



**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

**Rol dels agents infecciosos en el desenvolupament  
de la diarrea postdeslletament en el porc:  
aprofundint en la caracterització de soques  
entèriques d' *Escherichia coli* i el seu perfil de  
resistències antimicrobianes de rellevància  
sanitària**

**Biel Garcias Puigserver**

**Tesi doctoral**

**2024**



**Rol dels agents infecciosos en el desenvolupament de la diarrea postdeslletament en el porc: aprofundint en la caracterització de soques entèriques d' *Escherichia coli* i el seu perfil de resistències antimicrobianes de rellevància sanitària**

Tesi doctoral presentada per **Biel Garcias Puigserver** per accedir al grau de Doctor en Veterinària dins del programa de Doctorat en Medicina i Sanitat Animals de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, sota la direcció de la Dra. Laila Darwich Soliva i la Dra. Margarita Martín Castillo.

Bellaterra, 2024.



FACULTAT DE VETERINÀRIA

Les Dres. **Laila Darwich Soliva i Margarita Martín Castillo**, catedràtiques del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària

**Fan constar:**

Que la memòria titulada: **“Rol dels agents infecciosos en el desenvolupament de la diarrea postdeslletament en el porc: aprofundint en la caracterització de soques entèriques d' Escherichia coli i el seu perfil de resistències antimicrobianes de rellevància sanitària”**, presentada per **Biel Garcias Puigserver** per a l'obtenció del grau de Doctor en Veterinària, s'ha realitzat sota la nostra direcció en el programa de Medicina i Sanitat Animals, del Departament de Sanitat i Anatomia Animals, opció Sanitat Animal.

I perquè consti als efectes oportuns, signem la present declaració a Bellaterra, 9 de setembre de 2024:

Dra. Laila Darwich

Dra. Margarita Martín

Biel Garcias

Directora

Directora

Doctorand

El contracte d'investigador predoctoral de Biel Garcias Puigserver ha estat finançat amb l'ajut FI-SDUR del Departament d'Universitats i Recerca de la Generalitat de Catalunya durant 3 anys i per la Universitat Autònoma de Barcelona durant 1 any.

Part d'aquesta tesi ha estat finançada parcialment pel projecte RTI2018-095586-B-C22.

La impressió d'aquesta tesi ha estat finançada pel Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals.

Disseny de la portada: Bàrbara Francisca Mas Salom, Isabel Puigserver Fullana i Francesca Garcias Pugiserver.



# TAULA DE CONTINGUTS

LLISTAT D'ACRÒNIMS .....	ix
RESUM .....	xi
ABSTRACT .....	xv
RESUMEN .....	xix
<b>PART I: INTRODUCCIÓ GENERAL</b>	
<b>1. Diarrea en l'espècie porcina .....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Context.....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Definició i classificació .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3. Etiologia multifactorial de la diarrea .....</b>	<b>6</b>
<b>1.3.1 Causes víriques .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.2 Causes bacterianes .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.3 Causes parasitàries.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.4 Causes no infeccioses.....</b>	<b>22</b>
<b>2. <i>Escherichia coli</i> en l'espècie porcina .....</b>	<b>23</b>
<b>2.1 Classificació de les soques d' <i>E. coli</i> .....</b>	<b>23</b>
<b>2.2 Patotips d'<i>E. coli</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.1 <i>E. coli</i> enterotoxigènics (ETEC).....</b>	<b>25</b>
<b>2.2.2 <i>E. coli</i> enteropatògens (EPEC).....</b>	<b>27</b>
<b>2.2.3 <i>E. coli</i> verotoxigènic (VTEC o STEC) .....</b>	<b>28</b>
<b>2.2.4 <i>E. coli</i> enterohemorràgic (EHEC).....</b>	<b>29</b>
<b>2.2.5 <i>E. coli</i> patògen extraintestinal (ExPEC).....</b>	<b>29</b>
<b>3. Context i prevenció de les diarrees.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Mesures de prevenció de les diarrees en garrins.....</b>	<b>31</b>
<b>4. Resistència als antimicrobians.....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Importància general .....</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Mecanismes de resistència.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4 Relació entre les resistències antimicrobianes als hospitals i a la ramaderia.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 Relació de les resistències als antibiòtics i l'ús dels metalls pesants.....</b>	<b>42</b>
<b>4.6 Famílies d'antimicrobians de rellevància per a la salut pública .....</b>	<b>44</b>
<b>4.6.1 Gens de resistència als beta-lactàmics .....</b>	<b>45</b>
<b>4.6.2 Gens de resistència a la colistina .....</b>	<b>47</b>
<b>5. Eines per a la caracterització de la susceptibilitat antimicrobiana.....</b>	<b>49</b>
<b>5.1 Caracterització fenotípica de la resistència antimicrobiana .....</b>	<b>49</b>



<b>5.2 Caracterització genotípica de la resistència antimicrobiana</b> .....	49
<b>5.2.1 PCR</b> .....	50
<b>5.2.2 Seqüenciació de genoma complet</b> .....	51
<b>6. Bibliografia</b> .....	54

## **PART II: OBJECTIUS**

<b>OBJECTIUS</b> .....	97
------------------------	----

## **PART III: ESTUDIS**

<b>ESTUDI 1:</b> Differences in enteric pathogens and intestinal microbiota between diarrheic weaned piglets and healthy penmates .....	101
<b>ESTUDI 2:</b> Characterization of Antimicrobial Resistance in <i>Escherichia coli</i> Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia .....	111
<b>ESTUDI 3:</b> Characterisation of Antibiotic Determinants and Heavy Metal Resistance Genes in <i>Escherichia coli</i> from Pigs in Catalonia .....	125
<b>ESTUDI 4:</b> Global Variation in <i>Escherichia coli mcr-1</i> Genes and Plasmids from Animal and Human Genomes Following Colistin Usage Restrictions in Livestock.....	155

## **PART IV: DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS**

<b>DISCUSSIÓ GENERAL</b> .....	171
<b>BIBLIOGRAFIA DISCUSSIÓ</b> .....	182
<b>CONCLUSIONS (anglès)</b> .....	189
<b>CONCLUSIONS (català)</b> .....	191

## **APÈNDIX**

<b>PUBLICACIONS</b> .....	195
---------------------------	-----

## LLISTAT D'ACRÒNIMS

- ABC: Capacitat d'unió a l'àcid ("Acid Binding Capacity" en anglès)
- AEM: Agència Europea del Medicament
- ARG: Gens de resistència als antibiòtics ("Antimicrobial Resistance Genes" en anglès)
- BLAST: Eina de cerca basada en una alineament local bàsic ("Basic Local Alignment Search Tool" en anglès)
- BLEE: Beta-Lactamasa d'Espectre Estès
- CC: Complexe Clonal
- CMI: Concentració Míxima Inhibitòria
- CpA: *Clostridium perfringens* tipus A
- CpC: *Clostridium perfringens* tipus C
- ED: Malaltia dels edemes ("Edema Disease" en anglès)
- EHEC: *Escherichia coli* EnteroHemorràgic
- EPEC: *Escherichia coli* EnteroPatogènic
- ETEC: *Escherichia coli* EnteroToxigènic
- ExPEC: *Escherichia coli* Patogènic Extraintestinal
- FOS: FosfoOligoSacàrids
- GOS: GalactoOligoSacàrids
- LPS: LipoPoliSacàrids
- MDR: Multirresistent ("MultiDrug Resistance" en anglès)
- PCR: Reacció en Cadena de la Polimerasa
- PDCoV: Deltacoronavirus porcí ("Porcine DeltaCoronaVirus" en anglès)
- PDR: Panresistent ("PanDrug Resistance" en anglès)
- PEAV: AlfaCoronavirus entèric porcí ("Porcine Enteric AlphacoronaVirus" en anglès)
- PEDV: Virus de la diarrea epidèmica porcina ("Porcine Epidemic Diarrhea Virus" en anglès)
- PRCV: Coronavirus respiratori porcí ("Porcine Respiratory CoronaVirus" en anglès)
- PRRSV: Virus de la síndrome reproductiva i respiratòria porcina ("Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus" en anglès)
- PWD: diarrea al postdeslletament ("PostWeaning Diarrhea" en anglès)
- RAM: Resistència als AntiMicrobians
- RVA: RotaVirus A
- RVB: RotaVirus B
- RVC: RotaVirus C

SADS-CoV: Coronavirus de la síndrome de diarrea aguda suïda (“Swine Acute Diarrheic Syndrome Coronavirus” en anglès)

SeACoV: Alfacoronavirus entèric suïd (“Swine enteric AlphaCoronaVirus” en anglès)

SeCoV: Coronavirus entèric suïd (“Swine enteric CoronaVirus”, en anglès)

ST: SeqüencioTip

STEC: *Escherichia coli* ShigaToxigènic

TGEV: Virus de la GastroEnteritis Transmissible (“Transmissible GastroEnteritis Virus”, en anglès)

VPPA: Virus de la Peste Porcina Africana

VPPC: Virus de la Peste Porcina Clàssica

VTEC: *Escherichia coli* VeroToxigènic

WGS: Seqüenciació de genoma complet (“Whole Genome Sequencing” en anglès)

XDR: Resistència estesa (“eXtended Drug Resistance” en anglès)

## RESUM

La diarrea al postdeslletament és una problemàtica molt freqüent en la indústria porcina, generant un gran impacte tant sanitari com econòmic. La seva etiologia multifactorial fa que el seu control sigui complicat. A part, tot i que les condicions de cria i la genètica dels animals han canviat molt a les darreres dècades, els patògens i factors de virulència presents en els panells de diagnòstic rutinari segueixen essent els mateixos. Per altra banda, el curs agut de la malaltia fa necessari realitzar un tractament empíric ràpid i, moltes vegades, es tracta com si fos un problema bacterià, la qual cosa provoca un elevat ús d'antibiòtics. Així, els objectius principals d'aquesta tesi van ser clarificar el paper dels principals agents infecciosos en la diarrea a les transicions i analitzar l'estat de les resistències als antimicrobians utilitzant les soques d' *Escherichia coli* aïllades com a marcador.

D'aquesta manera, l'objectiu de l'Estudi 1 va ser analitzar les diferències entre animals del mateix corral amb diarrea (n=152) i sense diarrea (n=125) pel que feia a la prevalença de patògens entèrics i la microbiota associada. Pel que fa als patògens, es va concloure que el principal agent associat a la presència de diarrea era el Rotavirus A (RVA), aïllat significativament més freqüent en animals diarreics i amb càrregues virals altes en més de la meitat dels animals malalts. La gran majoria dels factors de virulència clàssics d' *E. coli* no es trobaven associats amb la presentació de malaltia, doncs eren aïllats en la mateixa proporció tant en animals malalts com sans. Per altra banda, la presència de *Clostridioides difficile* i del virus de la diarrea epidèmica porcina va ser pràcticament negligible. Pel que fa als canvis de la microbiota, es va observar una gran variabilitat entre individus i granges però amb determinats canvis significatius. El filum Fusobacteriota es va associar com a factor relacionat amb la presentació de diarrea, en canvi la presència de la família *Ruminococcaceae* va resultar ser protector al trobar-se incrementada en els animals sans. També es va observar que durant la primera setmana al postdeslletament els taxons *Enterobacteriaceae* i *Campilobacteria* s'associaven amb la presència de diarrea. Finalment, donat la seva consideració com a patògen principal, es va estudiar la microbiota associada amb les infeccions per RVA, observant-se l'efecte protector del gènere *Lactobacillus*, la qual cosa podria suposar una possible nova mesura de control de la infecció.

L'altra gran objectiu de la present tesi era analitzar els nivells de resistència als antibiòtics en aquesta fase del cicle productiu. Per fer això, es van utilitzar les soques d' *E. coli* com

a marcadors donada la seva ubiqüitat. Així, en el segon estudi es va procedir a la caracterització fenotípica dels perfils de sensibilitat de 251 soques aïllades de porcs a les transicions, incloent mostres d'animals diarreics (n=148) i sans (n=101). El 41.4 % de les soques presentaven un fenotip de multi-resistència (MDR, resistents a tres o més famílies d'antibiòtics), la qual cosa permet afirmar que els nivells eren elevats. Més de la meitat de soques presentaven resistència a antibiòtics de les categories D i C, però també a altres famílies de categoria B com ara a les quinolones (56.7%) i a la colistina (15%) que, si tenim en compte la seva restricció, presentaven nivells elevats de resistència. Un resultat destacat d'aquest estudi va ser observar que els animals malalts eren portadors d'una major proporció de soques MDR que els sans (49.3% vs. 35%, p=0.03), la qual cosa indicaria que els tractaments antimicrobians no serien l'opció més eficient pel tractament de les diarrees i caldria buscar alternatives basades en la prevenció i la millora del benestar dels animals.

Després de la caracterització fenotípica, el següent pas per entendre millor aquestes resistències va ser la caracterització genotípica. Així, en el tercer estudi, es van estudiar, mitjançant la seqüenciació de genoma complet, 112 soques d'*E. coli* aïllats de porcs a Catalunya. L'objectiu d'aquest treball, va ser detectar els gens que confereixen resistència als antibiòtics, i estudiar la co-localització en el mateix plasmidi dels gens de tolerància als metalls pesants i els gens de resistència als antibiòtics (ARG). Els gens més comuns van ser aquells que conferien resistència als macròlids, aminoglicòsids i betalactàmics, però també es van detectar gens de resistència d'importància per a la salut pública com ara a les beta-lactamases d'espectre estès (BLEE) o a la colistina. Tot i així, gens de resistència als carbapenems, detectats en soques aïllades d'animals de producció en altres indrets del món, no es van detectar en el nostre estudi. Els gens de tolerància als metalls pesants també eren molt freqüents, però, a diferència dels ARG que es trobaven majoritàriament en plasmidis, estaven localitzats pràcticament només en els cromosomes. La co-localització en el mateix plasmidi d'ambdós compostos va ser molt infreqüent i, en aquells casos on es trobava, els gens implicats van ser aquells que conferien tolerància al mercuri (un contaminant ambiental no utilitzat en la indústria porcina). Així, el mecanisme pel qual els metalls utilitzats com el zinc o el coure augmenten la resistència als antibiòtics no seria la co-localització en el mateix plasmidi, com s'havia suposat fins ara i caldria seguir investigant per entendre-ho. Finalment, es va trobar que el gen de resistència a la colistina *mcr-4* es trobava únicament localitzat en el plasmidi ColE10, la

qual cosa obriria una nova porta pel seu control utilitzant el plasmidi com a diana terapèutica.

En el tercer estudi, un dels resultats que més ens va sorprendre va ser observar, en una mostra baixa de soques (n=5), que el gen de la colistina *mcr-1* es trobava en un 40% dels casos localitzat en el cromosoma. Tot i que la mida de la mostra no va permetre extreure conclusions, va donar lloc a la realització del quart estudi d'aquesta tesi, dirigit a analitzar si aquesta troballa era casual o no. Per aquest propòsit, a partir de la base de dades "NCBI Pathogen Detection" es van recopilar 3163 genomes de persones, vedells, porcs i pollastres, que contenien el gen *mcr-1*. La mostra era majoritàriament d'Àsia i Europa i amb una proporció similar d'abans i després de la prohibició de la colistina. Així, els objectius d'aquest treball, a part de comprovar si la localització de *mcr-1* havia passat a ser cromosòmica, van ser comparar el context genòmic del gen arreu del món i veure com s'havia adaptat a la prohibició de l'ús de colistina. Vam observar que el gen es trobava majoritàriament en els plasmidis (93.5%), pel que indicaria que el resultat de l'estudi 3 seria una troballa casual. Els tres plasmidis més freqüents van ser IncI2, IncX4 i IncHI2. Existien diferències entre ells perquè els dos primers es trobaven especialitzats en portar el gen *mcr-1*, mentre que IncHI2 era un plasmidi de MDR. També es van trobar diferències entre les dues regions estudiades, ja que IncI2 era predominant a Àsia i IncX4 a Europa. Les variants de la regió promotora del gen associades amb una reducció dels costos de *fitness* i el de la seqüència d'inserció *ISAp11* van mostrar patrons d'associació específics que semblen relacionats amb l'adaptació a les restriccions en l'ús de la colistina, amb diferències significatives entre continents. Després de la prohibició de la colistina a Europa, es va observar una transició cap a plasmidis especialitzats que porten el gen *mcr-1*, com els plasmidis IncX4, que han substituït el plasmidi MDR IncHI2. En canvi, a Àsia, s'ha produït una disminució de la presència d'*ISAp11*, probablement a causa de canvis en la distribució de variants promotores específiques. Aquests resultats reflecteixen l'evolució adaptativa de *mcr-1* posterior a les restriccions en l'ús de la colistina i posen de manifest la importància de desenvolupar estratègies regionals específiques per a combatre la resistència als antimicrobians.

