

# Antimikrobna rezistencija patogenih sojeva intestinalne *Escherichia coli* u prasadi prije i poslije odbića



T. Sukalić\*, T. Jelen, D. Alagić, M. Semper, A. Končurat i I. Pavljak

## Sažetak

Antimikrobna rezistencija bakterija rastići je problem u svijetu, do kojeg je došlo zbog pretjerane i često nepotrebne uporabe antibiotika. Uzgoj svinja nije izuzet od spomenutog problema, a cilj ovog istraživanja bio je prikazati rezistenciju bakterije *Escherichia coli*, kao jednog od najčešćih bakterijskih patogena u prasadi. U ovom istraživanju pretražena su 44 soja *E. coli*, izdvojena iz prasadi prije i poslije odbića, podrijetlom iz konvencionalnih uzgoja sa 6 gospodarstava Koprivničko-križevačke županije. Patogenost sojeva potvrđena je lančanom reakcijom polimeraze, dokazivanjem jednog ili više gena za čimbenike virulencije intestinalne *E. coli*. Disk difuzijskom metodom istražena je rezistencija *E. coli* prema 10 različitih antimikrobnih pripravaka. Rezultati su pokazali najmanju rezistenciju testiranih sojeva *E. coli* na amoksicilin s klavulanskom kiselinom (9,1 %), dok je rezistencija prema florfenikolu iznosila 40,9 % te enrofloksacinu 50 %. Prema ostalim antimikrobnim pripravcima ustanovljena je značajna rezistencija, koja se kreće od 66,7 % prema gentamicinu i cefaleksinu, 73,3 % prema kolistinu, 80 % prema oksitetraciklinu, 86,2 % prema flumekvinu pa sve do 91,3 % prema sulfametoksazolu

s trimetoprimom i 91,4 % prema linkomicinu sa spektinomycinom. Testirani sojevi pokazali su rezistenciju od 50 % ili više na 8 od 10 testiranih antimikrobnih lijekova, a 75 % pretraženih rezistentno je na 4 i više antimikrobnih lijekova. Rezultati ukazuju na viši postotak rezistentnih sojeva u usporedbi s dosadašnjim istraživanjima u konvencionalnim uzgojima svinja, a visoka rezistencija zabilježena je i prema aminoglikozidima (gentamicin) i fluorkinolonom (enrofloksacin), što do sada nije bio slučaj. Testiranim izolatima *E. coli* izdvojenim iz prasadi prije i poslije odbića zajednička je visoka osjetljivost na amoksicilin s klavulanskom kiselinom i visoka rezistencija prema linkomicinu sa spektinomycinom, sulfametoksazolu s trimetoprimom, oksitetraciklinu i flumekvinu. Sojevi izdvojeni iz prasadi prije odbića osjetljiviji su na fluorfenikol i enrofloksacin, a oni izdvojeni iz odbite prasadi na cefaleksin i kolistin. Prema našim saznanjima, ovo je prvo istraživanje antimikrobne rezistencije bakterije *E. coli* izdvojene iz prasadi, podrijetlom s malih farmi u Republici Hrvatskoj.

**Ključne riječi:** *Escherichia coli*, antimikrobna rezistencija, prasada

Dr. sc. Tomislav SUKALIĆ\*, dr. med. vet., (dopisni autor; e-mail: sukalic.vzk@veinst.hr), Hrvatski veterinarski institut – Veterinarski zavod Križevci, Križevci, Hrvatska; dr. sc. Tatjana JELEN, dipl. ing. agr., prof. v. š., dr. sc. Damir ALAGIĆ, dr. med. vet., prof. v. š., Visoko gospodarsko učilište u Križevcima, Hrvatska; Mateja SEMPER, struč. spec. ing. agr., Bedenica, Hrvatska; dr. sc. Ana KONČURAT, dr. med. vet., mr. sc. Ivica PAVLJAK, dr. med. vet., Hrvatski veterinarski institut – Veterinarski zavod Križevci, Križevci, Hrvatska

## Uvod

Antimikrobna rezistencija je dugi niz godina rastući globalni problem u veterinarskoj i humanoj medicini, a uzroci sve veće rezistencije bakterija leže u pretjeranoj uporabi antibiotika i neadekvatnom liječenju virusnih infekcija antibioticima. Povećanju rezistencije bakterija kroz godine svakako je doprinijela i uporaba antimikrobnih pripravaka u ne-terapeutske svrhe, npr. kao promotora rasta, jer svaka primjena antibiotika ima selektivni učinak na rezistentne bakterijske sojeve (Marshall i Levy, 2011.). Raširena uporaba stvorila je veliki selekcijski pritisak i dovela do pojave rezistencije kod oportunističkih bakterijskih patogena (Kang i sur., 2005.). Geni za rezistenciju na antibiotike najčešće su smješteni na pokretnim genetskim elementima (engl. *Mobile Genetic Elements – MBE*) kao što su: plazmidi, transposoni i intergeni koji se prenose između bakterijskih vrsta i rodova (Matanović, 2010., Habrun, 2014.), a zbog horizontalnog transfera gena sve je češća pojava rezistencije na više lijekova (engl. *multidrug resistance – MDR*). Uporaba antibiotika u životinja koje se koriste za hranu može imati velik utjecaj i na pojavu otpornih bakterijskih vrsta u ljudi. Valiakos i sur. (2016.) ustanovili su visoku rezistenciju na oksitetraciklin, ampicilin i amoksisicilin kod sojeva *E. coli* izdvojenih iz svinja, no što je posebno zabrinjavajuće i kod *E. coli* izdvojene iz fecesa radnika na istim farmama. U nekim zemljama EU uvedena je restriktivna uporaba antimikrobnih lijekova u veterinarstvu, kako bi se reducirala selekcija i širenje rezistencije bakterija u životinja (Epruma, 2017.). U Belgiji je smanjena uporaba antibiotika utjecala na smanjenje rezistencije komenzalne *E. coli* prema više vrsta antibiotika, a najbrži „obrnuti smjer rezistencije“ zabilježen je kod cefalosporina i fluorokinolona (Callens i sur., 2018.). Od svih država članica EU,

Nizozemska je uvela najrestriktivniji model i smanjila uporabu antimikrobnih lijekova za 56 % između 2007. i 2012., s postavljenim ciljem od 70 % do 2015. (Speksnijder i sur., 2015.).

