3	46.7	53.3	40.0	70.0	46.7	53.3	90.0	74.3	80.0	28.6	80.0	80.0
Tetracycline (>8)	96.7	96.7	100.0	100.0	33.3	80.0	46.7	100.0	36.7	100.0	60.0	88.6	70.0	71.4	40.0	65.0
Trimethoprim (>1)	6.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Trimethoprim (>2)	96.7	96.7	100.0	83.3	43.3	43.3	26.7	63.3	30.0	43.3	76.7	68.6	80.0	28.6	40.0	45.0
NUMERO isolati	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	35,0	10,0	10,0	10,0	20,0

Frequenza (espressa in %) di *E. coli* isolati da campioni prelevati presso le due aziende oggetto di studio classificati come resistenti a ciascuna molecola testata. I criteri di interpretazione per i valori di MIC (ECOFF) sono indicati in tabella (mg/L).

Tabella 2

ANTIMICROBICO (ECOFF)	SVEZZAMENTO	MAGRONAGGIO	INGRASSO	SALA PARTO	GESTAZIONE	VERRI	LIQUAME	UOMO	TOT. ANIMALE
	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B	A vs B
Ampicillin (>8)	NS	> *	NS	< ***	< **	< **	NS	< +	< ***
Cefotaxime (>0.25)	NS	NS	NS	> *	> *	NS	NS	NS	> ***
Ceftazidime (>0.5)	> +	NS	NS	> *	> *	NS	NS	NS	> **
Chloramphenicol (>16)	NS	NS	NS	< ***	< +	> +	> *	NS	< +
Ciprofloxacin (>0.064)	< +	NS	< *	< ***	< *	> +	> +	NS	< ***
Colistin (>2)	> +	> **	NS	NS	NS	> +	NS	NS	> *
Gentamicin (>2)	> +	> *	NS	> +	< +	> *	> *	NS	> *
Meropenem (>0.125)	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Nalidixic Acid (>16)	NS	NS	< +	< ***	< **	NS	NS	NS	< ***
Sulphamethoxazole (>64)	NS	> +	NS	< **	NS	> +	> **	NS	NS
Tetracycline (>8)	NS	NS	< ***	< ***	< ***	< **	NS	< +	< ***
Tigecycline (>1)	> +	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	> +
Trimethoprim (>2)	NS	> **	NS	< **	NS	NS	> **	NS	NS

Significatività (p -value) del test statistico Z condotto sulle percentuali di *E. coli* resistenti alle molecole testate nelle due aziende poste a confronto: NS= non significativo; +, *, **, *** indicano rispettivamente un p -value <0.10, <0.05, <0.001, <0.0001; >/< indicano se nell'azienda A la percentuale di isolati resistenti è risultata significativamente >/< rispetto all'azienda B.

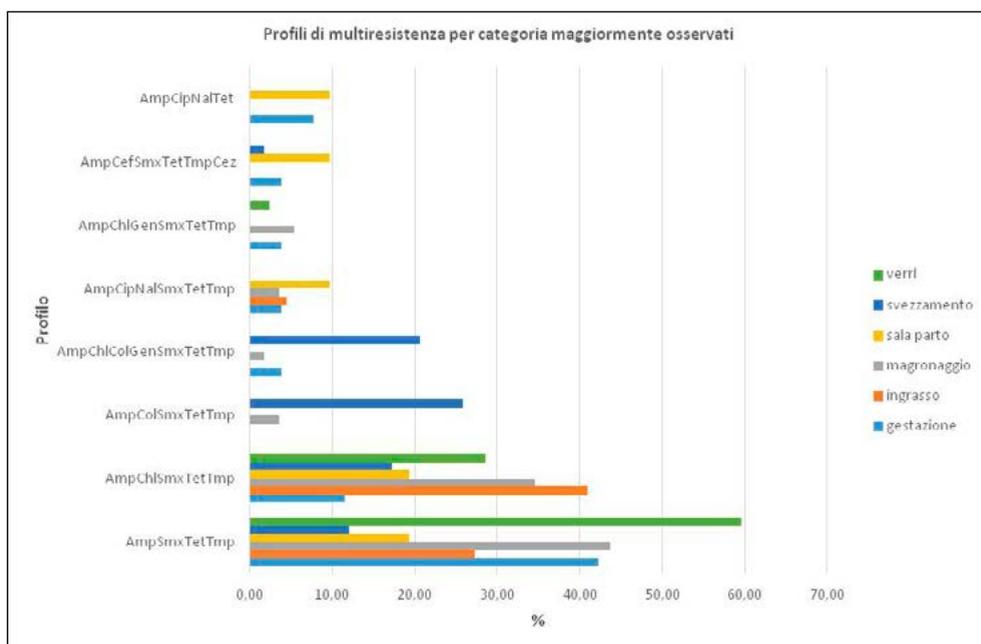


Grafico 1

Profili di multi resistenza maggiormente osservati in *E. coli* isolati nelle due aziende per le diverse fasi produttive.