En conclusió, els resultats d'aquesta tesi mostren que el principal patogen implicat en la diarrea al postdeslletament a Catalunya és el RVA i que els nivells de resistència als antimicrobians són elevats en aquest moment productiu. També s'ha observat que la localització en el mateix plasmidi d'ARG i gens de tolerància als metalls pesants és molt

poc freqüent i no sembla la causa de la co-selecció de resistències. Finalment, s'ha vist que el gen *mcr-1* s'ha adaptat a la restricció d'ús de la colistina, però ho ha fet de distintes maneres arreu del món, la qual cosa posa de manifest la necessitat d'analitzar cada regió de forma independentment.

## ABSTRACT

Post-weaning diarrhea (PWD) is a widespread issue in the swine industry, significantly impacting both health and economic aspects. Its multifactorial etiology complicates control measures. Despite advances in breeding conditions and animal genetics over the past few decades, diagnostic panels still target the same pathogens and virulence factors. Additionally, the acute nature of the disease often necessitates empirical treatment, frequently assuming a bacterial origin, which leads to high antibiotic usage. Therefore, the main objectives of this thesis were to clarify the role of key infectious agents in transition period diarrhea and analyze antimicrobial resistance levels using isolated *Escherichia coli* strains as a marker.

The objective of Study 1 was to analyze differences between diarrheic and healthy animals in terms of enteric pathogen prevalence and associated microbiota. A total of 277 fecal samples were collected (152 from diarrheic animals and 125 from healthy penmates). The study concluded that the primary pathogen was Rotavirus A (RVA), significantly more frequent in diarrheic pigs and present in over half of these animals with high viral loads. Most classical *E. coli* virulence factors were not associated with disease presentation, indicating that this information may need updating. Furthermore, the presence of *Clostridioides difficile* and porcine epidemic diarrhea virus was negligible. Regarding microbiota changes, there was significant variability between individuals and farms, but several changes were noteworthy. The phylum Fusobacteriota was linked to disease presentation, while the family *Ruminococcaceae* was increased in healthy animals. Additionally, during the first week post-weaning, *Enterobacteriaceae* and *Campylobacteria* taxa were associated with diarrhea. Given RVA's status as a major pathogen, the microbiota associated with RVA infections was further studied, revealing a protective effect of the *Lactobacillus* genus, which could represent a potential new control measure for the infection.

Another major goal of this thesis was to analyze antibiotic resistance levels during this stage of the production cycle. To achieve this, *E. coli* strains were used as markers due to their ubiquity. In Study 2, the phenotypic characterization of antimicrobial susceptibility profiles of 251 strains isolated from pigs in transition was performed, including samples from diarrheic (n=148) and healthy animals (n=101). 41.4% of the strains showed a multidrug-resistant phenotype (resistant to three or more antibiotic families), indicating high resistance levels. More than half of the strains were resistant to antibiotics from



categories D and C, but other families, such as quinolones (56.7%), and, especially considering their restriction, colistin (15%) also showed high resistance levels. One notable finding from this study was that sick animals carried a higher proportion of multidrug-resistant strains than healthy ones (49.3% vs. 35%,  $p=0.03$ ), suggesting that antimicrobial treatments might not be the most efficient option for treating diarrhea and that alternatives focusing on prevention and animal welfare should be sought.

Following phenotypic characterization, the next step in understanding these resistances was genotypic characterization. In Study 3, 112 *E. coli* strains isolated from pigs in Catalonia were characterized through whole-genome sequencing. The aim was to detect antibiotic resistance genes (ARG) and investigate the co-localization of ARG and heavy metal tolerance genes on the same plasmid. The most common genes were those conferring resistance to macrolides, aminoglycosides, and beta-lactams, but genes of public health concern, such as extended-spectrum beta-lactamases and colistin resistance genes, were also detected. However, resistance families like carbapenemases, found in strains isolated from livestock in other parts of the world, were not detected in this study. Heavy metal tolerance genes were also prevalent, but unlike ARGs, which were mostly plasmid-borne, they were primarily located in chromosomes. The co-localization of both types of genes on the same plasmid was infrequent, and when it occurred, it involved genes conferring mercury tolerance (an environmental contaminant not used in the swine industry). Therefore, the mechanism by which metals like zinc or copper increase antibiotic resistance does not seem to be through co-localization on the same plasmid, as previously hypothesized, and further research is needed to understand this phenomenon. Finally, it was found that the *mcr-4* colistin resistance gene was only located on the ColE10 plasmid, which opens a new avenue for controlling it by targeting the plasmid therapeutically.

In Study 3, although with a small sample size ( $n=5$ ), it was observed that the *mcr-1* gene was located on the chromosome in 40% of cases, which was surprising. The sample size was too small to draw conclusions, so Study 4 was conducted to analyze whether this finding was coincidental.

A total of 3163 genomes from humans, calves, pigs, and chickens containing the *mcr-1* gene were collected from the "NCBI Pathogen Detection" database. The sample was mainly from Asia and Europe, with a similar proportion before and after colistin's ban. The goals of this study were to determine whether the *mcr-1* gene had shifted to being

chromosomal, to compare the global genomic context of the gene, and to examine how it had adapted to colistin's ban. The study found that the gene was predominantly plasmid-borne (93.5%), suggesting that the finding in Study 3 was coincidental. The three most frequent plasmids were IncI2, IncX4, and IncHI2. There were differences among them, with the first two specializing in carrying the *mcr-1* gene, while IncHI2 was a multidrug-resistant plasmid. The study also revealed two global scenarios: IncI2 was predominant in Asia, while IncX4 was the most common in Europe. Promoter region variants associated with reduced fitness costs and the insertion sequence *ISApII* showed specific association patterns that seemed related to adaptation to colistin use restrictions, with significant differences across continents. After colistin was banned in Europe, a shift toward specialized plasmids carrying the *mcr-1* gene, such as IncX4, which replaced the multidrug-resistant IncHI2 plasmid, was observed. In contrast, in Asia, there was a decrease in *ISApII* presence, likely due to changes in the distribution of specific promoter variants. These results reflect the adaptive evolution of *mcr-1* following colistin use restrictions and underscore the importance of developing region-specific strategies to combat antimicrobial resistance.

In conclusion, the findings of this thesis indicate that the primary pathogen implicated in post-weaning diarrhea in Catalonia is RVA, and antimicrobial resistance levels are high at this production stage. Additionally, co-localization of ARG and heavy metal tolerance genes on the same plasmid is rare and does not appear to be the cause of resistance co-selection. Finally, it has been observed that the *mcr-1* gene has adapted to colistin use restrictions, but it has done so in different ways around the world, highlighting the need for region-specific studies.



## RESUMEN

La diarrea postdestete es un problema muy común en la industria porcina, con un gran impacto tanto en la salud como en el aspecto económico. Su etiología multifactorial hace que su control sea complicado. A pesar de que las condiciones de crianza y la genética de los animales han cambiado considerablemente en las últimas décadas, los patógenos y factores de virulencia que se detectan en los paneles de diagnóstico siguen siendo los mismos. Además, el curso agudo de la enfermedad a menudo requiere un tratamiento empírico rápido y, muchas veces, se trata como si fuera un problema bacteriano, lo que provoca un elevado uso de antibióticos. Por lo tanto, los principales objetivos de esta tesis fueron aclarar el papel de los principales agentes infecciosos en la diarrea en la etapa de transición y analizar el estado de las resistencias a los antimicrobianos utilizando cepas de *Escherichia coli* aisladas como marcador.

El objetivo del Estudio 1 fue analizar las diferencias entre los animales con y sin diarrea en cuanto a la prevalencia de patógenos entéricos y la microbiota asociada. Se recogieron 277 muestras fecales (152 de animales con diarrea y 125 de compañeros de corral sanos). En cuanto a los patógenos, se concluyó que el principal patógeno era el Rotavirus A (RVA), ya que se encontraba de forma significativa más frecuentemente en animales con diarrea y en más de la mitad de estos animales con cargas virales altas. La gran mayoría de los factores de virulencia clásicos de *E. coli* no se asociaron con la presentación de la enfermedad, por lo que esta información debería actualizarse. Por otro lado, la presencia de *Clostridioides difficile* y del virus de la diarrea epidémica porcina fue prácticamente negligible. En cuanto a los cambios en la microbiota, se observó una gran variabilidad entre individuos y granjas, aunque varios cambios resultaron significativos. El filo Fusobacteriota se asoció con la presentación de la enfermedad, mientras que la familia *Ruminococcaceae* estaba incrementada en los animales sanos. También se observó que durante la primera semana post-destete, los taxones *Enterobacteriaceae* y *Camplobacteria* se asociaban con la presencia de diarrea. Finalmente, dado su estatus como patógeno principal, se estudió la microbiota asociada con las infecciones por RVA, observándose el efecto protector del género *Lactobacillus*, lo que podría representar una posible nueva medida de control de la infección.

Otro gran objetivo de esta tesis fue analizar los niveles de resistencia a los antibióticos en esta fase del ciclo productivo. Para ello, se utilizaron las cepas de *E. coli* como marcadores debido a su ubicuidad. En el Estudio 2, se procedió a la caracterización fenotípica de los perfiles de sensibilidad de 251 cepas aisladas de cerdos en la etapa de transición, incluyendo muestras de animales diarreicos (n=148) y sanos (n=101). El 41.4% de las cepas mostraron un fenotipo de multiresistencia (resistentes a tres o más familias de antibióticos), lo que indica niveles elevados de resistencia. Más de la mitad de las cepas eran resistentes a antibióticos de las categorías D y C, pero también a otras familias como las quinolonas (56.7%) y, especialmente teniendo en cuenta su restricción, a la colistina (15%), que mostraron niveles elevados de resistencia. Un resultado destacado de este estudio fue observar que los animales enfermos eran portadores de cepas multiresistentes en mayor proporción que los sanos (49.3% vs. 35%,  $p=0.03$ ), lo que indicaría que los tratamientos antimicrobianos podrían no ser la opción más eficiente para el tratamiento de las diarreas y que sería necesario buscar alternativas basadas en la prevención y en la mejora del bienestar de los animales.

Tras la caracterización fenotípica, el siguiente paso para comprender mejor estas resistencias fue la caracterización genotípica. En el Estudio 3, se caracterizaron, mediante secuenciación de genoma completo, 112 cepas de *E. coli* aisladas de cerdos en Cataluña. El objetivo de este trabajo fue detectar los genes que confieren resistencia a los antibióticos y estudiar la co-localización en el mismo plásmido de los genes de tolerancia a metales pesados y los genes de resistencia a los antibióticos (ARG). Los genes más comunes fueron aquellos que conferían resistencia a macrólidos, aminoglucósidos y beta-lactámicos, pero también se detectaron genes de resistencia de importancia para la salud pública, como las beta-lactamasas de espectro extendido o la colistina. Sin embargo, otras familias detectadas en cepas aisladas de animales en otras partes del mundo, como las carbapenemasas, no fueron encontradas en las cepas de nuestro estudio. Los genes de tolerancia a metales pesados también eran muy frecuentes, pero, a diferencia de los ARG, que se encontraban mayoritariamente en plásmidos, estaban localizados prácticamente solo en los cromosomas. La colocación en el mismo plásmido de ambos tipos de genes fue muy infrecuente y, en los casos donde se encontraba, los genes implicados eran aquellos que conferían tolerancia al mercurio (un contaminante ambiental no utilizado en la industria porcina). Por lo tanto, el mecanismo por el cual metales como el zinc o el cobre aumentan la resistencia a los antibióticos no parece ser la colocación en el

mismo plásmido, como se había supuesto hasta ahora, y se requiere seguir investigando para entenderlo. Finalmente, se encontró que el gen de resistencia a la colistina *mcr-4* se encontraba únicamente en el plásmido ColE10, lo que abriría una nueva puerta para su control utilizando el plásmido como diana terapéutica.

En el Estudio 4, aunque con una muestra pequeña (n=5), se observó que el gen *mcr-1* se encontraba en un 40% localizado en el cromosoma, lo que fue sorprendente. El tamaño de la muestra no permitió extraer conclusiones, por lo que se realizó el Estudio 4 para analizar si este hallazgo era casual o no.

Se recopilaron, a partir de la base de datos "NCBI Pathogen Detection", 3163 genomas de humanos, terneros, cerdos y pollos que contenían el gen *mcr-1*. La muestra era mayoritariamente de Asia y Europa, con una proporción similar antes y después de la prohibición de la colistina. Los objetivos de este trabajo, además de comprobar si la localización de *mcr-1* había pasado a ser cromosómica, fueron comparar el contexto genómico del gen en todo el mundo y ver cómo se había adaptado a la prohibición del uso de colistina. Se observó que el gen se encontraba predominantemente en plásmidos (93.5%), lo que indicaría que el resultado del Estudio 3 fue un hallazgo casual. Los tres plásmidos más frecuentes fueron IncI2, IncX4 y IncHI2. Existían diferencias entre ellos, ya que los dos primeros se especializaban en portar el gen *mcr-1*, mientras que IncHI2 era un plásmido de multiresistencia. También se encontraron dos situaciones globales: IncI2 era predominante en Asia y IncX4 era el más común en Europa. Las variantes de la región promotora del gen asociadas con una reducción de los costos de adaptación y la secuencia de inserción *ISAp11* mostraron patrones de asociación específicos que parecen estar relacionados con la adaptación a las restricciones en el uso de colistina, con diferencias significativas entre continentes. Después de la prohibición de colistina en Europa, se observó una transición hacia plásmidos especializados que portan el gen *mcr-1*, como los plásmidos IncX4, que han reemplazado al plásmido multiresistente IncHI2. En cambio, en Asia, se ha producido una disminución de la presencia de *ISAp11*, probablemente debido a cambios en la distribución de variantes promotoras específicas. Estos resultados reflejan la evolución adaptativa del *mcr-1* tras las restricciones en el uso de colistina y subrayan la importancia de desarrollar estrategias regionales específicas para combatir la resistencia a los antimicrobianos.

En conclusión, los resultados de esta tesis muestran que el principal patógeno implicado en la diarrea postdestete en Cataluña es el RVA y que los niveles de resistencia a los

antimicrobianos son elevados en esta etapa productiva. También se ha observado que la colocalización en el mismo plásmido de ARG y genes de tolerancia a metales pesados es infrecuente y no parece ser la causa de la coselección de resistencias. Finalmente, se ha visto que el gen *mcr-1* se ha adaptado a las restricciones del uso de colistina, pero lo ha hecho de distintas maneras alrededor del mundo, lo que pone de manifiesto la necesidad de estudiar cada región de forma independiente.

# **PART I: INTRODUCCIÓ GENERAL**





# INTRODUCCIÓ

## 1. Diarrea en l'espècie porcina

### 1.1 Context

La ramaderia porcina sempre ha tengut un pes important a Catalunya i a gran part de l'Estat Espanyol. En les darreres dècades s'ha produït un canvi de model de producció, passant d'un gran nombre de petites explotacions de cicle tancat poc tecnificades i amb producció mixta amb altres espècies, a un cens de grans explotacions especialitzades només en porcs i molt tecnificades on, moltes vegades, les diferents fases de producció estan separades.

Aquest canvi, juntament amb la millora de la genètica, la introducció de truges hiperprolífiques i a la millora dels coneixements de nutrició, ha fet que el nombre de garrins per truja s'hagi incrementat significativament aquests darrers anys. Per contra, que neixin més animals per truja ha comportat animals més petits i amb menys vitalitat. A més, el fet de tenir més garrins fa que la competència pel calostre sigui més gran i que els animals més petits tinguin menys accés a ell. Aquesta confluència de circumstàncies fa que aquests animals més petits i debilitats siguin més propensos a patir infeccions i, en aquest punt de la vida dels animals, els problemes entèrics són els més habituals, donant lloc a una entitat pròpia de diarrea coneguda com la diarrea neonatal.