Patogeni sojevi bakterije *Escherichia coli* u svinja najčešće prouzročite crijevnu kolibacilozu, a antimikrobna rezistencija znatno se razlikuje između patogenih i komenzalnih izolata (Boerlin i sur., 2005.). Tadesse i sur. (2012.) navode da se rezistencija na više vrsta antimikrobnih pripravaka u *E. coli* povećala sa 7,2 % u 1950-tim godinama do 63,6 % u 2000-tima, što potvrđuju i podatci o rezistenciji na ampicilin, sulfonamide i tetracikline, opisani u cijelom svijetu (Guerra i sur., 2003., Lee i sur., 2009., Rosengren i sur., 2009., Burow i sur., 2019., Jiang i sur., 2019.). Podatci dobiveni u studiji za više EU zemalja otkrivaju visoki nivo rezistencije bakterije *E. coli* prema tetraciklinima, streptomycinu i ampicilinu među oboljelim svinjama (Hendriksen i sur., 2008.), dok je pojava rezistencije niža u izolata iz zdravih svinja. Objavljeni podatci Europske agencije za sigurnost hrane (*European Food Safety Authority – EFSA*) za indikatorsku *E. coli* u tovnih svinja pokazuju nešto nižu rezistenciju na niz antimikrobnih pripravaka kod izolata izdvojenih u Hrvatskoj, u odnosu na prosjek država članica EU. Primjerice, rezistencija na gentamicin u Hrvatskoj iznosi 2,3 %, prosjek EU je 2,7 %, a na oksitetraciklin 48,8 % u Hrvatskoj, dok je prosjek EU 52,1 %. (EFSA, 2019.). Hariharan i sur. (2004.) istražili su osjetljivost enterotoksigene *E. coli* (ETEC) izdvojene iz svinja i teladi, a sojevi izdvojeni iz svinja pokazali su najnižu rezistenciju na ceftiofur te na neomicin i gentamicin. Na neomicin i gentamicin najnižu rezistenciju pokazali su i izolati *E. coli* iz konvencionalnih uzgoja u istraživanju kojeg su proveli Nulsen i sur. (2008.). Danas se u terapiji

i metafilaksi najčešće upotrebljavaju sintetički i potencirani penicilini (amoksicilin, amoksicilin s klavulanskom kiselinom), aminoglikozidi (neomicin, gentamicin), fluorkinoloni (enrofloksacin, marbofloksacin, ciprofloksacin), zatim cefalosporini, spektinomycin, kolistin te drugi antimikrobni lijekovi. Zbog brzog stvaranja rezistencije bakterije *E. coli* na antimikrobne lijekove, potrebno je kontinuirano pratiti osjetljivost izolata, a preporučuje se i tzv. ciklična uporaba antibiotika, jer se time usporava stjecanje rezistencije bakterija (Habrun, 2014.).

U Hrvatskoj je do sada disk-difuzijskom metodom istražena osjetljivost 256 izolata *E. coli* izdvojenih iz dijagnostičkoga materijala s 8 velikih svinjogojskih farmi. Najviši stupanj rezistencije od 98 % ustvrđen je prema oksitetraciklinu, a 87 % izolata bilo je rezistentno na 4 i više antimikrobnih

lijekova (Habrun i sur., 2010.). Drugim istraživanjem u Hrvatskoj bilo je obuhvaćeno 114 izolata *E. coli* izdvojenih iz tankih crijeva prasadi po odbiću, uginulih sa znacima proljeva. Metodom određivanja minimalne inhibicijske koncentracije (MIC) istražena je njihova osjetljivost na deset antimikrobnih lijekova, a rezultati su pokazali najveću rezistenciju prema oksitetraciklinu (89 %), streptomycinu (74 %) i sulfametoksazolu s trimetoprimom (50 %). Otporno na četiri ili više antimikrobnih lijekova bilo je 68 % izolata. Svi sojevi *E. coli* bili su osjetljivi na cefotaxime, a osjetljivost od 97 % pokazali su i na kolistin (Habrun i sur., 2011.).

Cilj ovog istraživanja je pružiti pregled antimikrobne rezistencije sojeva bakterije *E. coli* u svinja na malim farmama, jer do sada nije provedeno istraživanje o raširenosti rezistentnih sojeva u manjim

**Tabela 1.** Podatci o farmama, broju pretražene prasadi i testiranim sojevima *E. coli*

Oznaka i lokacija Farme	Broj krmača	Način držanja krmača	Odbiće u danima	Aktivna imunizacija	Ostale preventivne mjere	Broj pretražene prasadi	Broj testiranih <i>E. coli</i>
A 46°03'06" S 16°23'51" I	50	u boksu pojedinačno	28	ne	Fe, vitamini, cefquinome	5	2
B 46°07'37" S 16°32'17" I	60	grupno	35	započeta tijekom istraživanja, PORCILIS PORCOLI [ <i>E. coli</i> - F4ab, F4ac, F5, F6, LT toxoid]	Fe, vitamini	7	6
C 46°01'04" S 16°37'49" I	40	grupno	45	ne	Fe, vitamini	5	4
D 45°59'51" S 16°26'57" I	90	grupno	30	RESPISURE [ <i>Mycoplasma hyopneumoniae</i> ]	BAYCOX [ <i>Isospora suis</i> ], Fe, vitamini	13	10
E 45°58'59" S 16°36'00" I	50	u boksu pojedinačno	35	ne	Gentamicin dozer, Fe, vitamini	12	11
F 45°57'15" S 16°28'13" I	75	u boksu pojedinačno i grupno	30	ne	BAYCOX [ <i>Isospora suis</i> ], Fe, vitamini	13	11

konvencionalnim uzgojima svinja u Hrvatskoj. Iz rezultata će biti vidljivo koji se antimikrobni pripravci nepotrebno i prekomjerno koriste u svinja, koji su najefikasniji u liječenju intestinalne kolibaciloze prasadi te koliko je proširena rezistencija prema više antimikrobnih lijekova.

## Materijali i metode

Izolati bakterije *Escherichia coli* testirani u ovom istraživanju, izdvojeni su iz tankih crijeva uginule prasadi, podrijetlom iz 6 uzgoja svinja s obiteljskih poljoprivrednih gospodarstava Koprivničko-križevačke županije, označenih slovima „A“–„F“. Odabrana gospodarstva bave se konvencionalnim uzgojem svinja uz zatvoreni sustav držanja, a podatci o farmama, životinjama, pretraženim izolatima *E. coli* i preventivnim mjerama koje se provode na farmama prikazani su u tabeli 1. Valja napomenuti da osim preventivnih mjera, vlasnici farmi često sami provode liječenje prasadi primjenom do-

stupnih antimikrobnih lijekova, pri pojavi bolesti s vidljivim kliničkim znacima kao što su proljev ili otežano disanje.

Iz 55 jedinki prasadi s navedenih farmi izdvojeno je 54, a na antimikrobnu osjetljivost testirano ukupno 44 soja bakterije *Escherichia coli*.