DISCUSSIONE

In merito alla frequenza di *E. coli* risultati resistenti alle molecole testate nelle due aziende, osservando la tabella 1 è possibile affermare che indipendentemente dall'origine dei campioni e dalla matrice analizzata le molecole cui una elevata percentuale dei ceppi è risultata resistente sono: ampicillina, cloramfenicolo, sulfametossazolo, tetraciclina e

trimethoprim. Per quanto riguarda i suini questo è coerente con quanto evidenziato da Osterberg e collaboratori (2016) che hanno ottenuto analogo risultato sottoponendo ad analisi *E. coli* isolati da campioni di feci di suini, prossimi alla macellazione, collezionati presso allevamenti italiani.

Per quanto riguarda il risultato relativo ai campioni umani, confrontando i dati con quelli ottenuti nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzata (N. 2010-RF-2317095) in cui sono stati sottoposti a determinazione della MIC 338 *E. coli* isolati da 101 persone che non frequentano allevamenti suini (dati non ancora pubblicati) è possibile evidenziare che gli *E. coli* oggetto del presente lavoro, diversamente dai quelli della sub-popolazione non esposta agli allevamenti, non presentano resistenza a molecole quali cefotaxime, ceftazidime, ciprofloxacina, gentamicina e acido nalidixico ma presentano con una frequenza molto più elevata resistenza alle molecole succinate (grafico 2). Non è quindi da escludere che l'esposizione all'ambiente di allevamento possa influenzare in modo importante il profilo di resistenza batterica negli addetti ai lavori.

Osservando la tabella 1, si evidenziano delle differenze tra le diverse fasi produttive: in particolare, gli isolati da suini in fase svezzamento, magronaggio e da verri risultano con maggiore frequenza resistenti alle molecole testate rispetto alle altre fasi produttive. Osservando l'andamento delle resistenze dallo svezzamento all'ingrasso è possibile evidenziare come in quest'ultima fase la percentuale di isolati resistenti sia generalmente inferiore rispetto alle precedenti.

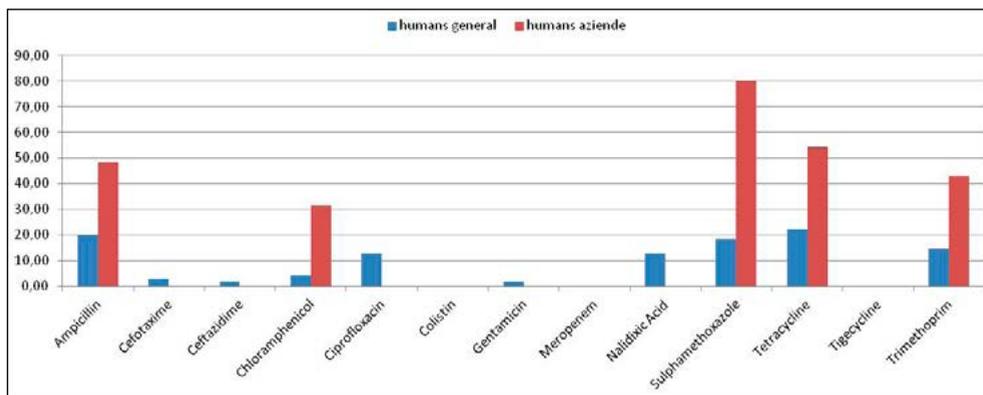
Pur con delle diversità tra le due aziende, vi sono delle resistenze esclusive di alcune fasi e particolarmente evidente è la resistenza alla colistina, antibiotico identificato come *CIA* e per il quale sono state recentemente pubblicate delle raccomandazioni nell'utilizzo negli animali (EMA 2016), nella fase di svezzamento.

Infine, pur essendo i risultati che esitano dalle due aziende generalmente sovrapponibili, alcune differenze sono evidenti in particolare nelle fasi gestazione e sala parto (tabella 2).

Le differenze riscontrate potrebbero essere imputabili ad un diverso utilizzo degli antibiotici nelle diverse fasi e nelle due aziende. I dati riguardanti le modalità di gestione degli allevamenti permettono di confermare questa ipotesi, ovvero per entrambe le aziende gli animali in fase svezzamento sono quelli maggiormente sottoposti a trattamenti antibiotici e l'utilizzo della colistina è emerso essere riservato alla fase svezzamento; al contrario dagli stessi dati non è possibile chiarire il profilo osservato per la gestazione, la sala parto ed i verri in cui gli animali risultano essere sottoposti solo occasionalmente a trattamenti.