Per tenir un ritme de producció més alt, els animals es deslleten de manera sobtada a les 3-4 setmanes de vida, essent molt diferent de les condicions naturals on els garrins se separen de manera gradual de la mare aproximadament entre les 10-12 setmanes de vida, que és quan l'epiteli intestinal i el sistema immunitari han assolit la seva maduració (Moeser et al., 2017). Aquest procés abrupte provoca als animals una situació d'estrès molt gran, que s'ha comprovat pels alts nivells de cortisol que desenvolupen en aquesta etapa (Moeser et al., 2007). Això es tradueix en una anorèxia postdeslletament, que pot durar 24-48 hores, que acaba portant a una inflamació local intestinal i a l'aparició de diarrea (Thomson i Friendship, 2019). A més, el fet de passar d'una dieta líquida a una sòlida provoca una pèrdua de les microvellositats intestinals (van Beers-Schreurs et al., 1998) i tot i encara no estar caracteritzat del tot, un canvi sobtat de la microbiota intestinal (Gresse et al., 2017). Finalment, l'estrès d'aquest moment de la vida del garrí també genera una immunosupressió que fa que els animals siguin més susceptibles a una llarga llista de patògens intestinals (Moeser et al., 2017). Tot aquest còctel fa que el deslletament

sigui el punt a on més problemes entèrics apareguin, donant lloc a una altra entitat pròpia: la diarrea a l'etapa de transició cap a l'engreix.

En aquestes dues etapes (neonatal i transició), els animals es troben en un moment molt delicat en el que l'aparició de diarrea produeix mortalitats molt elevades, generant importants pèrdues econòmiques al sector (Sjölund et al., 2014). Això fa que el tractament sigui urgent, però moltes vegades, a causa de la seva naturalesa multifactorial, no s'arriba a establir l'etiologia principal del brot i, generalment, s'acaba enfocant i tractant com si fos només un problema bacterià. Això fa que l'ús d'antibiòtics en aquestes edats sigui molt elevat (Lekagul et al., 2019), la qual cosa es tradueix en nivells alts de resistència als antibiòtics (Aguirre et al., 2020; Kyung-hyo et al., 2020; Vidal et al., 2020).

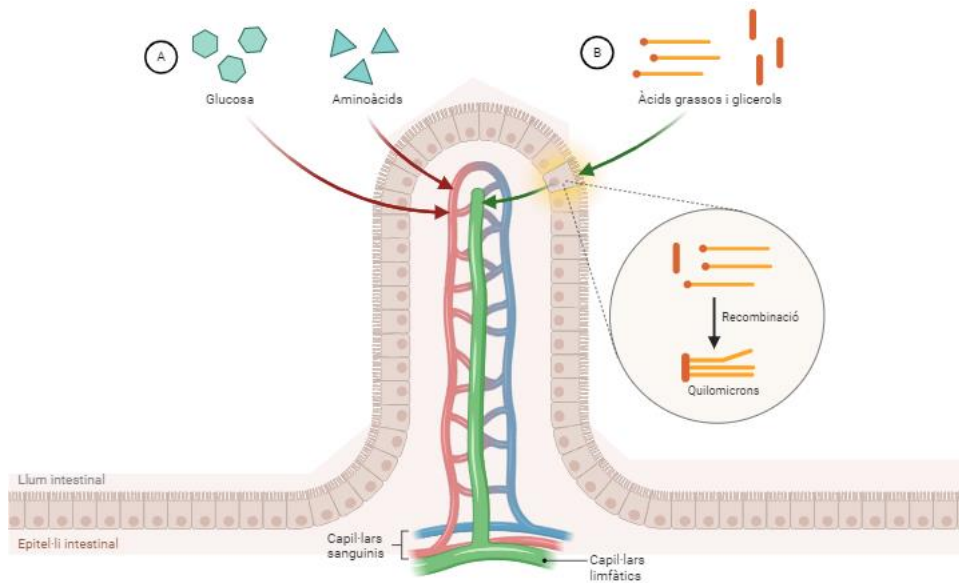
També s'han utilitzat durant molts anys compostos com l'òxid de zinc que són molt efectius prevenint la diarrea donat el seu efecte antiinflamatori, promotor de la ingesta i antibacterià (Rhouma et al., 2017). Ara bé, la seva baixa biodisponibilitat fa que se n'excreti una gran quantitat a l'ambient amb els purins i acaben contaminant els sòls i les aigües freàtiques (Daraei et al., 2024).

Així, la diarrea porcina no és només un problema per a la indústria porcina, sinó que s'ha convertit també en un problema de salut pública i salut mediambiental. Si afegim a més les noves normatives que han limitat l'ús d'antibiòtics i prohibit l'òxid de zinc, el control d'aquesta malaltia amb les eines convencionals d'abans ja no és possible. En definitiva, necessitem avançar en el coneixement de les diarrees en garrins lactants i de transició per tal de desenvolupar estratègies de diagnòstic i control adequades al nou context actual.

## **1.2 Definició i classificació**

La digestió (o païment) és el procés pel qual els aliments es converteixen en nutrients, que acaben essent absorbits (Thompson i Friendship, 2019). Consta de quatre fases:

- Ingesta: procés pel qual els aliments entren al tracte digestiu a través de la boca.
- Digestió: les partícules dels aliments s'han de reduir per tal de poder ser absorbides. Pot ser tant mecànica com és la masticació, o química on les sals biliars o el pH àcid estomacal degraden les molècules.
- Absorció: una vegada degradades, els nutrients passen per osmosi cap als capil·lars sanguinis i limfàtics del sistema gastrointestinal (Figura 1). La majoria de processos diarreics solen originar-se per problemes en aquesta fase.
- Excreció: aquelles molècules que no han estat absorbides són defecades.



**Figura 1:** Representació de l'absorció de nutrients a nivell intestinal. La glucosa i els aminoàcids difonen des de la llum intestinal cap als capil·lars sanguinis, mentre que els àcids grassos i els glicerols entren als enteròcits, on són convertits en quilomicrons que difonen cap als capil·lar limfàtics. A major superfície d'absorció, major quantitat de nutrients passen al torrent sanguini i limfàtic. Figura creada amb Biorender, modificada de la il·lustració de Jenna Lim.

La diarrea es caracteritza per un excés d'aigua a les femtes en comparació amb la matèria seca, fruit del desequilibri entre les fases d'absorció i excreció. Aquesta pèrdua de líquids i soluts pot causar un desequilibri electrolític i àcid-base significatiu, així com deshidratació, i pot arribar a ser mortal si no es tracta adequadament (Thompson i Friendship, 2019).

La diarrea pot originar-se tant a l'intestí prim com al gruixut. Segons la classificació de Thomson i Friendship, (2019), la diarrea es pot classificar en diferents tipus:

- Diarrea secretora: Es produeix quan hi ha una sortida excessiva de fluids cap a la llum intestinal que supera la seva reabsorció a l'intestí, sovint a causa d'una alteració en els mecanismes de secreció i absorció de l'epiteli intestinal. Per exemple, les soques d'*Escherichia coli* (*E. coli*) enterotoxigèniques (ETEC) alliberen toxines (LT i ST) que augmenten la secreció de ió clor a la llum intestinal acompanyat de H<sub>2</sub>O.
- Diarrea per malabsorció: És conseqüència de l'atròfia de les vellositats intestinals, que impedeix l'absorció adequada del contingut intestinal i provoca el pas de líquid cap al lumen per osmosi. Un exemple és la diarrea causada per rotavirus, que es multiplica en els enteròcits i escurça els *villi* intestinals.

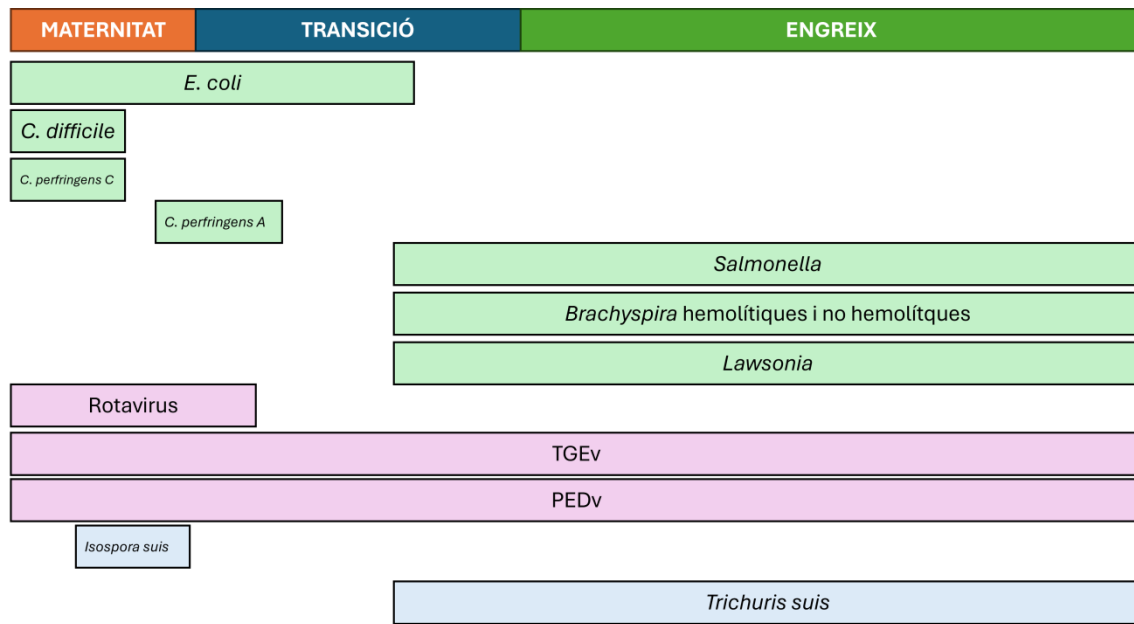
- Diarrea inflamatòria: Alguns patògens poden inflamar l'epiteli intestinal, disminuint la seva capacitat d'absorbir nutrients i augmentant el contingut del lumen. Això genera una pressió osmòtica que facilita el pas d'aigua a les femtes. Un cas típic és la diarrea produïda per *Salmonella* spp
- Diarrea per augment de la permeabilitat de la mucosa: La pressió hidrostàtica elevada o la pèrdua de pressió oncòtica als *villi*, permet que el fluid intersticial i les macromolècules passin a la llum intestinal. Per exemple, la diarrea associada a hipoalbuminèmia.

És important destacar que aquests tipus de diarrea no són excloents i poden ocórrer simultàniament.

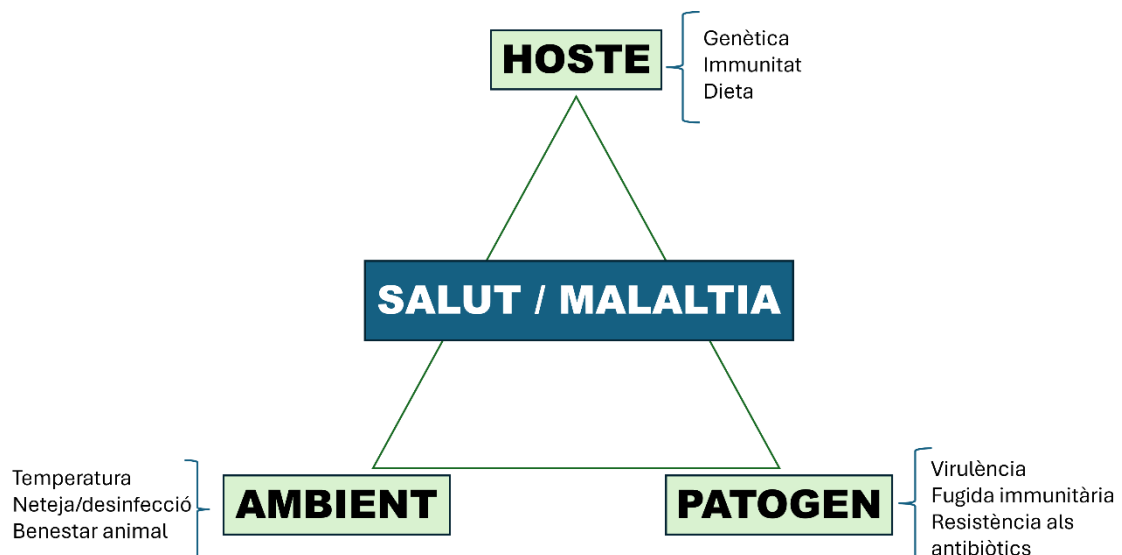
### **1.3. Etiologia multifactorial de la diarrea**

Una de les majors problemàtiques de la diarrea és que la seva etiologia pot ser múltiple ja que diversos agents bacterians, vírics o, fins i tot, parasitaris poden originar un quadre diarreic, i es poden presentar de manera concomitant. Cada patogen es pot presentar en moments diferents, però també es poden superposar i causar co-infeccions (Taula 1). A part, la diarrea també pot ser deguda a causes no infeccioses, ja no només com a causa directa, sinó com a agreujant/perpetuador de problemes infecciosos. Així, poden produir diarrea, entre d'altres factors, l'anorèxia perllongada postdeslletament que produeix una inflamació intestinal, l'acció immunosupressora de l'estrès associada, per exemple, a una temperatura ambiental massa baixa, la falta d'immunitat deguda a una mala presa de calostre, unes deficientes condicions de neteja i desinfecció que fan que la concentració d'agents infecciosos sigui més alta, o un deslletament d'animals insuficientment madurs i no preparats per sobreviure. Tot i no ser la causa en si mateixa de la diarrea, aquestes circumstàncies poden ser el desencadenant de processos infecciosos.

**Taula 1:** Edats dels porcs on es pot trobar cada patogen. Modificada de Thompson i Friendship (2019).



Això ve donat perquè la presentació de la malaltia infecciosa és resultat de l'equilibri entre els factors associats amb l'hoste, el patogen en si i l'ambient (Figura 2). En el cas de la medicina de poblacions, centrar-se en el patogen pot funcionar a curt termini, però a mig termini el problema no quedarà resolt i tornarà a aparèixer.



**Figura 2.** Equilibri entre l'hoste, el patogen i l'ambient per tal que es presenti la malaltia.

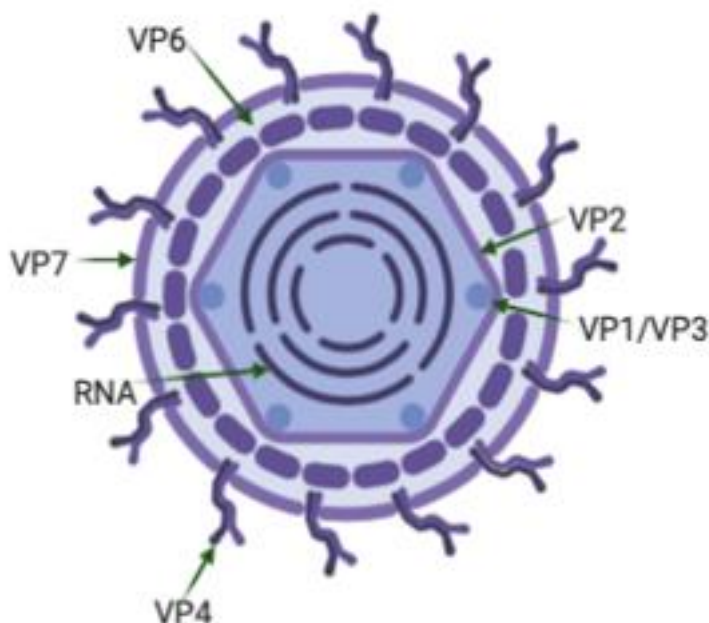
### 1.3.1 Causes víriques

Agents com els rotavirus o els coronavirus s'han trobat en animals de diverses espècies i de totes les edats, però generen quadres més greus en els individus més joves. La millora en les tècniques de seqüenciament genètic, ha possibilitat la detecció de molts nous virus,

el conjunt dels quals es denomina viroma (Cao et al., 2022). No obstant això, la seva relació amb la diarrea encara no està clara i es necessita més recerca per aclarir el seu rol. Així, aquí ens centrarem en els agents més típics descrits com a patògens entèrics.

### 1.3.1.1 Rotavirus

Els rotavirus són virus de RNA bicatenaris que pertanyen a la família *Sedoreoviridae*. El seu genoma està format per 11 segments que codifiquen per sis proteïnes estructurals (VP1, VP2, VP3, VP4, VP6 i VP7) i cinc no estructurals (NSP1, NSP2, NSP3, NSP4 i NSP5/6) (Figura 3). Destaquen sobretot la VP4 i la VP7, perquè són les responsables de la producció d'anticossos per part de l'hoste, mentre que la NSP4 juga un paper en la presentació de diarrea per l'activació dels canals de clor, que provoca la sortida de líquid al lumen intestinal (Willey et al., 2009).