U svrhu izdvajanja bakterije *Escherichia coli* iz crijeva prasadi korištene su konvencionalne bakteriološke metode (Quinn i sur., 2003.). Kao osnovna podloga korišten je krvni agar s 5 % defibrinirane ovčje krvi („Merck“) kako bi se ustanovile morfološke karakteristike i hemolitičke osobine pojedinih izolata. Uzorci su naciepljivani i na selektivne krute hranjive podloge, MacConkey agar, XLD agar i ENDO agar („Merck“), kako bi razlučili *E. coli* od ostalih enterobakterija. Kulture su inkubirane aerobno na 37 °C/24-48 sati. Za dokazivanje biokemijskih osobina bakterija koristili smo API 20E niz („BioMerieux“).

Sojevi *E. coli* pretraženi su lančanom reakcijom polimerazom (PCR) na prisutnost gena intestinalne *E. coli*

**Tabela 2.** Antimikrobni pripravci korišteni u istraživanju

ANTIMIKROBNI LIJEK	OZNAKA	SADRŽAJ DISKA (KONCENTRACIJA)	PROIZVOĐAČ
Gentamicin	GM	10 µg	OXOID
Linkomicin/Spektinomycin	LS	9/100 µg	OXOID
Amoksicilin/Klavulanska kiselina	AMC	20/10 µg	BIO-RAD
Cefaleksin	CFX	30 µg	BIO-RAD
Oksitetraciklin	OTC	30 µg	MAST DIAGNOSTICS
Enrofloksacin	ENF	5 µg	OXOID
Flumekvin	FLU	30 µg	OXOID
Sulfametoksazol/Trimetoprim	SXT	25/75 µg	MAST DIAGNOSTICS
Florfenikol	FFC	30 µg	OXOID
Kolistin sulfat*	CO	10 µg	OXOID

\* disk difuzijska metoda nije referentna za određivanje rezistencije na kolistin; European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) i Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) preporučuju određivanje minimalne inhibicijske koncentracije (MIC)

odgovornih za proizvodnju termolabilnih (LT) i termostabilnih (STa, STb, EAST1) enterotoksina, Shiga toksina (Stx1, Stx2, Stx2e) te fimbrijskih (F4, F5, F6, F18, F41) i nefimbrijskih (AIDA-I, PAA, INTIMIN) adhezina, kako bi se potvrdila patogenost soja.

Osetljivost izdvojenih sojeva prema antimikrobnim lijekovima proveli smo disk- difuzijskom metodom na Mueller-Hinton agaru, direktnom suspenzijom kolonija uz 0,5 McFarland, prema standardu *Clinical and Laboratory Standards Institute M02-A12 (CLSI, 2015.a)*, a diskovi koje smo testirali prikazani su u tabeli 2. Zone inhibicije za antimikrobne pripravke procijenjene su sukladno dodatku za antimikrobno testiranje M100-S25 (CLSI, 2015.b).

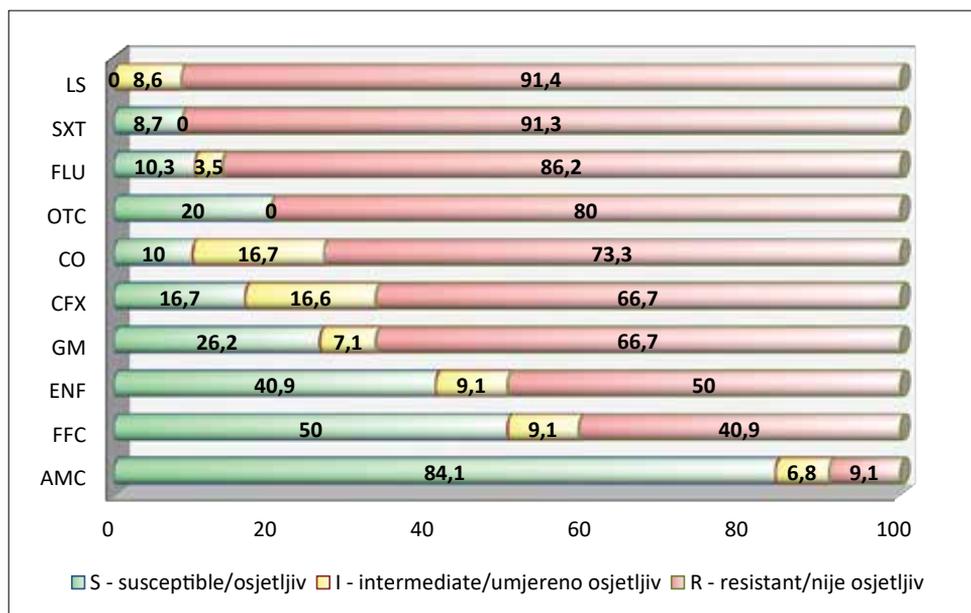
## Rezultati

Iz tankih crijeva pretražene prasadi izdvojena su 54 soja bakterije *Escherichia coli*, na kojima se po ekstrakciji DNA provelo pretraživanje na prisutnost gena

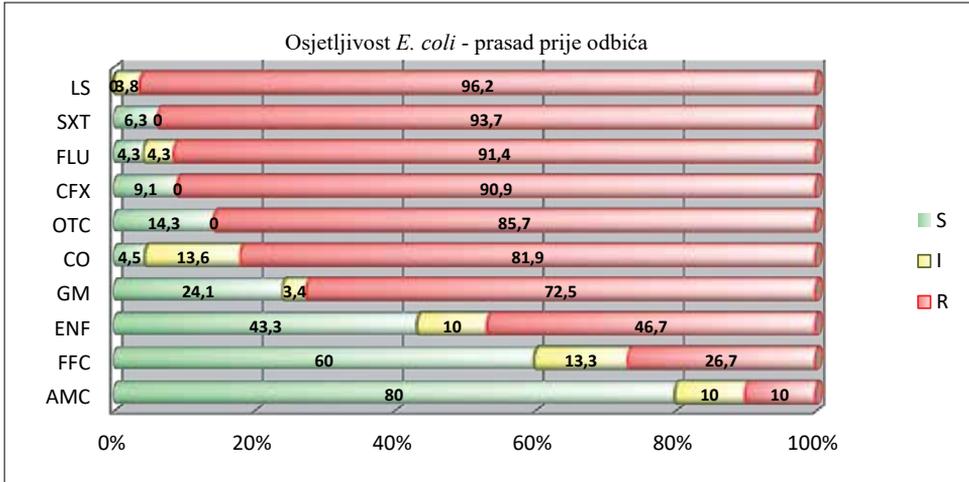
za čimbenike virulencije intestinalne *E. coli*. Kod 10 izolata nisu ustvrđeni virulentni geni, a u 44 testirana soja molekularnim metodama (PCR) dokazano je 1-7 čimbenika virulencije intestinalne *E. coli* po soju (rezultati objavljeni drugdje), čime je potvrđena njihova patogenost te se pristupilo testiranju antimikrobne osetljivosti.