Per quanto riguarda i profili di multi resistenza due (AmpSmxTetTmp e AmpChlSmxTetTmp) risultano comuni a tutte le fasi produttive e sono stati riscontrati anche con elevata frequenza negli isolati da liquame, uomo e acqua; questo dato permette ulteriormente di porre l'attenzione sulle modalità di diffusione delle resistenze attraverso la circolazione di batteri commensali che possono essere trasferiti dagli animali all'ambiente attraverso il liquame e all'uomo per contatto diretto ma anche attraverso l'ambiente.

Grafico 2



Resistenza agli antibiotici di *E.coli* isolati da persone che lavorano presso le aziende oggetto di studio (*humans aziende*) e popolazione estranea all'allevamento dei suini (*humans general*, dati dalla ricerca N. 2010-RF-2317095)

CONCLUSIONI

Lo studio ha permesso di collezionare numerosi dati sul profilo di resistenza di *E. coli* commensali isolati nell'ambito di diverse nicchie ecologiche correlate all'allevamento del suino a ciclo chiuso.

Pur con delle differenze tra le due aziende sottoposte ad indagine è stato possibile evidenziare che vi sono differenze tra le varie fasi produttive in termini di frequenza di *E. coli* resistenti alle molecole testate. Ciò potrebbe dipendere da un diverso utilizzo degli antibiotici nelle diverse fasi produttive che meriterebbe un ulteriore approfondimento. Inoltre è stato possibile evidenziare come le resistenze maggiormente osservate negli animali fossero le stesse osservate anche nel liquame, nelle persone che lavorano presso gli allevamenti e nell'unico isolato derivante dal canale adiacente al terreno fertirrigato. Considerando lo scarso successo di isolamento di *E. coli* nei campioni ambientali (terreno ed acqua), approcci diversi per esplorare maggiormente le modalità di diffusione delle resistenze in queste nicchie ecologiche sono auspicabili.

Tenendo conto inoltre che le modalità con cui la resistenza agli antibiotici può persistere, indipendentemente dall'esposizione agli stessi, la trasmissione di batteri resistenti dagli animali all'ambiente non dovrebbe essere sottovalutata, in quanto quest'ultimo potrebbe fungere da serbatoio di resistenze che potrebbero potenzialmente persistere e diffondersi anche a seguito di una riduzione di utilizzo delle molecole negli animali.

RINGRAZIAMENTI

Si ringrazia il Ministero della Salute per avere finanziato la ricerca corrente IZSVE 15/14 nell'ambito della quale si sono svolte le attività descritte.

Si ringraziano gli allevatori ed i loro collaboratori che hanno messo a disposizione le loro aziende ed il loro tempo.

BIBLIOGRAFIA

Allen, H.K., Donato, J., Wang, H.H., Cloud-Hansen, K.A., Davies, J., Handelsman, J., 2010. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, volume 8, April 2010, 251-259.

Commission Notice, 2015/C 299/04. Guidelines for the prudent use of antimicrobials in veterinary medicine.

European Medicines Agency, 2016. Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health.

EFSA. Report from the Task Force on Zoonoses Data Collection including guidance for harmonized monitoring of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. from food animals. The EFSA journal (2008) 141: 1-44.

Heinemann, J.A., Ankenbauer, R.G., Amabile-Cuevas, C.F., 2000. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? *Drug Discov. Today* 5, 195–204. doi:10.1016/S1359-6446(00)01483-5

Österberg, J., Wingstrand, A., Nygaard Jensen, A., Kerouanton, A., Cibin, V., Barco, L., Denis, M., Aabo, S., Bengtsson, B., 2016. Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Pigs in Organic and Conventional Farming in Four European Countries. *PLoS One* 11, e0157049. doi:10.1371/journal.pone.0157049

Rosengren, L.B., Waldner, C.L., Reid-Smith, R.J., Dowling, P.M., Harding, J.C.S., 2007. Associations Between Feed and Water Antimicrobial Use in Farrow-to-Finish Swine Herds and Antimicrobial Resistance of Fecal *Escherichia coli* from Grow-Finish Pigs. *Microb. Drug Resist.* 13, 261–270. doi:10.1089/mdr.2007.781

Sengupta, S., Chattopadhyay, M.K., Grossart, H.P., 2013. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Front. Microbiol.* 4, 1–13. doi:10.3389/fmicb.2013.00047

World Health Organisation, 2011. Tackling antibiotic resistance from a food safety perspective in Europe. *World Heal. Organ.* 1–88. doi:www.euro.who.int/en/publications/abstracts/tackling-antibiotic-resistance-from-a-food-safety-perspective-in-europe

World Health Organization, 2015. Global action plan on antimicrobial resistance. WHO Press 1–28.