**Figura 3:** Esquema de l'estructura dels Rotavirus, assenyalant la posició de les 6 proteïnes estructurals, VP1-VP6, respecte el RNA i la nucleocàpsida (Garcias, 2020). Creat amb Biorender.com

Una altra proteïna important és la VP6, que es troba a la capa mitjana de la capsida i, d'acord amb la relació antigènica amb ella, s'estableix la classificació dels rotavirus. Així, es divideixen en deu grups: A, B, C, D, E, F, G, H, I i J. Els grups més comuns en diferents espècies són el rotavirus A (RVA), el B (RVB) i el C (RVC). En el cas dels porcs, el RVA i el RVC són els més freqüents i es troben tant en animals amb diarrea com en sans a tot el món, tot i que també s'han detectat els grups B, E i H (Puente et al., 2021; Vidal et al.,

2019; Vlasova et al., 2017). A causa de la diversitat de genotips dins de cada grup, els RVA es classifiquen segons l'estructura dels 11 segments del genoma complet, seguint aquest ordre: VP7 (G), VP4 (P), VP6 (I), VP1 (R), VP2 (C), VP3 (M), NSP1 (A), NSP2 (N), NSP3 (T), NSP4 (E) i NSP5/6 (H). Així, la nomenclatura de cada soca de RVA es presenta com Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (Matthijnssens et al., 2008). Els signes clínics de la infecció per rotavirus varien segons l'edat dels animals, essent sempre més greu en els més joves degut a la manca de capacitat de regenerar les vellositats i al perill de la deshidratació. En general, es presenta una diarrea líquida pastosa de color groguenc-blanquinós que, si és l'únic agent patògen implicat, sol ser lleu i autolimitant. Ara bé, les coinfeccions són habituals i això fa que el quadre clínic es compliqui. Les lesions macroscòpiques es localitzen a l'intestí prim, que apareix distès i ple de gas (Chang et al., 2019). A nivell microscòpic, es pot observar un escurçament dels villi, la gravetat del qual determina la severitat del quadre clínic. També es poden detectar infiltrats de cèl·lules mononuclears i neutròfils, així com hiperplàsia de les criptes (Uzal et al., 2016).

La patogènia de la infecció per rotavirus implica diversos mecanismes. Primer de tot, el virus necessita penetrar a l'intestí mitjançant la unió de les proteïnes de membrana VP4 amb els lligands glicans de la superfície cel·lular dels enteròcits més madurs (Rodríguez i Luque, 2019). Després, el principal mecanisme de patogènia és la replicació i la lisi de la cèl·lula, que porta a l'escurçament dels villi, generant una diarrea per malabsorció. També l'entrada a la cèl·lula incrementa el calci intracel·lular, desorganitzant el citoesquelet i les unions estretes, augmentant així la permeabilitat paracel·lular. Aquest desequilibri electrolític es compensa amb la secreció de clor i bicarbonat (Dickman, 2000). Finalment, la proteïna no estructural NSP4 juga un paper important: activant la Fosfolipasa C (PLC), allibera calci del reticle endoplasmàtic al citoplasma, contribuint encara més al desequilibri electrolític i a la deshidratació. A més, també s'activa el sistema nerviós entèric i, per tant, la motilitat intestinal, reduint la capacitat d'absorció i agreujant un procés de diarrea per malabsorció (Estes et al., 2001).

### **1.3.1.2. Coronavirus**

La família *Coronaviridae* és una família de virus RNA embolcallats amb genoma no segmentat monocatenaris de polaritat positiva, que pertanyen a l'ordre *Nidovirales*.

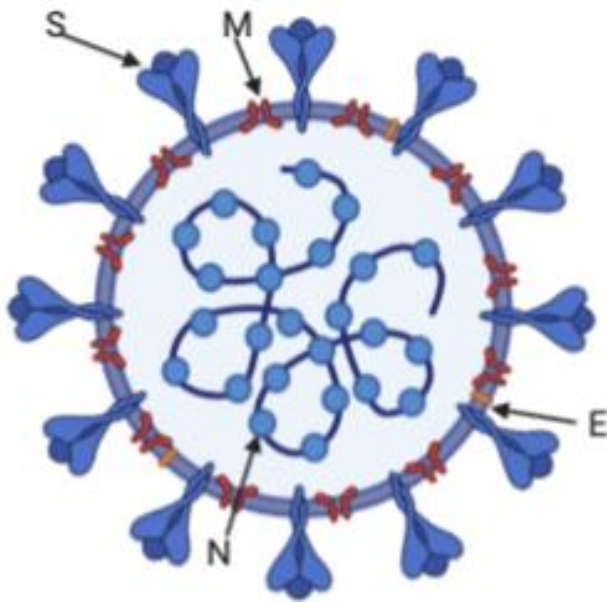


Posseeixen el genoma conegut més gran dintre dels virus RNA (Vlasova et al., 2020). Dintre trobem la subfamília *Orthocoronavirinae* a la qual pertanyen els coronavirus entèrics que afecten als porcs. Es classifiquen en quatre gèneres: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Deltacoronavirus* i *Gammacoronavirus*.

Entre els coronavirus entèrics que afecten a l'espècie porcina destaquen el virus de la gastroenteritis transmissible (TGEV) i el virus de la diarrea epidèmica porcina (DEPV), que són *Alphacoronavirus* (Uzal et al., 2016). També trobem el *Deltacoronavirus suis* (PDCoV), que com diu el seu nom pertany al gènere *Deltacoronavirus* (Koonpaew et al., 2019). A part, també existeix el Coronavirus Entèric Suid (SeCoV), un virus quimèric del TGEV i el DEPV (Belsham et al., 2016). Finalment, també trobem exemples de coronavirus que han saltat a l'espècie porcina des dels ratpenats (com l'Alfacoronavirus entèric suid (SeACoV), també conegut com l'alfacoronavirus entèric porcí (PEAV), o el coronavirus de la síndrome de la diarrea aguda suïda (SADS-CoV) han generat quadres de diarrea (P. Zhou et al., 2018)

El genoma dels coronavirus es troba compost de diversos fragments oberts de lectura (ORF), essent ORF1a i ORF1b els més destacats. Estan superposats i contenen la replicasa, que codifica per proteïnes no estructurals necessàries per a la replicació (Decaro i Lorusso, 2020). Hi ha 4 ORFs més que codifiquen per proteïnes estructurals que són comunes a tots els virus de la família (Figura 4). Aquestes són:

- Espícula (S): és una glicoproteïna de l'embolcall que permet l'entrada del virus a la cèl·lula i és la inductora de la producció d'anticossos neutralitzants per part de l'hoste (Fang Li, 2017).
- Embolcall (E): és una petita proteïna de membrana que permet l'assemblatge de virions però que no és essencial per a la transmissió del virus (Decaro i Lorusso, 2020).
- Membrana (M): és la proteïna més abundant i defineix la mida i la forma de l'embolcall. A més, intervé en la formació de nous virions (Malik, 2020). També s'ha vist que pot modular la producció d'interferons beta (Siu et al., 2009).
- Nucleocàpsida (N): es tracta d'una fosfoproteïna que embolcalla els àcids nucleics i modula la síntesi de RNA (Decaro i Lorusso, 2020). A part, també és antagonista de la producció d'interferons beta (C. Lee, 2015).



**Figura 4:** Esquema de les principals proteïnes dels coronavirus: Espícula (S), Membrana (M), Embolcall (E) i Nucleocàpsida (N) (Garcias, 2020). Creat amb Biorender.com.

Pel que fa als signes clínics a la granja, la manifestació és similar en tots els casos, encara que la gravetat pot variar segons el tipus de coronavirus. Quan una granja que estava lliure de la malaltia s'infecta per primera vegada, es viu una fase epidèmica inicial. Durant aquesta fase, els animals de totes les edats presenten diarrea i vòmits, però la situació és més greu en els exemplars joves, on la mortalitat pot arribar a ser d'un 100%. Després de la immunització dels animals, la granja entra en una fase endèmica. En aquesta etapa, es poden observar episodis de diarrea durant les transicions, ja que és el moment en què els anticossos maternals desapareixen (Vlasova et al., 2020).

Dels coronavirus explicats anteriorment, els més importants històricament són el TGEV i el PEDV. Són molt similars pel que fa a signes clínics, patogènia i lesions, però són antigènicament diferents i, per tant, no es genera una immunitat creuada (Lin et al., 2015). A Amèrica i Àsia (juntament amb l'emergència dels Deltacoronavirus) tenen força importància, sobretot el PEDV (C. Lee, 2015), però a Europa la seva prevalença actual és baixa, tot i poder reemergir i causar brots importants ocasionalment (Karte et al., 2020). El TGEV era relativament freqüent a Europa i Estats Units durant la dècada dels 2000, però la mutació que va originar el virus del Coronavirus Respiratori Porcí (PRCV) va generar immunitat creuada i va disminuir la seva prevalença a Estats Units i Europa, essent pràcticament residual des del 2014 (F. Chen et al., 2019; Valkó et al., 2019).

En relació als signes clínics, a més de la diarrea i els vòmits, també és comú observar lesions característiques durant la necròpsia. En aquest examen postmortem, sovint es troba que l'estómac i els intestins estan plens de contingut i presenten petèquies. La paret intestinal apareix aprimada i transparent a causa de l'atròfia dels *villi*. A nivell microscòpic, es pot observar una disminució de l'alçada dels *villi* del jejú i de l'ili, mentre que el duodè no sol presentar lesions, i en animals amb certa immunitat les lesions solen ser presents només a l'ili (Saif et al., 2019). Pel que fa a la patogènia dels coronavirus se centra principalment en la replicació del virus dins dels enteròcits del jejú. Aquesta replicació té lloc dins del citoplasma de les cèl·lules i provoca la lisi cel·lular dels enteròcits. Això condueix a un escurçament dels *villi*, els quals són essencials per a l'absorció eficient de nutrients. La pèrdua d'aquesta funció absortiva pot provocar una major pressió osmòtica a la llum intestinal, resultant en una diarrea per malabsorció. En casos més greus, especialment en garrins més joves amb criptes intestinals menys madures i una menor capacitat de substituir les microvellositats, aquesta diarrea pot conduir a una deshidratació severa i, en casos extrems, a la mort de l'animal (Saif et al., 2019).

### **1.3.1.3 Altres virus**

Encara que els virus més freqüents en els processos de diarrea són els rotavirus i els coronavirus, d'altres que principalment generen un altre quadre clínic també poden provocar problemes entèrics, tot i que el fet de trobar altres signes clínics simplifica el diagnòstic.

Per exemple, un d'ells és el circovirus porcí tipus 2. La seva acció immunosupressora facilita la infecció d'altres patògens entèrics i s'ha relacionat amb la infecció amb el PEDV (Guo et al., 2020). Però, també pot ser agent primari de diarrea perquè s'ha descrit que pot produir una enteritis granulomatosa en garrins (Segalés, 2012).

De manera similar, la immunosupressió causada pel virus de la síndrome respiratòria i reproductiva porcina (PRRSV) també pot facilitar la infecció per altres agents, però, a banda, s'ha vist que també pot danyar la mucosa intestinal dels garrins i causar diarrea (J. Zhao et al., 2021).

També els virus com el de la pesta porcina africana (VPPA) i clàssica (VPPC) provoquen l'aparició de diarrea (Kirkland et al., 2019; Sánchez--Vizcaíno et al., 2019), però els

quadres clínics caracteritzats per una alta mortalitat i morbiditat, amb hemorràgies generalitzades, fa que sigui difícil confondre-ho amb altres causes.

Finalment, trobem un seguit de virus com ara els sapovirus, astrovirus, kobuvirus, teschovirus, sapelovirus, enterovirus o adenovirus, entre molts d'altres, que formen part del viroma intestinal i poden estar involucrats en la presentació de diarrea (Benfield i Hesse, 2019; Cortey et al., 2019; Jackova et al., 2017; Leme et al., 2019; Nagai et al., 2020). No obstant això, el seu rol encara no està ben definit i no està clar que siguin agents primaris. El que sí que s'ha vist, és que el seu rol podria ser important en el cas de coinfeccions amb Rotavirus A, ja que també es repliquen en els enteròcits i podrien exacerbar la manifestació clínica (Nantel-Fortier et al., 2022).

### **1.3.2 Causes bacterianes**

Històricament, els bacteris s'han considerat la principal causa de diarrea i en especial *E. coli*, un dels principals agents etiològics bacterians. Altres infeccions per *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) i *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) a les maternitats, o *Salmonella* spp, *Lawsonia intracellularis* (*L. intracellularis*) i *Brachyspira hyodysenteriae* (*B. hyodysenteriae*) als engreixos, poden jugar un paper també important. En el següent apartat, es descriuen les principals característiques d'aquests agents infecciosos.

#### **1.3.2.1 *Escherichia coli***

*E. coli* és un bacteri gram-negatiu considerat històricament el patògen més important en els casos de diarrea porcina. Donat el paper central que té en aquesta tesi, se li dedicarà un apartat en exclusiva.

#### **1.3.2.2 Clostridiosis**

Els clostridis són bacils gram-positius del gènere *Clostridium*, anaerobis i formadors d'espores que es presenten en forma disseminada en la pols, la terra i la vegetació i constitueixen la flora normal del tracte digestiu dels mamífers. S'han descrit diferents espècies en el porcí com ara *C. perfringens*, *Clostridioides difficile*, *C. tetani*, *C. novyi*, *C. septicum* o *C. chauvoei*, però els més importants i que estan relacionats amb casos de diarrea són *C. perfringens* i *C. difficile* (Uzal i Glenn Songer, 2019).

##### **1.3.2.2.1 *Clostridium perfringens***

*C. perfringens* és un bacil gram-positiu formador d'espores anaerobi. Emperò, s'ha observat que pot tolerar certa aerobiosi (Rood et al., 2018). Produeix 20 exotoxines

diferents, de les quals se n'utilitzen sis per classificar-les en els diferents toxinotipus. Actualment, hi han set toxinotipus que van de la A a la G, en funció a la producció de les sis toxines: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), èpsilon ( $\epsilon$ ), iota ( $\iota$ ), l'enterotoxina (*cpe*) i la toxina *NetB* (Rood et al., 2018) (Taula 2). Aquesta classificació és una actualització de la de McClane, (2005) degut principalment al descobriment de la toxina NetB (Keyburn et al., 2008). Aquesta toxina està relacionada amb casos d'enteritis necròtica en aus, que dona lloc al setè toxinotipus G. Els més importants en l'espècie porcina són l'A i el C.

**Taula 2:** Classificació dels toxinotipus de *C. perfringens* d'acord amb la producció de les sis exotoxines principals.

Toxinotipus	$\alpha$	$\beta$	$\epsilon$	$\iota$	<i>cpe</i>	<i>NetB</i>
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	-	-	-	-
C	+	+	+	-	+/-	-
D	+	-	+	-	+/-	-
E	+	-	-	+	+/-	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Tot i la seva patogenicitat, *C. perfringens* és un bacteri ubiqüitari, present de manera habitual en el sòl i també a la microbiota d'humans i la gran majoria d'animals domèstics (Songer i Uzal, 2005). Això fa que, de cara al seu diagnòstic, la detecció de les toxines no sigui suficient per confirmar la seva relació amb la patologia i s'hagi d'interpretar conjuntament amb les lesions macroscòpiques i histològiques trobades, per confirmar la seva etiologia en els casos de diarrea.

#### 1.3.2.2.1.1 *Clostridium perfringens* tipus A

*C. perfringens* tipus A (CpA) acostuma a estar implicat en casos de diarrea en garrins de menys d'una setmana de vida. No obstant això, és molt habitual també trobar-ho en animals sans (Vidal et al., 2019). Respecte als signes clínics, acostuma a ser una diarrea mucosa no hemorràgica, on les lesions se solen restringir a la mucosa i ser de caràcter lleu, per la qual cosa s'ha suposat que la diarrea és d'origen secretor, tot i que existeixen moltes incerteses sobre la seva patogènia (Uzal et al., 2023).

Emperò, ja s'observa que amb les lesions inespecífiques i amb la dificultat de distingir les soques patògenes de les comensals, que el seu rol en la diarrea no està confirmat i alguns autors posen en dubte la seva patogenicitat (Uzal, 2016; Uzal i Glenn Songer,

2019). Així, la seva confirmació diagnòstica és pràcticament una entelèquia i se sol associar a la presentació de diarrea en aquells casos on les lesions observades són mínimes i no es troba cap altre agent implicat.

#### **1.3.2.2.1.2 *Clostridium perfringens* tipus C**

Les soques de *C. perfringens* tipus C (CpC) acostumen a estar relacionades en casos de diarrea en animals de menys de 3 dies de vida. Això és degut a que la principal toxina implicada és la beta, que és altament sensible a l'acció de la tripsina (Macias Rioseco et al., 2012). Com ja s'ha comentat, els animals nous no han acabat de madurar a nivell d'epiteli entèric i tenen dèficits de producció de tripsina, la qual cosa els fa sensibles a aquestes infeccions. Un cop passada la primera setmana de vida, els garrins tenen un nivells de producció de tripsina adequats, per la qual cosa els casos de diarrea per aquest agent son molt poc freqüents. De tota manera, tot i no ser important en l'actual sistema productiu, es poden donar casos en animals més grans associats al consum elevat d'inhibidors de la tripsina com el moniato (Murrell i Walker, 1978).