Postotak osetljivih i rezistentnih sojeva prema pojedinim antimikrobnim pripravcima u ovom istraživanju, prikazan je i u grafikonu 1.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da je najveći postotak testiranih sojeva *E. coli* dobro ili umjereno osetljiv na amoksisicilin s klavulanskom kiselinom (AMC) 90,9 %, dok je osetljivost prema florfenikolu (FFC) 59,1 % te enrofloksacinu (ENF) 50 %. Prema ostalim antimikrobnim pripravcima pokazuju značajnu rezistenciju, koja se kreće od 66,7 % prema gentamicinu (GM) i cefaleksinu (CFX), 73,3 % prema kolistinu (CO), 80 % prema oksitetraciklinu (OTC), 86,2 % prema flumekvinu (FLU), 91,3 % prema sulfa-



Grafikon 1. Odnos osjetljivih i rezistentnih izolata prema antimikrobnim pripravcima



**Grafikon 2.** Odnos osjetljivih i rezistentnih izolata *E. coli* u prasadi prije odbića

metoksazolu s trimetorpimom i 91,4 % prema linkospektinu (LS). Rezultati po farmama, ukazuju na određene razlike u rezistenciji izolata *E. coli* prema testiranim antimikrobnim pripravcima.

Na farmi „D“ su svi sojevi potpuno osjetljivi na AMC te potpuno rezistentni na FFC, SXT, LS i OTC. Zamjetna je i visoka rezistencija prema ENF i GM koja iznosi 70 %, ali su izolati bili osjetljivi ili umjereno osjetljivi na CFX u 75 % slučajeva.

Rezultati za farmu „E“ također pokazuju osjetljivost svih istraženih izolata na AMC, a rezistencija na FFC je na istoj farmi znatno manja od one ustanovljene na farmi „D“ te iznosi 36 %. Visoka rezistencija uočljiva je prema GM (81 %), a potpuna rezistencija testiranih sojeva izražena je prema FLU, CO, SXT i OTC.

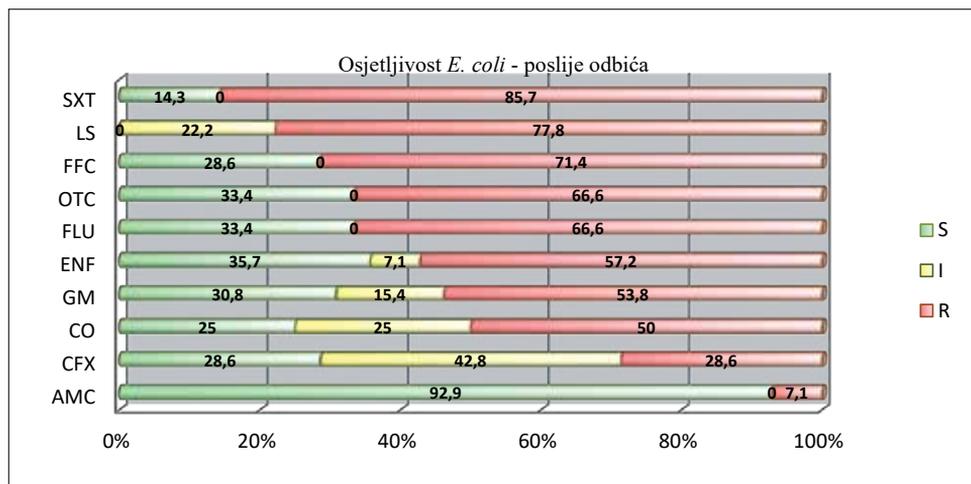
Farma „F“ specifična je kao jedina gdje je ustanovljena najveća osjetljivost sojeva *E. coli* prema FFC (90,1%), a za razliku od farmi „D“ i „E“ gdje je ustanovljena 100 %-tna osjetljivost prema AMC, na farmi „F“ javlja se umjerena rezistencija izdvojenih sojeva prema AMC i iznosi 27,3 %. Rezistencija na GM je kao i kod

farme „E“ visoka i iznosi 81,2 %, prema LS je rezistentno 90 % sojeva, a 100 %-tna rezistencija izražena je čak prema 5 testiranih antimikrobnih lijekova - FLU, CFX, CO, SXT i OTC.

Na farmi „B“ uočljiva je visoka rezistencija na ENF (83,3 %), ali i niska rezistencija na FFC i AMC (16,6 %) te GM (20 %). Svi izolati sa farme „C“ su pokazali 100 %-tnu osjetljivost prema AMC, FFC i GM te dobru osjetljivost prema ENF (75 %), dok su svi pretraženi uzorci s farme „A“ bili osjetljivi na AMC i ENF te potpuno rezistentni prema FFC i GM.

Rezultati osjetljivosti *E. coli* u prasadi prije i poslije odbića donekle se razlikuju. Osjetljivost testiranih sojeva u obje kategorije najbolja je prema AMC, no nešto je manja kod sojeva izdvojenih iz prasadi prije odbića (80 %), u odnosu na prasad poslije odbića (92,9 %).

U prasadi prije odbića (grafikon 2), rezistencija viša od 90 % zabilježena je na čak četiri antimikrobna pripravka - LS, SXT, FLU i CFX, a na još dva više od 80 % - OTC i CO. Na GM je bilo rezistentno 72,5 %, na ENF 46,7 %, a na FFC 26,7 % testiranih sojeva.

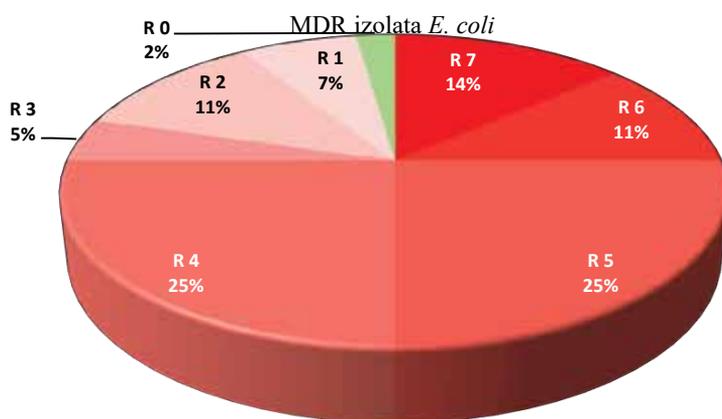


Grafikon 3. Odnos osjetljivih i rezistentnih izolata *E. coli* u prasadi poslije odbića

U prasadi poslije odbića (grafikon 3) je uz visoku osjetljivost prema AMC, vidljivo da je 71,4 % izolata bilo dobro ili umjereno osjetljivo na CFX, a 50 % na CO. Testirani sojevi izdvojeni iz odbite prasadi pokazali su najvišu rezistenciju prema SXT (85,7 %), rezistencija viša od 70 % zabilježena je

prema LS i FFC, a viša od 60 % prema OTC i FLU.