A diferència de CpA, les lesions de CpC són evidents ja que genera una enteritis necròtica/necrohemorràgica a causa de l'acció citotòxica de la toxina beta. Aquesta toxina actua formant porus i produeix lesions intramurals (Nagahama et al., 2015) que alteren l'equilibri iònic i indueixen la mort cel·lular i la consegüent necrosi de la mucosa intestinal (Nagahama et al., 2015). No obstant això, també s'ha vist que el dany endotelial provocat per la unió de la toxina a la làmina pròpia podria provocar la formació de tromboembolismes, isquèmia, hemorràgies i dany epitelial (Posthaus et al., 2020).

Això fa que macroscòpicament la lesió típica sigui una enteritis necròtic-hemorràgica, localitzada a l'intestí prim, habitualment amb component fibrinonecròtic (Uzal i Glenn Songer, 2019). Donat el fet que els animals són molt joves, el quadre clínic acostuma a ser molt agut, ocasionant una diarrea hemorràgica i els animals poden morir en menys de 24 hores.(Uzal et al., 2023).

#### **1.3.2.2.2 *Clostridioides difficile***

L'altre clostridi implicat en la diarrea porcina és *C. difficile*, anaerobi estricte, formador d'espores molt resistents i present en la microbiota intestinal normal d'humans i animals. També és una causa freqüent de diarrea en persones hospitalitzades i amb tractaments perllongats amb antibiòtics (Lawson et al., 2016).

*C. difficile* es troba present en humans i múltiples espècies d'animals domèstics. Emperò, la seva presentació difereix molt entre espècies i el cas del porcí, un dels seus principals reservoris, no és una excepció. En humans, la seva capacitat de generar diarrea s'associa principalment amb una disbiosi després d'un tractament antimicrobià (Hensgens et al., 2012), però no és així en el cas dels porcs (Susick et al., 2012). Per altra banda, en els humans la infecció es dona molt més freqüentment en persones majors de 65 anys (Czepiel et al., 2019). En el cas del porcí, la situació és radicalment oposada, ja que s'ha vist que la seva prevalença correlaciona a la inversa amb l'edat dels animals, essent màxima durant les primeres dues setmanes de vida (50-100%), disminuint marcadament a les transicions i essent residual al moment de l'escorxador (Hawken et al., 2013; Susick et al., 2012; Weese et al., 2010).

Existeixen soques no toxigèniques (que no tenen cap importància clínica perquè no són patògenes) i soques toxigèniques, que poden produir alguna patologia mitjançant tres toxines diferents:

- Toxina A (TcdA) o enterotoxina: produeix factors de quimiotaxis i estimula la producció de citoquines i la secreció de líquid cap a la llum intestinal (Chandrasekaran i Lacy, 2017).
- Toxina B (TcB) o citotoxina: actua despolimeritzant l'actina i consegüentment com disruptor del citoesquelet (Kuehne et al., 2010).
- Toxina binària (Cdt): el seu rol no està ben definit, però es pensa que podria contribuir a la despolimerització dels microtúbuls de la cèl·lula, agreujant l'efecte de les altres toxines (Martínez-Meléndez et al., 2022).

Aquestes soques toxigèniques es troben en els animals malalts, però també en animals sans, fins i tot en major freqüència segons l'explotació (Vidal et al., 2019). Això, tot i no existir-ne una evidència completa, ve explicat majoritàriament per la seva patogènia. Primerament, els animals necessiten ingerir les espores del bacteri, que són molt resistents a les altes temperatures i al pH de l'estómac. Després, una vegada germinin les espores, si es donen les condicions adequades, com ara una disbiosi intestinal, *C. difficile* pot replicar-se en l'epiteli intestinal i produir les toxines, la qual cosa significarà la presentació de diarrea (Uzal et al., 2023).

Quant als signes clínics, s'observa una diarrea líquida i groguenca durant les primeres setmanes de vida i, macroscòpicament, es pot observar un edema de mesocòlon que és quasi patognomònic de la casuística generada per *C. difficile* (Uzal i Glenn Songer, 2019).

### 1.3.2.3 Microbiota

Tot i no ser agent infeccios com a tal, la microbiota intestinal també pot jugar un paper important en l'aparició de diarrea.

La microbiota intestinal es defineix com el conjunt de microorganismes patògens, comensals i simbiòtics presents en el tracte gastrointestinal. Durant la darrera dècada, hi ha hagut un gran increment de la recerca en aquest camp (Cresci i Bawden, 2015; Y. Li et al., 2021) i l'espècie porcina no n'és una excepció (Gresse et al., 2017). No obstant això, fa falta encara molta recerca per entendre com afecta a la presentació de diarrea, ja que la gran majoria d'estudis o bé estan realitzats en condicions experimentals (Castillo et al., 2007; Gierse et al., 2020) o bé en un número molt reduït de granges comercials (Karasova et al., 2021). Això fa que s'observi una gran variabilitat entre els estudis i que sigui difícil caracteritzar la microbiota dels animals malalts, probablement a causa del gran nombre de variables externes i internes, que poden afectar a cada individu en particular (Hasan i Yang, 2019).

No obstant això, existeixen una sèrie de factors o variables que poden intervenir i afectar a la composició de la microbiota intestinal que es citen a continuació:

- **Edat:** Està descrit que l'edat té un paper molt rellevant a l'hora de fer comparatives entre animals ja siguin malalts o sans. Per exemple, de per sí existeixen diferències en la microbiota entre animals de pre-deslletament i post-deslletament (Q. Yang et al., 2019). Fins i tot en casos de garrins sans s'ha descrit una disminució de la presència de *Lactobacillales* i un increment de *Enterobacterales* (Castillo et al., 2007). Per això, s'ha de ser molt curós en aquestes anàlisis perquè l'edat dels individus pot afectar les conclusions dels estudis.
- **Antibiòtics:** els tractaments antimicrobians afecten de manera considerable la composició de la microbiota (Looft et al., 2012) i cadascun d'aquests tractaments pot tenir un efecte diferent (Guitart-Matas et al., 2024). A part, altres compostos com el zinc que també han estat utilitzats freqüentment, poden tenir un efecte



considerable en la modulació de la microbiota intestinal (Ortiz Sanjuán et al., 2024)

- **Mostreig:** s'han observat diferències significatives segons el tipus de mostra analitzada, si la presa ha estat directament d'una femta o per un hisop rectal, o bé s'ha agafat després d'una necròpsia directament de l'intestí prim o gruixut, ja que l'anatomia de cada secció del tracte digestiu també afecta a la microbiota (Gryaznova et al., 2022).
- **Virus:** les infeccions víriques poden alterar la composició de la microbiota, molt probablement a causa de l'alteració del sistema immunitari que ocasionen (Harper et al., 2021). Això en els porcs s'ha observat en diversos exemples com el DEPV (S. Yang et al., 2020), el PRRSV (Argüello et al., 2022) o el VPPA (Ko et al., 2023). Emperò, tot i no estar molt ben caracteritzat en els porcs, pot ocórrer a la inversa i la microbiota protegir de la infecció de certs virus, com ara els rotavirus, a conseqüència de l'estímul immunitari que es pot generar (Kim et al., 2021).
- **Alfa-diversitat:** una de les hipòtesis tradicionals de l'aparició de la diarrea és que hi ha una alteració de l'alfa-diversitat (la diversitat interna de cada mostra, és a dir, quants microorganismes diferents hi ha presents en aquella mostra). No obstant això, tot i haver observat que augmenta amb l'edat, amb una lleugera caiguda en el moment del deslletament (X. Wang et al., 2019), la gran majoria d'estudis no han trobat diferències entre animals sans i malalts (Han et al., 2019; Ren et al., 2022; Zheng et al., 2023) i fins i tot un estudi ha observat que la diversitat era menor en animals sans (Gryaznova et al., 2023). Podria ser quelcom associat a l'espècie porcina, perquè sí que s'han vist diferències de la composició de la microbiota entre sans i malalts en altres espècies com humans (Fan et al., 2020), vedells (W. Li et al., 2023), alpaques (Zapata et al., 2024) o macacos (Rhoades et al., 2024).
- **Diferències taxonòmiques entre malalts i sans:** per poder conèixer la microbiota associada amb la malaltia, primer s'ha de conèixer aquella relacionada amb la salut. No obstant això, degut a la multitud de factors implicats i a l'heterogeneïtat dels resultats, això resulta molt complicat, però algunes tendències sí que es coneixen. Per exemple, bacteris productors d'àcids grassos de cadena curta com les famílies *Lachnospiraceae*, *Lactobacillaceae* i *Ruminococcaceae* s'associen

amb una bona salut intestinal (Vasquez et al., 2022). Per altra banda, ordres com Proteobacteria o Fusobacteria es troben incrementats en animals amb diarrea a la majoria d'estudis (Dou et al., 2017; Kong et al., 2022; Sun et al., 2019). No obstant això, es necessita molta més recerca per tal d'establir una base de coneixement sòlida.

#### **1.3.2.4 Altres bacteris**

Fins ara, s'han descrit els bacteris més habituals en els casos de diarrea neonatal i postdeslletament, que se solapen entre ells i és on hi ha més morbiditat i mortalitat, però també hi ha un altre llistat de bacteris que provoquen diarrea als engreixos, on igual la severitat dels casos no és tan greu, però es generen greus pèrdues econòmiques a causa de l'increment de l'índex de conversió en animals amb consum elevat.

Un dels més importants, també per la seva importància de salut pública, és la infecció per *Salmonella*, que també pot provocar diarrea en animals més joves, però principalment als engreixos. Diversos *serovars* poden estar implicats. Els més típics són Typhimurium, Infantis, Johannesburg, Agona, Heidelberg, Derby, Mbadlaka, Anatum i Cerro (Asai et al., 2002; Mateu et al., 2002; Pires et al., 2021). *Salmonella* Cholerasuis també pot ocasionar diarrea, però sol anar associat a una forma septicèmica (Soliani et al., 2023).

El signe clínic característic és una diarrea de color groc amb contingut sanguinolent i mucós, que sol durar 3-5 dies però que pot reaparèixer (Carlson et al., 2019). És típica dels engreixos, moment en el qual s'excreta majoritàriament, però, si enlloc d'analitzar mostres rectals s'analitzen limfonodes mesentèrics es pot detectar fins i tot en animals lactants (Bernad-Roche et al., 2021).

A nivell de lesions, s'observa inflamació i necrosi a l'ili, el cec i el còlon espiral, però també pot estar present al còlon descendent i al recte. Són molt típiques les úlceres de la mucosa i la paret intestinal cobertes de material fibrinonecròtic, conegudes com "botons". També en alguns casos d'infeccions més cròniques es poden trobar estrictures rectals. A part, les úlceres necròtiques de la mucosa també es poden estendre a la submucosa i als limfonodes mesentèrics (Carlson et al., 2019).

Una altra causa de diarrea és la ileïtis proliferativa porcina (també coneguda com adenomatosi intestinal), causada per *Lawsonia intracellularis*, un bacil gram-negatiu corbat intracel·lular obligatori, la qual cosa complica molt el seu aïllament i ho converteix en un bacteri exigent (Vannucci et al., 2012). La seva presentació es caracteritza per una

diarrea aguda de color gris-verdós, que sol afectar animals de mitjans-final d'engreix, tot i que en alguns casos també pot estar present a les transicions (Vannucci et al., 2019). Tot i no ser una zoonosi (Michalski et al., 2006), pot afectar a altres espècies com cavalls, cànids, fures, conills, cérvols i, més important de cara l'epidemiologia en l'espècie porcina, rates (Karuppanan i Opriessnig, 2018). Així, tot i que la transmissió és majoritàriament oro-fecal, les mesures de neteja i desinfecció no són suficients per si soles per controlar la malaltia i s'han d'implementar també plans de desratització.

Quant a les lesions, s'observa una enteritis proliferativa localitzada a l'ili i a nivell histològic es pot observar una hiperplàsia de les criptes intestinals, que es pràcticament patognomònica d'aquesta malaltia. També poden existir formes hemorràgiques i necròtiques quan el dany a la mucosa és major i si cronifica es produeix un engruiximent sever de la paret intestinal, conegut com adenomatosi intestinal porcina (Karuppanan i Opriessnig, 2018). Aquest engruiximent fa que els animals no absorbeixin bé els nutrients de l'alimentació i acabin perdent pes i incrementant el seu índex de conversió.

Finalment, l'altre gènere bacterià freqüentment implicat en problemes digestius als engreixos és *Brachyspira* spp, bacteris anaerobis gram-negatius en forma d'espiroqueta, que generen problemes a nivell de l'intestí gros. En podem distingir dos grups d'acord amb la seva capacitat de produir hemòlisi, la qual es relaciona amb la seva capacitat patogènica (Burrough et al., 2012). La més típica entre les beta-hemolítiques és *B. hyodysenteriae*, que és responsable de la disenteria porcina. Ocasiona una diarrea muco-hemorràgica que afecta a animals d'engreix, però també pot afectar a animals més joves en ramats que encara no s'han infectat (Hampson i Burrough, 2019). La seva transmissió és bàsicament oro fecal, però, d'una manera similar al cas de la ileïtis proliferativa porcina, vectors com ara ocells, rosegadors, insectes o cànids poden jugar un paper molt destacat i dificulten en gran mesura el seu control (Alvarez-Ordóñez et al., 2013). Quant a les lesions, s'observen exclusivament a l'intestí gros (a nivell de cec i còlon espiral) i es caracteritzen per una hiperèmia i edema de la paret intestinal, la mucosa i els limfonodes mesentèrics. A mesura que avança el procés, la paret perd la seva forma rugosa i queda coberta per moc, fibrina i sang fresca, formant pseudomembranes. A nivell histològic, es poden arribar a observar les espiroquetes (Hampson i Burrough, 2019). *B. hyodysenteriae* és l'espècie més típica, encara que n' existeixen d'altres com *B. hamptonii* o *B. suanatina* poden generar una clínica similar (Mirajkar et al., 2016; Mushtaq et al., 2015).

També es troben espècies d'hemòlisi dèbil, entre les qual destaca *B. pilosicoli*, causant del que es coneix com colitis espiroquetal. Cursa de manera molt similar a la disenteria porcina, però amb una severitat significativament inferior (Hampson i Burrough, 2019). A diferència dels agents causants de disenteria porcina, *B. pilosicoli* sí que pot afectar a les persones, especialment a aquells individus immunocompromesos (Hampson, 2018).

A banda d'aquests patògens més habituals, també trobem altres bacteris que, tot i no ser la causa primària de diarrea, poden complicar altres casos. Alguns exemples serien *Enterococcus villorum* o *Enterococcus hirae* (Jang et al., 2019) que es poden replicar a la paret apical dels enteròcits i generar una atròfia de les microvellositats, que, amb conjunció amb altres patògens, pot provocar l'aparició de diarrea. *Campylobacter jejuni* és un cas similar, perquè s'ha observat que, tot i ser considerat un comensal, pot afectar la integritat de la mucosa intestinal (Rath et al., 2021).

### 1.3.3 Causes parasitàries

La tecnificació del sistema productiu ha fet desaparèixer certes patologies i unes de les més comuns han estat les malalties parasitàries. Amb les noves instal·lacions de producció intensiva, la majoria de paràsits que abans podien provocar diarrea, com *Strongyloides ransomi* o *Trichuris suis*, són pràcticament inexistents (Brewer i Greve, 2019).

De totes formes, podem seguir trobant paràsits capaços de causar simptomatologia, moltes vegades acompanyant altres processos. L'exemple més clar és *Cystoisospora suis*, causant de la coccidiosi porcina i que té una elevada prevalença a l'Estat Espanyol, observant-se prevalences del 83% de les granges estudiades (Hinney et al., 2020). La patogènia d'aquest coccidi es deu a la seva fase asexual, ja que es replica als enteròcits i en produeix la seva lisi, provocant una atròfia de les vellositats i una diarrea per malabsorció. Afecta només als animals de menys de dues setmanes, que encara es troben en una fase immadura, i veiem femtes pastoses i molt clares (Harleman i Meyer, 1983).

Un altre protozou relativament comú és *Balantidium coli*, habitual de la microbiota intestinal, però que es pot trobar associat amb casos de disenteria porcina (Szczołka-Bochniarz et al., 2021). De manera similar, tot i ser molt menys habituals i no estar presents a la microbiota, les amebes *Entamoeba suis* i *Entamoeba polecki* també s'han vist com a complicants en casos de *B. hyodysenteriae* (Cuvertoret-Sanz et al., 2019; Matsubayashi et al., 2014).

Finalment, també existeix la possibilitat que en casos d'infestacions severes d' *Ascaris suum*, (nematode causant del “fetge amb taques de llet” que genera grans pèrdues econòmiques a causa dels decomisos) també apareguin casos de diarrea (Brewer i Greve, 2019).

#### 1.3.4 Causes no infeccioses

Com ja s'ha explicat a l'apartat 1.1, la presentació de malaltia és deguda al trencament de l'equilibri existent entre l'hoste, el patogen i l'ambient. Les causes no infeccioses de diarrea entrarien dins dels dos últims punts, on factors com l'estrès, un deslletament precoç o la falta d'encalostament facilitarien l'acció dels patògens. Però n'hi ha d'altres que per si sols poden ser l'origen de les femtes de consistència tova, donant lloc al que es coneix com diarrea mecànica o no biòtica. A continuació es presenten de forma breu les causes no infeccioses més típiques:

- **Inflamació intestinal:** a part dels agents infecciosos, diversos estressors, com ara el deslletament, el fred o canvis abruptes d'alimentació, poden generar una inflamació intestinal, que pot conduir a una diarrea per malabsorció (X. Tang et al., 2022). Acostuma a estar associada amb causes infeccioses, ja que genera un ambient adequat per la infecció de certs patògens, però per si sola pot produir una diarrea que acostuma a ser autolimitant.
- **Alts nivells de proteïna bruta:** les genètiques actuals tenen demandes elevades quant a nivell proteic per assolir el seu potencial màxim de creixement. Aquest fet augmenta el risc de patir diarrea, perquè en la digestió de les proteïnes es generen compostos volàtils i substàncies tòxiques com les amines, que tenen efecte perjudicial en la salut intestinal (Gao et al., 2019).
- **Consum excessiu de soja:** aquest ingredient dels pinsos pot generar reaccions d'hipersensibilitat, que causa una hiperplàsia de les criptes i una atròfia de les vellositats intestinals (Gao et al., 2019).
- **Micotoxines:** a banda de la immunosupressió que facilita la infecció pels patògens, el pinso contaminat per micotoxines genera problemes gastrointestinals de per si, pel dany a l'epitel·li intestinal que ocasionen (Pierron et al., 2016).
- **Dèficit de niacina (vitamina B3):** a causa de la seva poca biodisponibilitat, s'ha de suplementar en els pinsos. En els casos on no es fa, pot aparèixer una tiflocolitis necròtica (Dritz et al., 2019).

- **Mala qualitat d'aigua:** a part d'afavorir l'entrada de patògens, si l'aigua té alts nivells de sals mineral, pot generar una diarrea a causa de l'increment de pressió osmòtica a la llum intestinal (Flohr et al., 2014).

## 2. *Escherichia coli* en l'espècie porcina

*E. coli* és un bacil gram-negatiu, que pertany a la família *Enterobacteriaceae* i al gènere *Escherichia* (Willey et al., 2009). És considerat un bacteri molt divers genèticament i la majoria de les soques no solen ser patògenes. Tot i això ha estat considerat el principal causant de diarrea en l'espècie porcina (Fairbrother i Gyles, 2019). També existeixen soques amb afinitat extraintestinal.

En el següent apartat, es descriuen les classificacions més típiques de les soques i els patotipus històricament més relacionats amb la diarrea porcina.

### 2.1 Classificació de les soques d' *E. coli*

*E. coli* pertany al fílum Pseudomonadota (abans Proteobacteria), a la classe Gammaproteobacteria, a l'ordre Enterobacterales, a la família *Enterobacteriaceae* i al gènere *Escherichia*. Altres espècies que pertanyen a aquest gènere són *E. albertii*, *E. fergusonii*, *E. marmotae* o *E. hermannii* (Willey et al., 2009).

És una espècie bacteriana amb una gran diversitat genètica, per això al llarg de la història s'han buscat diferents maneres de classificar-lo dintre de la mateixa espècie. Primerament, es va basar en una classificació serològica d'acord amb l'esquema de Kauffman (Kauffmann, 1947), proposat durant la dècada dels 40, donant lloc als anomenats serotips. Explicat de manera breu, es basava en la utilització d'anticossos per determinar la composició dels antigens somàtics ("O", el lipopolisacàrid), el flagelar ("H") i el capsular ("K"), però bàsicament els serotips són determinats d'acord amb la combinació dels antigens "O" i "H". Així, s'han descrit 176 variants de l'antigen O (B. Liu et al., 2020) i 83 de l'antigen H (Fratamico et al., 2016). A nivell d'espècies animals, té molta importància el serotip O157:H7, una soca enterohemorràgica que és una causa comuna de diarrea greu en persones, de la qual els remugants són el principal reservori, tot i que els porcs també en poden ser portadors (Fairbrother et al., 2005). Tot i utilitzar-se durant molts d'anys, aquest procés de la serotipificació lent i poc exacte per classificar les soques, s'ha anat substituint per les noves tecnologies moleculars.

La millora de les tècniques moleculars va permetre noves classificacions. Diversos investigadors com Selander et al., (1986) i Clermont et al. (2000) van popularitzar una classificació de les soques basada en una reacció en cadena de polimerasa (PCR) multiplex de tres gens (chuA, yjaA i TSPE4.C2), que permetia classificar els genomes en quatre filogrup (A, B1, B2 i D). Gràcies a la gran quantitat d'informació que proporciona la seqüenciació del genoma complet (WGS) s'han pogut desenvolupar eines bioinformàtiques com *ecoli\_serotyper* (Joensen et al., 2015) o *EC\_typer* (Bessonov et al., 2021), que permeten realitzar classificacions genòmiques *in silico* de manera molt ràpida. L'ús de WGS ha permès refinar la tècnica i els nou enfocament (s'analitzen fins a 15 gens) també permet fer-ho *in silico* (Beghain et al., 2018). Així, es poden distingir amb la tècnica *E. albertii*, *E. fergusonii*, cinc clades críptics d'*Escherichia* que pertanyen a altres espècies i *E. coli sensu stricto*, dintre del qual es distingeixen vuit filogrup (A, B1, B2, C, D, E, F i G).

Aquesta classificació ha fet fortuna perquè a cada filogrup se li poden assignar una sèrie de trets característics respecte al seu comportament biològic o hoste que colonitza preferentment, la qual cosa li confereix molta importància a nivell epidemiològic. Els més habituals són A, B1, B2 i D i per això se'ls anomena filogrup majors, mentre que la resta són menys freqüents i se'ls anomena filogrup menors. Respecte a la seva localització, A, B1 i C són principalment presents al tracte gastrointestinal, mentre que B2, D, F i G són considerats extraintestinals. El filogrup E és el més divers i combina dintre seu l'epidemiologia de la resta de filogrup (Clermont et al., 2021).

Respecte a l'especialització d'acord en l'hoste, en el cas d'aquells localitzats en el tracte gastrointestinal, també trobam diferències entre filogrup. A la bibliografia, s'ha descrit que el filogrup A és el predominant en humans i porcs (Escobar-Páramo et al., 2006; García et al., 2020); B1 i A es troben força equilibrats en el cas de les aus (Woyda et al., 2023) i, finalment, en el cas dels remugants existeix un predomini destacat del B1 i una freqüència major que en altres espècies del filogrup E (Duangurai et al., 2022). També es descriu que el filogrup G, que es troba molt relacionat amb B2, s'ha especialitzat en infeccions aviars i en general és capaç d'adquirir un gran nombre de gens de virulència (Tiwari et al., 2023).

A nivell genètic, també es pot utilitzar una classificació basada en el seqüenciotip (ST), que és de molta utilitat per entendre l'estructura clonal dels bacteris. Aquesta classificació ha estat desenvolupada per una gran varietat de bacteris, però per *E. coli* s'acostuma a

utilitzar l'esquema d'Achtman (Wirth et al., 2006). Està basat en la combinació dels al·lels de 7 gens que formen part del genoma comú ("core genome" en anglès): *adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* i *recA*. Inicialment, es feia mitjançant tècniques d'electroforesi en gel pulsat, però les tècniques de seqüenciació massiva han fet que resulti molt fàcil identificar-lo i només cal utilitzar l'esquema de PubMLST (Jolley et al., 2018). Existeix una gran varietat de ST per *E. coli* i per això també existeix la classificació dels complexos clonals (CC) quan una soca conté cinc o més al·lels idèntics. Dins de l'espècie porcina, cal destacar el ST10 (i en general tot el CC10) relacionat amb la resistència a la colistina (Shi et al., 2023).

## **2.2 Patotips d'*E. coli***

Finalment, hem d'esmentar la classificació que més fortuna ha fet a nivell de la clínica veterinària, que són els patotips. Entre els més importants trobem les soques d'*E. coli* enterotoxigèniques (ETEC), enteropatogèniques (EPEC), verotoxigèniques (VTEC), enterohemorràgiques (EHEC) i extraintestinals (ExPEC), encara que també existeixen patotips mixtes. En els següents apartats, es desenvolupa cadascuna d'aquestes soques.

### **2.2.1 *E. coli* enterotoxigènics (ETEC)**

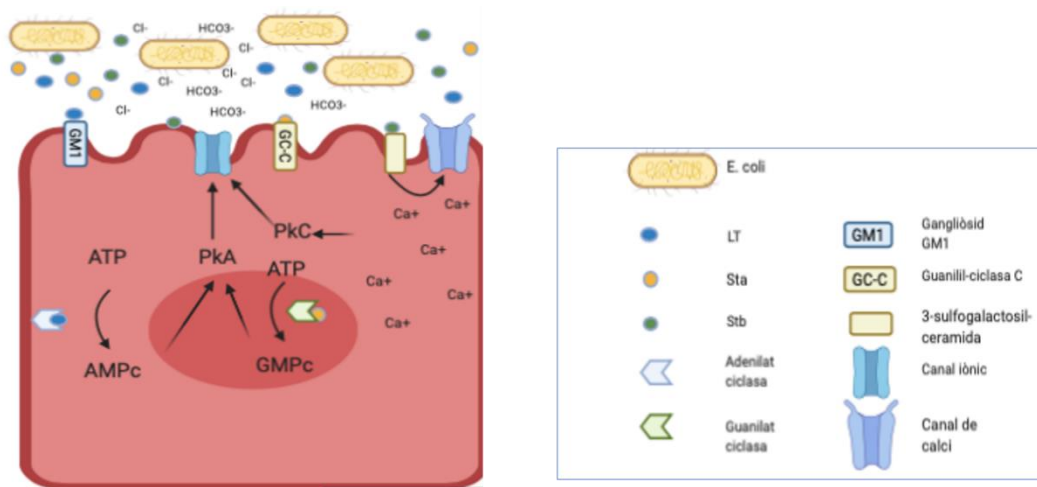
El patotip més comú dins de l'espècie porcina és l'ETEC, responsable de molts casos de diarrea, tant a les maternitats com a les transicions. Aquestes soques alliberen toxines que actuen causant una diarrea secretora de color groguenc-blanquinós, la qual cosa condueix a la deshidratació del garrí. A nivell macroscòpic, s'observa l'intestí prim dilatat, hiperèmic i lleugerament edematós. A nivell microscòpic, els canvis són bastant lleus, però de vegades es poden observar les bacteries, principalment al duodè, on veurem una inflamació neutrofilica (Fairbrother i Gyles, 2019).

Per generar la diarrea, aquestes soques necessiten dues coses: adherir-se i produir la toxina. L'adhesió ve mediada per fimbries, que permeten al bacteri adherir-se a l'epiteli intestinal. Les més comunes són la F1, F4, F5, F6, F18 i F41, però la seva freqüència difereix segons l'edat dels animals. Mentre que en els casos de les transicions les més típiques són la F4 i F18, a les maternitats són més comuns la F5 i F6 (Fairbrother i Gyles, 2019). També existeix l'adhesina AIDA, però el seu rol encara no està del tot clar (Daniel Dubreuil, 2010; Ngeleka et al., 2003) i no es troba del tot present en la majoria dels panells diagnòstics. La fimbria F18 també intervé en la malaltia dels edemes (ED), però amb variants antigèniques diferents. La variant F18ab causa la ED, mentre que la F18ac és



responsable de la diarrea al postdeslletament, però no existeix protecció creuada entre ambdues variants (Fairbrother et al., 2005).

Una vegada que *E. coli* s'uneix a la cèl·lula, pot replicar-se i alliberar exotoxines que causen la patogènia. A la figura 5 es mostra un esquema dels mecanismes de patogenicitat de diverses toxines com la LT, STa, STb i EAST1, que són habituals en aquest context. La LT és una toxina termolàbil, sensible a altes temperatures, que es vincula al gangliòsid GM1 i activa permanentment l'adenilat ciclasi dels enteròcits, induint una hipersecreció de clor i la secreció de fluids (Fairbrother et al., 2005). A més, facilita la colonització intestinal (Kopic i Geibel, 2010).



**Figura 5:** Esquema dels mecanismes de patogènia de les soques ETEC (Garcias, 2020). Creat amb Biorender.com

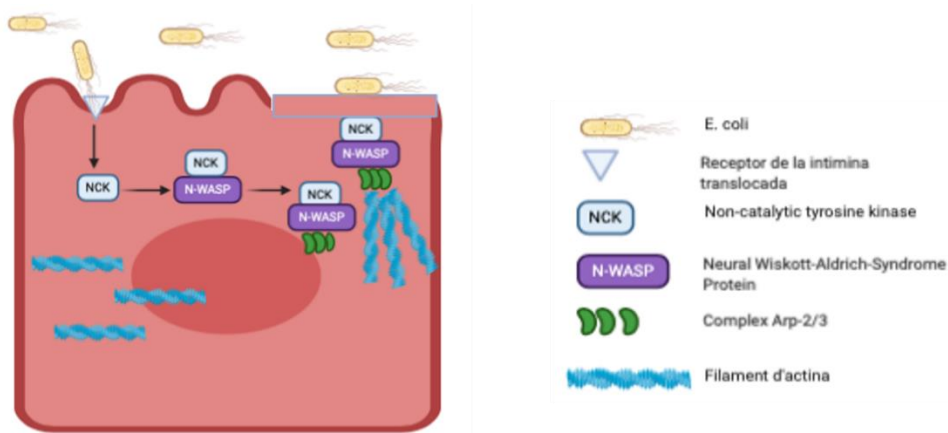
La STa és una toxina resistent a altes temperatures, codificada pel gen *estA*. S'uneix al receptor guanilil-ciclasi C situat als *villi* i les criptes, augmentant els nivells intracel·lulars del GMP cíclic (Luppi, 2017). Aquest augment activa la PKA, que promou una hipersecreció de sodi, augmentant la pressió osmòtica a la llum intestinal i també la secreció de fluids (Fairbrother et al., 2005). STb és una altra toxina termolàbil, codificada pel gen *estB*. Aquesta toxina s'uneix al receptor  $\alpha$ -sulfogalactosil-ceramida, provocant l'entrada de  $Ca^{2+}$  als enteròcits del duodè i del jejú (Gonçalves et al., 2008). Aquest augment de calci activa la PKC i la calmodulina dependent de  $Ca^{2+}$ , cosa que desencadena la secreció de sodi, clor i bicarbonat (Dubreuil et al., 2016). A més, la STb causa una lleugera exfoliació de la superfície dels enteròcits, que va acompanyada d'una atrofia moderada dels *villi* (Thomson i Friendship, 2019). També s'ha observat que la STb sovint es troba associada amb la LT (Luppi, 2017).

Finalment, també existeix la toxina EAST1, però el seu paper en el desenvolupament de la diarrea no està clar. Alguns estudis mostren una major prevalença d'aquesta toxina en individus malalts (W. Zhang, 2007), però d'altres la troben més en sans (Vidal et al., 2019; Zajacova et al., 2012). Tanmateix, els estudis de toxicitat indiquen que la EAST1 no sembla tenir la capacitat de causar diarrea (Dubreuil, 2019).

### 2.2.2 *E. coli* enteropatogènic (EPEC)

Les soques EPEC poden causar diarrea tant en les maternitats com durant les transicions. Aquestes soques es caracteritzen per provocar lesions a l'intestí prim, amb un fenomen d'adhesió i esborrament (A/E) observable a nivell histològic. Aquesta adhesió i esborrament inclou la formació de lesions en forma de pedestal, que resulten en l'atròfia de les vellositats i la pèrdua de la seva funció, provocant diarrea per malabsorció (Farfán-García et al., 2016).