Kod većine izolata u istraživanju ustanovljena je rezistencija na više antimikrobnih pripravaka, a rezultati su prikazani u grafikonu 4. Vidljivo je da 75 % testiranih sojeva *E. coli* pokazuje rezistenciju prema četiri i više testiranih lijekova.



Grafikon 4. Rezistencija izolata *E. coli* na više antimikrobnih lijekova (MDR) izražena u %

## Rasprava

Problem rezistencije bakterija prema antimikrobnim lijekovima prisutan je u cijelom svijetu i s vremenom postaje sve veći, unatoč napretku znanosti i razvijanju novih lijekova, a antimikrobni pripravci se bez obzira na povećanu svijest o mogućnosti razvoja rezistencije kod različitih vrsta bakterija, još uvijek pretjerano i često nepotrebno koriste. Uzgoji svinja, u kojima je bakterija *Escherichia coli* jedan od najčešćih bakterijskih patogena, nisu izuzeti od sveprisutnog problema antimikrobne rezistencije, a iluzorno je očekivati da će se rezistencija prema antibioticima i kemoterapeuticima pojaviti samo u uzgojima s intenzivnom svinjogojskom proizvodnjom i u velikim aglomeracijama, gdje je uporaba antimikrobnih pripravaka učestala, kako u preventivi tako i u kurativi. Uzorci pretraženi u ovom istraživanju podrijetlom su iz zatvorenih uzgoja veličine 40-90 krmača, gdje na 4 od 6 farmi („B“, „C“, „D“ i „F“) prasadi po prašenju dobiva preventivno samo željezo i vitamine, dok se na dvije farme („A“ i „E“) preventivno daju i antibiotici. Upravljanje na nivou stada, uključujući i uporabu antimikrobnih lijekova, može utjecati na antimikrobnu rezistenciju (Rosengren i sur., 2009.), no naši rezultati govore o podjednako visokoj rezistenciji na svim farmama i ne može se uočiti značajna razlika između farmi koje prakticiraju preventivnu primjenu antibiotika i onih na kojima to nije praksa. Istraženi sojevi posjedovali su gene virulencije i pripadaju patogenoj intestinalnoj *E. coli*, a dosadašnja istraživanja ukazuju na značajno višu rezistenciju prema većem broju lijekova kod ETEC u usporedbi na non-ETEC patotipovima (Rosager i sur., 2017.) pa prikazani rezultati i nisu potpuno iznenađujući. Aasmäe i sur. (2019.) usporedili su rezistenciju izolata *E. coli* iz klinički zdravih i bolesnih svi-

nja, a rezultati su pokazali znatno višu rezistenciju na više lijekova u bolesnih svinja.

Ako usporedimo rezultate dosadašnjih istraživanja provedenih u Hrvatskoj (Habrun i sur., 2010., 2011.) s rezultatima ovog istraživanja, možemo uočiti određene sličnosti, ali i velike razlike. U ovom istraživanju, AMC je antimikrobni lijek prema kojem su izolati *E. coli* pokazali najnižu rezistenciju u ukupno pretraženoj populaciji (Grafikon 1), kao i u populaciji odbite prasadi (Grafikon 3), što se podudara s rezultatima koje su dobili Habrun i sur. (2011.). Visoka rezistencija prema SXT (91,3 %) koju smo ustanovili kod izolata u ovom istraživanju, može se uočiti i u rezultatima koje su dobili Habrun i sur. (2010.). U velikoj mjeri podudaraju se i rezultati rezistencije prema OTC u ovom istraživanju (80 %) s rezultatom 89 % koji su zabilježili Habrun i sur. (2011.), dok rezultati ovog istraživanja pokazuju znatno višu rezistenciju prema ENR i GM.

Najveće uočene razlike u odnosu na istraživanja provedena i u Hrvatskoj i u svijetu, za koje se može reći da su zabrinjavajuće, odnose se na osjetljivost testiranih sojeva prema CO, za kojeg su Habrun i sur. (2010., 2011.) ustanovili nisku rezistenciju od 6 %, odnosno 3 %, a rezultati našeg istraživanja pokazuju vrlo visoku rezistenciju od 73,3 % (Grafikon 1). Nisku rezistenciju *E. coli* sojeva na CO (6,3 %) ustvrdili su u oboljelih svinja Morales i sur. (2012.), a u istraživanju koje su proveli Cabal i sur. (2013.) rezistencija na CO nije ustanovljena niti u jednom slučaju. Nasuprot tome, Wang i sur. (2019.) ustanovili su mobilne gene rezistencije na CO u svinjama, ali i okolišnim uzorcima s farme, a Delannoy i sur. (2017.) ustanovili da je kolistin-rezistentna *E. coli* u više od 50 % slučajeva rezistentna i na sulfonamide, trimetoprim, tetracikline, ampicilin ili kloramfenikol.

Kolistin sulfat se u RH redovito koristi u liječenju crijevnih infekcija prouzročениh intestinalnom *E. coli* u svinja (Bilandžić i sur., 2018.), a na nivou EU je rezistencija niska. No, kod indikatorske *E. coli* postoji značajna pozitivna povezanost između potrošnje polimiksina i rezistencije na kolistin (ECDC/EFSA/EMA, 2017.).

Brojni bakterijski izolati su u više istraživanja pokazali rezistenciju na CO korištenjem disk-difuzijske metode, no naknadnim određivanjem osjetljivosti mikrodilucijskom metodom, koja je referentna metoda za polimiksin, izolati nisu pokazali rezistenciju na kolistin. EUCAST je stoga izdao upozorenje za uporabu disk-difuzijske metode zbog slabe difuzije velike molekule kolistina ([http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/warnings/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/)) i zajedno s CLSI preporučio mikrodiluciju kao jedinu valjanu metodu. Na temelju rezultata istraživanja koje su na kolekciji od 75 Gram-negativnih bakterija proveli Matuschek i sur. (2018.), savjetuje se laboratorijima da pri testiranju osjetljivosti prema kolistinu ne vjeruju disk-difuzijskoj metodi. Stoga rezultate koji se odnose na visoku rezistenciju prema CO u ovom istraživanju, valja promatrati s rezervom.