La regulació del mecanisme A/E dels EPEC ve determinat pel gen *eae*, necessari per al desenvolupament de la patogènia (Fröhlicher et al., 2008). Per a que es produeixi el fenomen A/E, calen diversos processos que es presenten esquemàticament a la Figura 6.



**Figura 6:** Esquema dels mecanismes de patogènia de les soques EPEC (Garcias, 2020). Creat amb Biorender.com

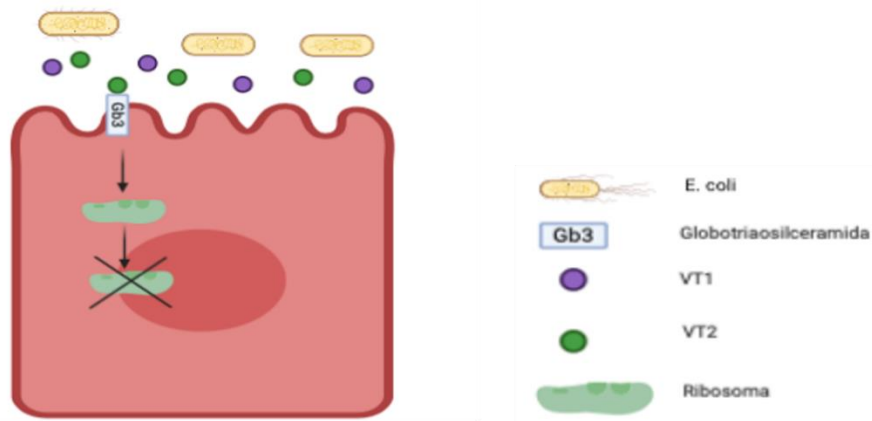
Primer, la bacterià s'ha d'adherir a l'enteròcit, cosa que aconsegueix mitjançant un flagel i el pili tipus IV. A continuació, es produeix la translocació de senyals intracel·lulars a través del sistema de secreció de tipus 3, que introdueix múltiples proteïnes a l'enteròcit. Una d'aquestes proteïnes és la Tir (receptor de la intimina translocada), que, un cop dins del citoplasma, es projecta cap a la membrana i permet l'adherència de la intimina, una adhesina produïda pels EPEC. Aquesta unió provoca la fosforilació de la Tir en tirosina 474, activant un mediador de la polimerització de l'actina. Aquesta activació reorganitza

el citoesquelet de la cèl·lula, formant la lesió en pedestal, i provoca l'atròfia i la pèrdua de funcionalitat de les vellositats intestinals (Farfán-García et al., 2016).

### 2.2.3 *E. coli* verotoxigènic (VTEC o STEC)

L'altre tipus de soques que poden estar habitualment implicades en la diarrea són les VTEC, també conegudes com a productores de toxines Shiga (STEC). Es coneixen així perquè la seva patogènia es basa en la producció de les toxines Shiga 1 i 2 (stx1 i stx2), codificades pels gens VT1 i VT2 (Ercoli et al., 2016; Ho et al., 2013).

La Figura 7 mostra els mecanismes de patogenicitat de les soques VTEC. Les toxines es lliguen al receptor de superfície globotriaosilceramida (*Gb3*) i bloquegen la síntesi proteica de la cèl·lula. Aquest bloqueig es produeix perquè les toxines inactiven els ribosomes eliminant una adenina del 28S RNAr, la qual cosa condueix a la mort cel·lular (Endo et al., 1988; Paton i Paton, 1998). Les característiques de la diarrea són molt similars a les dels patotips ETEC i EPEC.



**Figura 7:** Esquema del mecanisme de patogenicitat de les soques VTEC (Garcias, 2020). Creat amb Biorender.com.

També, tot i no ser part del problema de les diarrees (encara que també en pot ser la causa), dintre d'aquest patotip s'engloben les soques causants de la ED. La toxina produïda en aquest cas és la *Stx2e* i sovint es troba associada amb la fimbria F18 (Nagy et al., 1999). La patogènia és conseqüència del dany endotelial provocat per la toxina, que incrementa la permeabilitat vascular i així podem trobar edemes a múltiples localitzacions (Moxley, 2000). En general, la malaltia dels edemes té una morbiditat baixa, però cursa amb una alta mortalitat. Afecta sobretot a les transicions, però també la podem trobar en animals dels engreixos (Fairbrother i Gyles, 2019). Normalment cursa amb una simptomatologia

nerviosa (atàxia, descoordinació, pedaleig, etc.), que es pot confondre amb altres patògens, com ara *Streptococcus suis*. La diarrea no és habitual, però també pot aparèixer.

Pel que fa l'edema palpebral és pràcticament patognomònic d'aquest procés però no sempre està present. Normalment s'observa líquid a les cavitats toràciques i abdominals, però, en alguns animals, simplement apareix una major congestió visceral (Moxley, 2000).

#### **2.2.4 *E. coli* enterohemorràgic (EHEC)**

Un altre patotip important són les soques EHEC, degut a la seva alta patogenicitat en humans. Hi pertany el serotip O7:H157, que ha estat implicat en greu brots de toxoinfeccions alimentàries associades a *E. coli* (Currie et al., 2019; Sato et al., 2022). El seu reservori principal animal són els remugants, però també pot trobar-se en porcs tot i que és estrany que estigui implicat en casos de diarrea (Fairbrother i Gyles, 2019). La patogènia ve donada per una combinació dels mecanismes ja explicats de les soques VTEC i EPEC, pel dany als enteròcits produït per l'intimina *eae* i la inactivació dels ribosomes per part de les toxines Shiga (Gelalcha et al., 2022).

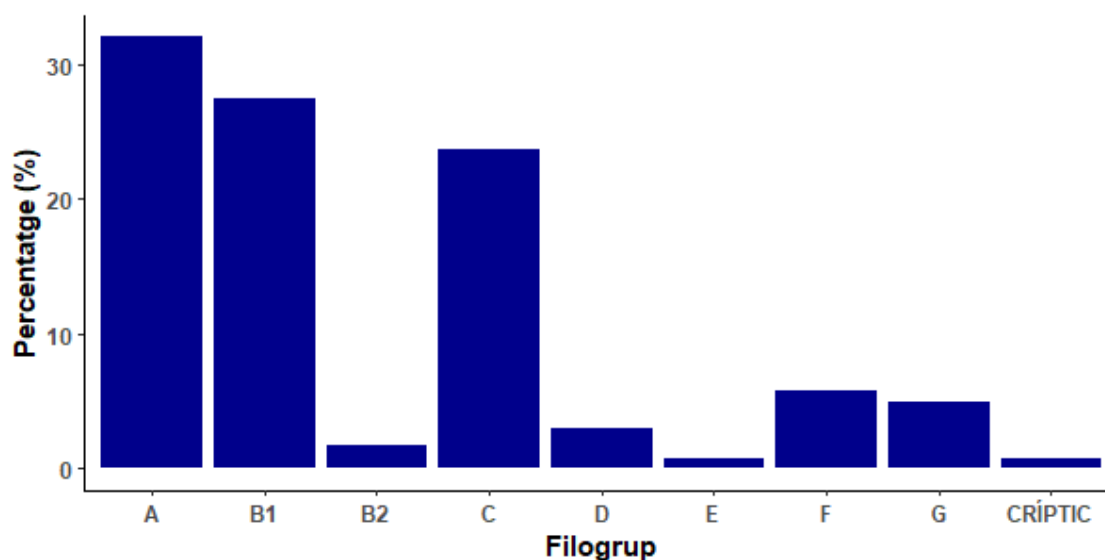
#### **2.2.5 *E. coli* patogènic extraintestinal (ExPEC)**

Finalment, tot i no causar diarrea, trobem les soques ExPEC, que causen malaltia i s'aïllen fora de l'intestí. Tradicionalment, solien afectar a les mares, causant mastitis i infeccions urinàries (Fairbrother i Gyles, 2019). Actualment, des de la restricció dels tractaments antimicrobians i la limitació de l'òxid de zinc, cada vegada s'observen més casos de septicèmia o meningitis a les transicions causats per aquestes soques ExPEC, de manera similar als casos que es troben en aus (Mageiros et al., 2021).

Els ExPEC necessiten translocar des de l'intestí cap a la circulació sanguínia i adherir-se a l'òrgan on causen malaltia, produint infeccions urinàries, mastitis, meningitis o artritis. Els factors de virulència que possibiliten això no es coneixen amb certesa en l'espècie porcina i, tot i que alguns laboratoris utilitzen els mateixos que s'analitzen en medicina humana, és complicat poder-ho predir. Sembla que la proteïna de membrana *Tol-C* podria jugar un paper important, però encara falta molt per entendre-ho (Hu et al., 2022).

Pel que fa als filogrups implicats en aquest tipus d'infeccions, en humana i en aus, com ja s'ha explicat a l'apartat 2.1, solen ser el B2 i el D. Ara bé, en el cas dels porcs, donat que no se li havia donat tanta importància a aquest tipus de soques no hi ha tanta informació. Utilitzant 571 genomes d'*E. coli* de la base de dades pública NCBI Pathogen

Detection, relacionats amb infeccions extraintestinals, s'ha vist que els més freqüents són els filogrups A (32.05%), B1 (27.5%) i C (23.64%), que en altres espècies són considerats intestinals (Garcias et al., dades no publicades) (Figura 8). Aquest fet té la limitació de no ser un mostreig aleatori i estar basat en una mostra de la qual no es té molta informació quant a metadades, però ja presenta una tendència diferent als humans i a les aus.



**Figura 8:** Freqüència dels filogrups en soques ExPEC disponibles en bases de dades públiques (Garcias et al., dades no publicades).

Finalment, s'ha vist que les soques ExPEC provinents dels animals podrien ser l'origen d'un gran nombre d'infeccions en humans (C. M. Liu et al., 2023) i, per això, tot i no estar implicades en casos de diarrea, convindria estudiar-les detingudament per comprendre les seves particularitats.

### 3. Context i prevenció de les diarrees

Fins ara, s'han descrit els principals patògens per separat, però no s'ha detallat ni la seva prevalença ni de la seva associació amb la diarrea a nivell de camp. Així, en aquest apartat s'emfatitzen aquestes qüestions i també aquelles mesures de prevenció generals de cara a frenar la diarrea.

#### 3.1. Associació de cada patogen amb la diarrea

La majoria d'estudis publicats sobre diarrea porcina se centren en la detecció d'un sol patogen, especialment dels factors de virulència d'*E. coli* (Barros et al., 2023). En el cas dels rotavirus també són molt freqüents els estudis realitzats en múltiples països, centrats sobretot en el rotavirus A que s'acostuma a trobar en freqüències i càrregues molt elevades

en els animals (VinodhKumar et al., 2020). Ara bé, també existeixen altres espècies de rotavirus com ara el B, C o H que s'han detectat arreu del món quan s'han buscat (Ferrari et al., 2022; Homwong et al., 2016).

Tot i així, hi ha diversos estudis que sí que han analitzat varis agents patògens i que avaluen el rol de les coinfeccions, tot i que només ho fan en animals malalts, deixant sense analitzar els animals sans (Boulbria et al., 2023; de la Fé Rodríguez et al., 2012; Katsuda et al., 2006; Mesonero-Escuredo et al., 2018; Wieler et al., 2008). Com ja s'ha explicat a la Figura 2, l'aparició de la malaltia no depèn només del patogen en sí, sinó també de la interacció amb l'hoste i l'ambient. Els patògens presents habitualment en els panells de diagnòstic no han canviat en els últims 50 anys, però la genètica i les condicions de cria dels animals ho han fet amb escreix. Així, el rol de cada patogen hauria de tornar a ser estudiat, perquè únicament la seva detecció podria no implicar l'aparició de diarrea.

En aquesta línia, Vidal et al. (2019) van observar que a les maternitats l'únic patogen associat amb la diarrea era el RVA, mentre que pel que fa als factors de virulència d'*E. coli*, *C. difficile* o *C. perfringens* no existien diferències significatives entre animals sans i malalts. De la mateixa manera, Eriksen et al., (2023) a les transicions i, important, després de la prohibició de l'òxid de zinc, van trobar que el RVA i les soques ETEC estaven més freqüentment en animals malalts, la qual cosa podria indicar que la prohibició del zinc podria tenir un efecte.

### **3.2. Mesures de prevenció de les diarrees en garrins.**

Així, com a resum, la diarrea porcina és una problemàtica multifactorial, on l'agent causal pel qual s'ha establert una relació causa-efecte més clara és el RVA. No obstant això, el tractament d'aquests brots moltes vegades està basat en l'ús d'antimicrobians, especialment en el deslletament, que és on més consum d'antibiòtics s'ha registrat (Dewulf et al., 2022). Tenint en compte això, l'enfocament hauria d'anar cap a la profilaxi que pot ser compartida pels diferents patògens, més que cap al tractament amb antibiòtics. Diverses mesures que van en aquesta línia i que, en general, també funcionen per la resta de problemàtiques serien:

- **Vacunació:** les vacunes confereixen immunitat contra els agents causants de diarrea. Dels agents infecciosos més habituals, existeixen vacunes per les fimbries més comunes d'*E. coli*, RVA, i *C. perfringens* tipus A i C. Generalment, aquestes vacunes s'apliquen a les truges, per tal que transfereixin la immunitat als garrins

via calostre (Chase i Lunney, 2019), però també existeixen opcions pels garrins, ja sigui via oral (Vangroenweghe i Boone, 2022) o parenteral (Ramis et al., 2022). Al mercat de l'Estat Espanyol, hi ha vacunes que contenen subunitats antigèniques de les principals fimbries d'*E. coli* i de les toxines de *C. perfringens*, que són utilitzades molt habitualment i recentment també n'ha sortit una al mercat que confereix protecció en front RVA. No hi ha vacunes disponibles per a les altres espècies de rotavirus.

- **Presa de calostre:** a diferència d'altres espècies, els porcs neixen sense cap tipus d'immunitat a causa de la placenta epiteliocorial que impossibilita la transferència d'anticossos de la mare al fetus (Furukawa et al., 2014). Per tant, és de vital importància que els porcells consumeixin el calostre durant les seves primeres hores de vida, ja que només durant aquest període es pot produir la transferència d'anticossos per pinocitosi a nivell intestinal (Weström et al., 2020). Així, amb el calostre els garrins adquiriran la immunitat maternal, que serà vital durant les primeres setmanes de vida. Per altra banda, també és el primer aliment que consumeixen els porcells i conté un contingut elevat de proteïnes, vitamines, factors de creixement i minerals que regulen el creixement i la maduració dels diferents òrgans (Thomson i Friendship, 2019), fent-lo vital per la supervivència i bona salut dels garrins.
- **Bioseguretat:** és clau de cara a evitar l'entrada de patògens (externa), com de cara a reduir la transmissió dels que ja són a dins de la granja (interna). La bioseguretat s'ha demostrat molt efectiva per reduir no només les diarrees, sinó les malalties infeccioses en general, traduint-se en una reducció de l'ús d'antibiòtics (Dohmen et al., 2017), fent-la un punt clau de cara a reduir la selecció de resistències antimicrobianes.
- **Pressió infectiva:** la neteja i desinfecció és una de les mesures més efectives, per reduir la càrrega infectiva. En aquest sentit, el sistema "tot dins tot fora" i la desinfecció dels corrals entre lots és especialment efectiu per disminuir la càrrega de patògens (Carr et al., 2018). Emperò, amb el sistema de maneig més habitual de bandes d'1 o 3 setmanes de vegades era complicat fer-ho de manera estricta i, per això, ara s'està començant a instaurar el sistema de bandes de 5 setmanes, que ho facilita.