Promatrajući rezistenciju sojeva *E. coli* prema GM, uočljive su velike razlike između dobivenih rezultata i rezultata dosadašnjih istraživanja. Postotak rezistentnih sojeva izdvojenih iz prasadi u konvencionalnim uzgojima, kreće se od 0 % (Zankari i sur., 2013., Valiakos i sur., 2016.), preko zanemarive rezistencije od 0,7 % u istraživanju Nulsena i sur. (2008.) provedenog na Novom Zelandu, do još uvijek niske rezistencije koju su u rezultatima prikazali Österberg i sur. (2016.), a koja je u Švedskoj, Danskoj, Italiji i Francuskoj, kako slijedi iznosila 1,4 %, 5,8 %, 6,4 %, odnosno 7,5 %. Nešto viša rezistencija na GM zabilježena je u istraživanju koje su proveli Hariharan i sur. (2004.), a kreće se od 11-13 %. U usporedbi s navedenim rezultatima,

rezistencija od 66,7 % kod izolata u našem istraživanju višestruko je veća. Jiang i sur. (2019.) ustanovili su značajnu razliku u osjetljivosti na GM između (ETEC) i non-ETEC patotipova, što je utvrđeno i kada se radi o osjetljivosti prema ENF.

Ako promatramo rezultate koji se odnose na osjetljivost izdvojenih sojeva *E. coli* prema OTC, gotovo u svim do danas provedenim istraživanjima vidljiva je visoka ili vrlo visoka rezistencija. Rezultat od 80 % gotovo je identičan s rezultatima koje su dobili Hariharan i sur. (2004.), a koji ovisno o periodu istraživanja iznose 81 %, odnosno 82 %. Značajnu rezistenciju u istraživanju provedenom u više zemalja EU, osim u zemljama Skandinavije, ustanovili su Hendriksen i sur. (2008.). Nulsen i sur. (2008.) navode rezistenciju prema OTC od 60%, a Valiakos i sur. (2016.) 50 %. Visoka rezistencija zabilježena je i u konvencionalnim uzgojima u Francuskoj i Italiji, gdje iznosi 74,5 %, odnosno 74,4 %. Rezultat rezistencije prema OTC u Danskoj je 42,3 %, a prema navedenim rezultatima iz konvencionalnih uzgoja, može se reći da je niska rezistencija od 14,1 % zabilježena jedino u Švedskoj (Österberg i sur., 2016.).

Iz grafikona 4 uočljiva je otpornost sojeva bakterije *E. coli* prema više antimikrobnih lijekova. Mazurek i sur. (2018.) potvrdili su da se glavna preraspodjela genetičkog materijala kod *E. coli* odvija horizontalnim transferom gena, a geni rezistencije smješteni su najčešće na plazmidima koji su konjugativni (Brilhante i sur., 2019.), što predstavlja rizik za stjecanje svojstva multiple rezistencije. Naši rezultati pokazuju da je 33/44 izolata ili 75 % otporno na 4 ili više antimikrobnih lijekova, a taj postotak je između rezultata od 68 % (Habrun i sur., 2011.) i 87 % (Habrun i sur., 2010.). Lee i sur. (2009.) su kod ETEC patotipova izdvojenih iz prasadi u Koreji pronašli 87,9 % rezistentnih na više od 4 antibiotika. Jiang i sur. (2019.) ustanovili su da je

86,2 % izolata multirezistentno, a Akwar i sur. (2008.) ustvrdili su da je najčešća rezistencija na 2 do 6 lijekova, uz značajno veću rezistenciju na farmama koje miješaju lijekove u hranu.

Usporedbom rezultata prikazanih u grafikonima 2 i 3 uočljiva je nešto viša rezistencija kod izolata *E. coli* izdvojenih iz prasadi prije odbića, koji su rezistentni na čak šest lijekova u više od 80 % slučajeva, no u onih po odbiću. Sojevi *E. coli* kod obje kategorije pokazuju najbolju osjetljivost prema AMC, no u prasadi prije odbića su u više od 50 % slučajeva dobro ili umjereno osjetljivi još prema FFC i ENF, dok su u prasadi po odbiću u 50 % slučajeva dobro ili umjereno osjetljivi prema CFX i CO. Razlike u osjetljivosti na CFX i CO između spomenutih kategorija ujedno su i najprimjetnije među prikazanim rezultatima. U istraživanju koje su na prasadi po odbiću proveli Prapasarakul i sur. (2010.), sojevi *E. coli* pokazali su visoku rezistenciju prema SXT (93,8 %) i OTC (89,1 %), dok je rezistencija prema ENR bila nešto niža (48,4 %). U istom istraživanju, preko 90 % izolata bilo je rezistentno na većinu lijekova, osim CO.

Lijek od izbora u liječenju infekcija izazvanih patogenom intestinalnom *E. coli* prema našim rezultatima svakako je AMC, što se podudara s rezultatima objavljenim u nekim od dosad provedenih istraživanja (Kozak i sur., 2009., Rosengren i sur., 2009.).

Širom svijeta je poznata rezistencija sojeva bakterije *E. coli* prema OTC i sulfonamidima te potenciranim sulfonamidima, no prema aminoglikozidima (neomicin, gentamicin) i fluorokinolonima (enrofloksacin, marbofloksacin, ciprofloksacin) rezistencija je uglavnom niska, što u istraživanju provedenom na uzorcima s naših gospodarstava nije slučaj. Usporedba naših rezultata s rezultatima dosadašnjih istraživanja, ukazuje na visoku rezistenciju sojeva bakterije *E. coli* u uzgojima svinja Koprivničko-križevačke

županije. Podatak o 75 % pretraženih sojeva koji su rezistentni na 4 i više antimikrobnih lijekova, govori u prilog tvrdnji o stalnom povećanju rezistencije bakterija (Tadesse i sur., 2012.) i daje nam razlog za zabrinutost. Moramo spomenuti da farme na kojima se primjenjuje preventivno davanje antibiotika imaju zabilježen visok stupanj rezistencije, ali ne odstupaju drastično od prosjeka cijelog istraživanja. Tako je na farmi „E“ zabilježena ukupna rezistencija izdvojenih sojeva *E. coli* na 65,4 % testiranih diskova s antimikrobnim pripravcima, što je 5 % više od prosjeka. No, istovremeno je rezistencija na 4 i više antibiotika 2,7 % niža u odnosu na prosjek istraživanja i iznosi 72,3 %.

Iz prikazanih rezultata vidljivo je da sojevi bakterije *E. coli* izdvojeni iz prasadi s malih farmi Koprivničko-križevačke županije pokazuju rezistenciju od 50 % ili više na 8 od 10 testiranih antimikrobnih lijekova, a tek na jedan od deset testiranih pripravaka osjetljivi su u više od 90 % slučajeva (grafikon 1). S obzirom na rezultate ovog istraživanja i trendove u svijetu koji pokazuju sve veću rezistenciju bakterija prema antimikrobnim lijekovima, opravdana je bojazan za budućnost liječenja bakterijskih infekcija u uzgojima svinja, a posebno među osjetljivom populacijom prasadi prije i poslije odbića. Rješenje, možda, leži u dosljednom provođenju programa restriktivne uporabe antibiotika u farmskih životinja.

## Literatura

1. AASMÄLE, B., L. HÄKKINEN, T. KAART and P. KALMUS (2019): Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from Estonian cattle and swine from 2010 to 2015. *Acta Vet. Scand.* 61:5.
2. AKWAR, H. T., C. POPPE, J. WILSON, R. J. REID-SMITH, M. DYCK, J. WADDINGTON, D. SHANG and S. A. McEWEN (2008): Prevalence and patterns of antimicrobial resistance of fecal *Escherichia coli* among pigs on 47 farrow-to-finish farms with different in-feed medication policies in Ontario and British Columbia. *Can. J. Vet. Res.* 72, 195-201.

3. BILANDŽIĆ, N., I. VARENINA, B. SOLOMUN KOLANOVIĆ, Đ. BOŽIĆ LUBURIĆ, I. VARGA and S. TERZIĆ (2018): Colistin, a last defence polypeptide antibiotic against invasive Gram-negative bacteria. *Vet. stn.* 49, 273-286. (In Croatian).
4. BOERLIN, P., R. TRAVIS, C. L. GYLES, R. REID-SMITH, N. JANECKO, H. LIM, V. NICHOLSON, S. A. MCEWEN, R. FRIENDSHIP and M. ARCHAMBAULT (2005): Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of *Escherichia coli* Isolates from Swine in Ontario. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6753-6761.
5. BRILHANTE, M., V. PERRETEEN and V. DONÀ (2019): Multidrug resistance and multivirulence plasmids in enterotoxigenic and hybrid Shiga toxin-producing/enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic pigs in Switzerland. *Vet. J.* 244, 60-68.
6. BURROW, E., A. ROSTALSKI, J. HARLIZIUS, A. GANGL, C. SIMONEIT, M. GROBBEL, C. KOLLAS, B. A. TENHAGEN and A. KÁSBOHRER (2019): Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev. Vet. Med.* 165, 52-62.
7. CABAL, A., S. GÓMEZ-BARRERO, C. PORRERO, C. BÁRCENA, G. LÓPEZ, R. CANTÓN, C. GORTÁZAR, L. DOMINGUEZ and J. ALVAREZ (2013): Assessment of Virulence Factors Characteristic of Human *Escherichia coli* Pathotypes and Antimicrobial Resistance in O157:H7 and Non-O157:H7 Isolates from Livestock in Spain. *Appl. Environ. Microb.* 79, 4170-4172.
8. CALLENS, B., M. CARGNEL, S. SARRAZIN, J. DEWULF, B. HOET, K. VERMEERSCH, P. WATTIAU and S. WELBY (2018): Association between a decreased veterinary antimicrobial use and resistance in commensal *Escherichia coli* from Belgian livestock species (2011-2015). *Prev. Vet. Med.* 157, 50-58.
9. Clinical and Laboratory Standards Institute (2015a): M02-A12 Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard-Twelfth Edition.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute (2015b): M100-S25 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement.
11. DELANNOY, S., L. LE DEVENDEC, E. JOUY, P. FACH, D. DRIDER and I. KEMPF (2017): Characterization of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from Diseased Pigs in France. *Front Microbiol.* 8:2278.
12. ECDC/EFSA/EMA (2017): ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistance Analysis (JIACRA) Report, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), European Food Safety Authority (EFSA) and European Medicines Agency (EMA). EFSA J. 15, 4872.
13. EFSA (2019): <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2019.5598>
14. EPRUMA (2017): European Platform for the Responsible Use of Medicines in Animals. <http://www.epruma.eu>
15. GUERRA, B., E. JUNKER, A. SCHROETER, B. MALORNY, S. LEHMANN and R. HELMUTH (2003): Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *J. Antimicrob. Chemother.* 52, 489-492.
16. HABRUN, B., G. KOMPES, Ž. CVETNIĆ, S. ŠPIČIĆ, M. BENIĆ and M. MITAK (2010): Antimicrobial sensitivity of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pasteurella multocida*, *Streptococcus suis* and *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from diagnostic samples from large pig breeding farms in Croatia. *Vet. arhiv* 80, 571-583.
17. HABRUN, B., D. STOJANOVIĆ, G. KOMPES and M. BENIĆ (2011): Antimicrobial susceptibility of enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from weaned pigs in Croatia. *Acta Vet. (Beograd)* 61, 585-590.
18. HABRUN, B. (2014): Antimikrobni lijekovi. U: *Klinička veterinarska bakteriologija*. Medicinska naklada, Zagreb, pp. 73-89.
19. HARIHARAN, H., M. COLES, D. POOLE and R. PAGE (2004): Antibiotic resistance among enterotoxigenic *Escherichia coli* from piglets and calves with diarrhea. *Can Vet. J.* 45, 605-606.
20. HENDRIKSEN, R. S., D. J. MEVIUS, A. SCHROETER, C. TEALE, E. JOUY, P. BUTAYE, A. FRANCO, A. UTINANE, A. AMADO, M. MORENO, C. GREKO, K. DE STÄRK, C. BERGHOLD, A. L. MYLLYNIEMI, A. HOSZOWSKI, M. SUNDE and F. M. AARESTRUP (2008): Occurrence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens and indicator bacteria in pigs in different European countries from year 2002.-2004.: the ARBAO-II study. *Acta Vet. Scand.* 50: 19. [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/warnings/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/)
21. [http://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/warnings/](http://www.eucast.org/ast_of_bacteria/warnings/)
22. JIANG, F., Y. ZHENG, T. S. FRANA, O. SAHIN, Q. ZHANG and G. LI (2019): Genotypes and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Hemolytic *Escherichia coli* from Diarrheic Piglets. *Foodborne Pathog. Dis.* 16, 94-103.
23. KANG, S-G., D-Y LEE, S-J SHIN, J-M AHN and H-S YOO (2005): Changes in patterns of antimicrobial susceptibility and class 1 intergen carriage among *Escherichia coli* isolates. *J. Vet. Sci.* 6, 201-205.
24. KOZAK, G. K., P. BOERLIN, N. JANECKO, R. J. REID-SMITH and C. JARDINE (2009): Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 559-566.
25. LEE, S. I., N. RAYAMAHJI, W. J. LEE, S. B. CHA, M. K. SHIN, Y. M. ROH and H. S. YOO (2009): Genotypes,

- antibiogram and pulsed-field gel electrophoresis profiles of *Escherichia coli* strains from piglets in Korea. *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 510-516.
26. MARSHALL, B. M. and S. B. LEVY (2011): Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clin. Microbiol. Rev.* 24, 718-733.
  27. MATANOVIĆ, K. (2010): Utjecaj uporabe antibiotika u liječenju životinja na zdravlje ljudi. U: Šeol, B., Matanović, K., Terzić, S.: Antimikrobna terapija u veterinarskoj medicini. Medicinska naklada, Zagreb (13-20).
  28. MATUSCHEK, E., J. AHMAN, C. WEBSTER and G. KAHLMETER (2018): Antimicrobial susceptibility testing of colistin – evaluation of seven commercial MIC products against standard broth microdilution for *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter* spp. *Clin. Microbiol. Infect.* 24, 865-870.
  29. MAZUREK, J., E. BOK and K. BALDY-CHUDZIK (2018): Complexity of Antibiotic Resistance in Commensal *Escherichia coli* Derived from Pigs from an Intensive-Production Farm. *Microbes. Environ.* 33, 242-248.
  30. MORALES, A. S., J. F. DE ARAÚJO, V. T. DE MOURA GOMES, A. T. R. COSTA, D. DOS PRAZERES RODRIGUES, T. S. P. FERREIRA, P. H. N. DE LIMA FILSNER, M. R. FELIZARDO and A. M. MORENO (2012): Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains Isolated from Swine in Brazil. *Sci. World J.*, 109795.
  31. NULSEN, M. F., M. B. MOR and D. E. LAWTON (2008): Antibiotic resistance among indicator bacteria isolated from healthy pigs in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 56, 29-35.
  32. ÖSTERBERG, J., A. WINGSTRAND, A. N. JENSEN, A. KEROUANTON, V. CIBIN, L. BARCO, M. DENIS, S. AABO and B. BENGTSOON (2016): Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* from Pigs in Organic and Conventional Farming in Four European Countries. *PLoS one* 11(6): e0157049
  33. QUINN, P. J., B. K. MARKEY, M. E. CARTER, W. J. DONNELLY and F. C. LEONARD (2003): *Enterobacteriaceae*. In: *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, Blackwell Science. Section II, Chapter 18, pp. 106-123.
  34. PRAPASARAKUL, N., P. TUMMARUK, W. NIYOMTUM, T. TRIPIPAT and O. SERICHANTALERGS (2010): Virulence Genes and Antimicrobial Susceptibilities of Hemolytic and Nonhemolytic *Escherichia coli* Isolated from Post-Weaning Piglets in Central Thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 1603-1608.
  35. ROSAGER, W. N., N. J. PETER, J. S. ERIK LIND, H. SVEND and D. MATTHEW and P. K. STEEN (2017): Comparison of antimicrobial resistance in *E. coli* isolated from rectal and floor samples in pens with diarrhoeic nursery pigs in Denmark. *Prev. Vet. Med.* 147, 42-49.
  36. ROSENGREN, L. B., C. L. WALDNER and R. J. REID-SMITH (2009): Associations between Antimicrobial Resistance Phenotypes, Antimicrobial Resistance Genes and Virulence Genes of Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Grow-Finishing Pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1373-1380.
  37. SPEKSNIJDER, D. C., D. J. MEVIUS, C. J. M. BRUSCHKE and J. A. WAGENAAR (2014): Reduction of Veterinary Antimicrobial Use in the Netherlands. The Dutch Success Model. *Zoonoses Public Health* 62, 79-87.
  38. TADESSE, D. A., Z. SHAOHUA, E. TONG, S. AYERS, A. SINGH, M. J. BARTHOLOMEW and P. F. McDERMOTT (2012): Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950-2002. *Emerg Infect. Dis.* 18, 741-749.
  39. VALLAKOS, G., C. TSOKAN and D. CHATZOPOULOS (2016): Resistance in *Escherichia coli* Strains Isolated from Pig Faecal Samples and Pig farm Workers, Greece. *Am. J. Anim. Vet. Sci.* 11, 142-144.
  40. WANG, Z., S. SCHWARZ, W. YIN, T.R. WALSH, Y. ZHOU, J. HE, H. JIANG, Y. WANG and S. WANG (2019): Genetic environment of colistin resistance genes *mcr-1* and *mcr-3* in *Escherichia coli* from one pig farm in China. *Vet. Microbiol.* 230, 56-61.
  41. ZANKARI, E., H. HASMAN, R. SOMMER KAAS, A. M. SEYFARTH, Y. AGERS, O. LUND, M. VOLDBY LARSEN and F. M. AARESTRUP (2013): Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. *J. Antimicrob. Chemother.* 68, 771-777.

## Antimicrobial resistance of virulent intestinal *Escherichia coli* in pre- and post-weaning piglets

Tomislav SUKALIĆ, DVM, PhD, Croatian Veterinary Institute - Regional Laboratories Križevci, Croatia; Tatjana JELEN, PhD, College Professor, Damir ALAGIĆ, DVM, PhD, College Professor, Križevci College of Agriculture; Mateja SEMPER, Spec. Grad. Prof. Agr., Bedenica, Croatia; Ana KONČURAT, DVM, PhD, Ivica PAVLJAK, DVM, MSc, Croatian Veterinary Institute - Regional Laboratories Križevci, Croatia

Antimicrobial resistance in bacteria is a growing problem worldwide, due to the overuse and often unnecessary use of antibiotics. Pig farming is no exception, and the aim of this study was to demonstrate antimicrobial resistance of *Escherichia coli* as one of the most common bacterial pathogens in piglets. In this study, 44 strains of *E. coli* were isolated from pre- and post-weaning piglets, originating from conventional breeding on six holdings in Koprivnica-Križevci County, Croatia. In order to confirm the pathogenicity of strains, *E. coli* isolates were tested by PCR for the presence of genes for one or more virulence factors of intestinal *E. coli*. The disk diffusion test was used to investigate the resistance of *E. coli* to 10 different antimicrobial drugs. The results showed the lowest resistance of tested *E. coli* strains to amoxicillin-clavulanic acid (9.1%), while resistance to florfenicol was 40.9% and to enrofloxacin 50%. Other antimicrobial drugs showed significant resistance, ranging from 66.7% to gentamicin and cephalexin, 73.3% to colistin, 80% to oxytetracycline, 86.2% to flumequine, 91.3% to sulfamethoxazole-trimethoprim, and 91.4% to

lincomycin-spectinomycin. The tested strains showed 50% or higher antimicrobial resistance to 8 of 10 antimicrobial drugs, and 75% of the strains were found to be resistant to four or more antimicrobial drugs. The results indicate a higher percentage of resistant strains compared to previous studies in conventional pig breeding, and a higher resistance observed for aminoglycosides (gentamicin) and fluoroquinolones (enrofloxacin), which was not previously recorded. The tested isolates of *E. coli* from pre- and post-weaning piglets share a high susceptibility to amoxicillin-clavulanic acid and high resistance to lincomycin-spectinomycin, sulfamethoxazole-trimethoprim, oxytetracycline and flumequin. The strains originated from pre-weaning piglets are more susceptible to florfenicol and enrofloxacin, while isolates from post-weaning piglets were more susceptible to cephalexin and colistin. This is the first study on antimicrobial resistance of pathogen intestinal *E. coli* isolates in piglets from small farms in the Republic of Croatia.

**Key words:** *Escherichia coli*; antimicrobial resistance; piglets