- **Edat del deslletament:** com ja s'ha comentat el deslletament es realitza a les 3-4 setmanes de manera molt abrupta, la qual cosa genera un estrès molt gran als animals. Barceló (2009) va suggerir que l'edat del desmamament no hauria de ser menor als 28 dies, però aleshores l'òxid de zinc permetia suplir aquests problemes. Actualment, ja no està disponible i és vital aconseguir garrins més madurs al deslletament per evitar problemes. A part, s'ha observat que els garrins més petits en aquest moment tenen una mortalitat superior, fent palès la importància d'una bona qualitat de garrí al deslletament (Larriestra et al., 2006). Finalment, deslletant a les 6 setmanes s'ha observat una millor salut intestinal, que ajudaria a prevenir l'aparició de diarrea (Massacci et al., 2020), afegint més evidència de que seria interessant endarrerir l'edat de deslletament.
- **Estrès:** a part de la immunosupressió que ocasiona, al deslletament també provoca una anorèxia de fins a 24-72 hores que porta a una inflamació intestinal. Si aquesta anorèxia s'escurça, el risc de diarrea es reduirà exponencialment. Així, qualsevol mesura de maneig que millori el benestar dels animals i redueixi el seu estrès tindrà un impacte positiu en la salut dels animals. Per tant, mesures com millorar les instal·lacions, mantenir una temperatura adequada de la nau, una bona ventilació o una densitat d'animals adequada seran molt eficaces reduint la incidència de diarrea (Carr et al., 2018).
- **Dieta:** amb la diarrea neonatal no és factible modificar la dieta, ja que els animals s'alimenten de la llet de la mare, però es poden utilitzar diferents estratègies nutricionals per reduir la diarrea al deslletament. Primer, tot i no ser una estratègia nutricional com a tal, s'ha observat que començar a alimentar els animals amb un pinso altament digerible abans de desmamar-los ("creep feeding"), fa que el deslletament no sigui tan abrupte i també ajuda al desenvolupament de la microbiota i del sistema digestiu, preparant-lo pel pas a una dieta sòlida. A causa de que no tots els animals són capaços d'ingerir la quantitat de pinso necessària, l'efectivitat d'aquesta mesura està en entredit (Canibe et al., 2022).  
Altres estratègies nutricionals pròpiament dites seria reduir el percentatge de proteïna bruta del pinso al deslletament, ja que el budell immadur dels animals és incapaç de digerir-la i possibilita el creixement de bacteris patògens (Marchetti et al., 2023). No obstant això és una mesura que va en detriment de la productivitat i no s'acostuma a implementar. Una altra alternativa és reduir la capacitat d'unió a l'àcid (ABC, per les sigles en anglès "Acid Binding Capacity"), que vindria a



ser la capacitat de neutralitzar el pH de l'estómac (Lawlor et al., 2005). Un nivell alt farà que el pH gàstric es basifiqui, possibilitant infeccions per altres patògens, a banda de reduir l'àcid làctic intestinal, limitant el creixement de bacteris beneficiosos. Així, l'ABC és un paràmetre a tenir en compte en la formulació de pinsos durant el postdeslletament i es poden introduir acidificants per reduir-ho (Q. Tang et al., 2024). Un altre ingredient molt adequat per reduir-ho és el midó, perquè augmenta la quantitat d'àcids grassos de cadena curta, que acidifica el medi i permet el creixement de bacteris beneficiosos (Gao et al., 2019). També la suplementació amb niacina (vitamina B3) millora la integritat intestinal, i és interessant suplementar-la perquè la seva biodisponibilitat en els pinsos és reduïda (Dritz et al., 2019). Finalment, tot i que històricament es deia que s'havia d'evitar, ara es reconeix el paper beneficiós de la fibra bruta incrementant la mida de les vellositats intestinals (Gao et al., 2019).

- **Probiòtics i prebiòtics:** en els darrers anys tant els probiòtics com els prebiòtics estan agafant molta popularitat en nutrició, tant humana com animal (Wiegers et al., 2023). Els probiòtics són microorganismes vius, com ara bacteris i fongs, que, quan es consumeixen en quantitats adequades, arriben a l'intestí en estat actiu i poden proporcionar beneficis per a la salut de l'hoste (Dubreuil, 2017). No obstant això, el seu ús genera controvèrsia, perquè de vegades és difícil trobar una relació de causa-efecte amb l'efecte beneficiós. Per això, de vegades es prefereixen els prebiòtics, ingredients dietètics fermentats de manera selectiva que provoquen modificacions específiques tant en la composició com en l'activitat de la microbiota, resultant en efectes fisiològics beneficiosos per a l'hoste (Dubreuil, 2017). Amb els prebiòtics és més fàcil d'establir la relació causa-efecte d'aquesta relació. Els més utilitzats són oligosacàrids com els fructooligosacàrids (FOS) o els galactooligosacàrids (GOS), que augmenten la producció d'àcids grassos de cadena curta, que provoquen la proliferació de bacteris beneficiosos com els *Lactobacillus* (Gresse et al., 2017).
- **Tractaments alternatius:** la forma de controlar la diarrea, especialment al deslletament, es basava en l'ús d'antibiòtics i l'òxid de zinc de manera preventiva. Emperò les restriccions actuals ha fet que s'hagin d'utilitzar alternatives. Una d'elles és l'ús de bacteriòfags, que poden utilitzar-se per atacar bacteris concrets. S'han demostrat eficaços pel control de les soques ETEC a les transicions, però el seu ús encara no està estès com a mètode de tractament o de control (C. Y. Lee

et al., 2017). No obstant això, no són una solució definitiva perquè, ben igual que amb els antibiòtics, els bacteris poden esdevenir resistents als bacteriòfags (Labrie et al., 2010).

També, de la mateixa manera que s'introdueixen en els pinsos per reduir l'ABC, poden utilitzar-se acidificants de l'aigua que impedeixen que els patògens actuïn i tenen menys impacte sobre la microbiota (Guitart-Matas et al., 2024; Heo et al., 2013). En la mateixa línia, els olis essencials i els extractes de plantes poden jugar un paper per la seva acció antibacteriana, antiviral i antioxidant (Manzanilla et al., 2004; Tian i Piao, 2019). Finalment, l'ús d'anticossos dirigits contra les fimbries d' *E. coli*, derivats del rovell d'ou i del plasma sec, s'ha suggerit com una possible alternativa per estimular la immunitat. Tot i això, es requereix més investigació en aquest àmbit per validar-ne l'eficàcia (Pérez-Bosque et al., 2016; Z. Wang et al., 2019).

#### **4. Resistència als antimicrobians**

Com ja s'ha explicat, hi ha moltes possibles causes de la diarrea, però, donat que els animals són molts sensibles i es necessita un tractament ràpid, no s'arriba a un diagnòstic acurat definitiu, per la qual cosa, s'acaba tractant les diarrees amb antibiòtics com si la causa fos bacteriana. Aquest elevat ús d'antibiòtics afavoreix la selecció de bacteries resistents, fent que els nivells de resistència en l'espècie porcina siguin molt elevats (Cameron-Veas et al., 2015; Miguela-Villoldo et al., 2019).

En el present capítol, es desenvolupa aquesta problemàtica, posant el focus en aquells aspectes més importants de la producció porcina i es posa en context el risc que suposa per la salut pública.

##### **4.1 Importància general de les resistències antimicrobianes**

Un antimicrobià és aquella substància capaç d'inhibir el creixement o eliminar els bacteris. La penicil·lina va ser descoberta per Fleming el 1928, quan va observar les propietats antibacterianes del fong *Penicillium chrysogenum* o *notatum*, però no va ser fins al 1942 quan va ser purificada per Ernest Chain i Howard Florey, la qual cosa va permetre el seu ús massiu, tot i que fins el 1945 només va ser utilitzada pels països aliats de la II Guerra Mundial. Aquesta troballa va suposar una revolució mèdica, salvant milions de vides i durant els anys següents es van anar descobrint multitud d'antibiòtics, com ara les tetraciclines, els aminoglicòsids o els fenicòls (Davies, 2006). Els antibiòtics

a part de salvar vides en casos d'infeccions, també han permès realitzar procediments quirúrgics “bruts” que d'una altra manera haguessin estat impossible. A més, han estat àmpliament utilitzats en ramaderia i agricultura pel notable augment de la productivitat dels animals i dels vegetals (Manyi-Loh et al., 2018).

No obstant això, el mateix Fleming en l'entrevista que li van fer després d'atorgar-li el Premi Nobel en el 1945 ja va constatar que els bacteris trobarien maneres d'evitar l'acció dels antibiòtics (Fleming, 1945). Tot i no ser cert al 100%, doncs sempre han existit bacteris resistents fins i tot abans de la invenció dels primers antibiòtics (Perry et al., 2016), ja està més que acceptat que l'ús (sobretot el mal ús i l'abús) dels antimicrobians comporta l'aparició de resistències (Davies i Davies, 2010).

Així va néixer al concepte de resistència als antimicrobians (RAM), definit com la capacitat dels microorganismes de sobreviure a l'ús d'aquests compostos. Els bacteris poden anar acumulant resistència a diferents antibiòtics. Per això, Magiorakos et al., (2012) van desenvolupar una terminologia per classificar aquells bacteris resistents:

- **MDR:** per les sigles en anglès de “MultiDrug Resistance”, són aquelles soques resistents a més de tres famílies d'antimicrobians.
- **XDR:** les soques “Extended Drug Resistance” són aquelles resistents a totes les famílies d'antimicrobians, excepte dues.
- **PDR:** quan no existeix cap opció terapèutica se'l considera “PanDrug Resistance”.

L'any 2019, la manca d'efectivitat dels antibiòtics va ser la causa directa de 1,27 milions de morts i la causa atribuïble d'unes altres 4,95 milions. Aquestes morts es trobaven majoritàriament associades amb sis patògens en concret: *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* i *Pseudomonas aeruginosa* (Murray et al., 2022). Aquests números són molt preocupants, ja que converteixen l'antibiorresistència en la tercera causa de mort al 2019, només per darrere de les malalties coronàries i dels infarts (Abbfati et al., 2020).

Emperò, la situació és bastant diferent entre els països en desenvolupament i els desenvolupats. Aquests darrers volen centrar els esforços en el desenvolupament de nous antibiòtics. Però aquesta estratègia té dos problemes. El primer és que els bacteris, d'acord amb els principis evolutius de Darwin, sempre troben una manera d'esdevenir resistents i sempre hi haurà noves soques que no seran sensibles a l'acció dels antibiòtics. El segon

té més a veure amb un problema de comercialització i distribució, ja que aquests antibiòtics tenen un cost molt elevat i pot ser complicat pels països en via de desenvolupament aconseguir-los. Per això, aquest països, on la mortalitat associada a la RAM ve donada per la falta d'accés a segons quins antibiòtics, s'intenten centrar més en evitar les infeccions millorant les condicions de vida (Mendelson et al., 2024).

De totes formes, l'ús d'antibiòtics no és l'únic factor que afavoreix les RAM, de fet s'han descrit d'altres com ara la pol·lució (Z. Zhou et al., 2023), l'increment de temperatures (MacFadden et al., 2018), el tabac (Lacoma et al., 2019) o els metalls pesants (Gillieatt i Coleman, 2024). Això demostra que els mecanismes de resistència són quelcom més complexes del que es pensava, la qual cosa complica molt el seu control.

Finalment, i per acabar d'agreuja aquesta problemàtica, el fet d'utilitzar els antibiòtics tant en la ramaderia com l'agricultura, es generen altres zones de pressió selectiva pels bacteris, que poden involucrar al medi ambient, transmetent-se una altra vegada cap a les persones i els animals. Tot i que aquest concepte es desenvoluparà en el proper apartat, cal remarcar que la RAM no només es genera, sinó que també es pot transmetre a través de l'ambient als animals i a les persones. Per tota aquesta complexitat, la RAM ha estat definida com la cinquena essència del concepte "Una Sola Salut", entesa com la interdependència de la salut humana, la salut animal i els ecosistemes (Robinson et al., 2016).

#### 4.2 Mecanismes de resistència

Les resistències als antibiòtics es poden classificar en funció del seu mecanisme de transmissió en:

- **Innates o intrínseques:** principalment estan basades en el fet que l'antibiòtic és incapaç d'arribar a la seva diana del bacteri. Aquest és el cas de les polimixines amb els bacteris gram-positius, perquè el seu mecanisme es basa en unir-se als lipopolisacàrids (LPS) de la membrana externa dels gram-negatius, i els gram-positius no disposen d'aquesta, impossibilitant la seva acció (Mohapatra et al., 2021). Però també pot ser que certes espècies bacterianes hagin incorporat certs gens de resistència, per exemple és el cas d'*E. coli* amb el gen *mdf(A)*, que codifica per un bomba d'eflux que expulsa els macròlids (Edgar i Bibi, 1997).
- **Adquirides o extrínseques:** són aquelles on la soca bacteriana inicialment era sensible i adquireix la resistència *de novo* o de fora. Pot ser a causa d'una mutació

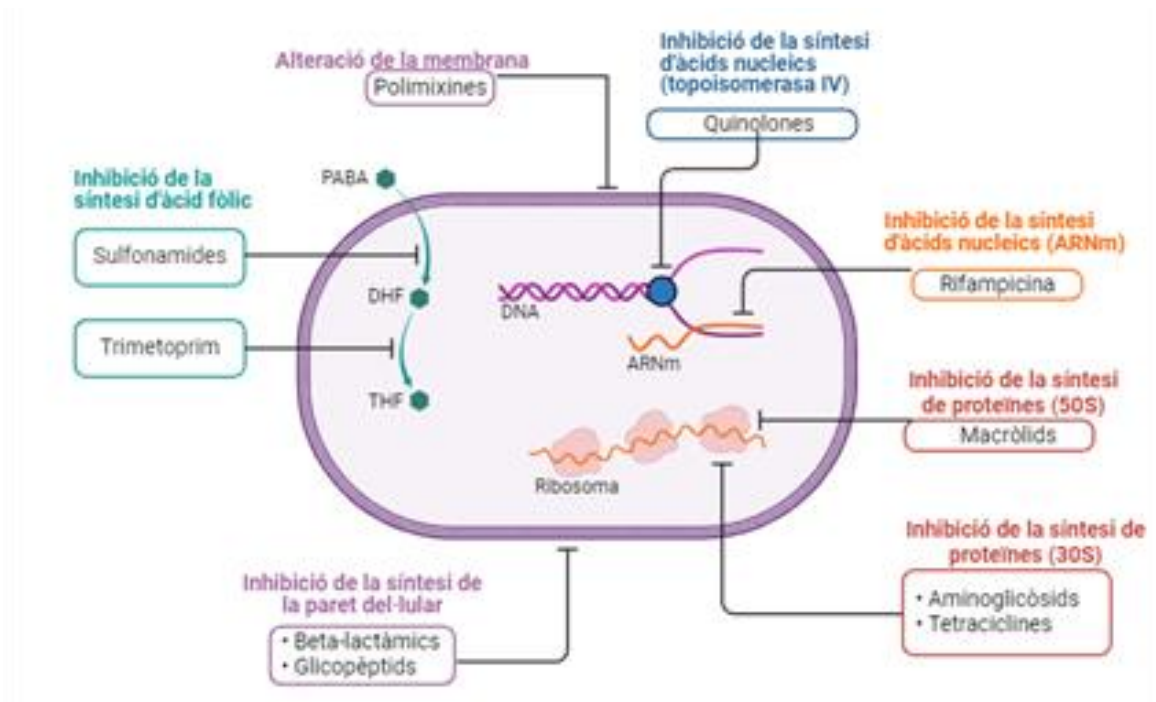
puntual en el cromosoma o que hagi adquirit un gen que confereix resistència a través d'elements mòbils com ara plasmidis, transposons, integrons, seqüències d'inserció o bacteriòfags. En el cas del porcí, el focus se sol posar principalment en l'adquisició de gens de resistència (ARG), ja que, apart de fer que els tractaments antimicrobians no funcionin, són els que tenen més risc de transmetre's als humans.

### 4.3 Classificació dels antimicrobians i del seu mecanisme de resistència

Els distints antibiòtics existents, a grans trets, es poden classificar en dos gran grups, en funció de la seva capacitat d'inhibir el creixement bacterià:

- **Bacteriostàtics:** són aquells que mantenen el bacteri en fase estacionària, és a dir, no permeten la seva replicació, però tampoc l'eliminen (Pankey i Sabath, 2004). Alguns exemples són les tetraciclins, les sulfonamides o el trimetoprim. Se solen utilitzar quan el pacient no està immunosuprimit, perquè es precisa del sistema immunitari per acabar amb el bacteri.
- **Bactericides:** són aquells que eliminen per complet el bacteri (Baquero i Levin, 2021). Aquí trobem famílies com els beta-lactàmics o els glicopèptids. També la combinació de dos antibiòtics bacteriostàtics com les sulfonamides i el trimetoprim pot esdevenir bactericida.

Una classificació més acurada es basa en famílies d'antibiòtics segons el seu mecanisme d'acció. Les més importants són les següents: aminoglicòsids, ansamicines, beta-lactàmics, fenicòls, glicopèptids, lincosamides, macròlids, nitroimidazols, oxazolidinones, polimixines, quinolones, sulfamides, tetraciclins i el trimetoprim. Els mecanismes d'acció es basen principalment en la inhibició de la síntesi de proteïnes, de la paret cel·lular, d'àcids nucleic i d'àcid fòlic, juntament amb l'alteració de la membrana (Figura 9).



**Figura 9:** Mecanismes d'acció dels diferents antibiòtics. Modificat a partir de la il·lustració compartida a Biorender per Javier Ríos.

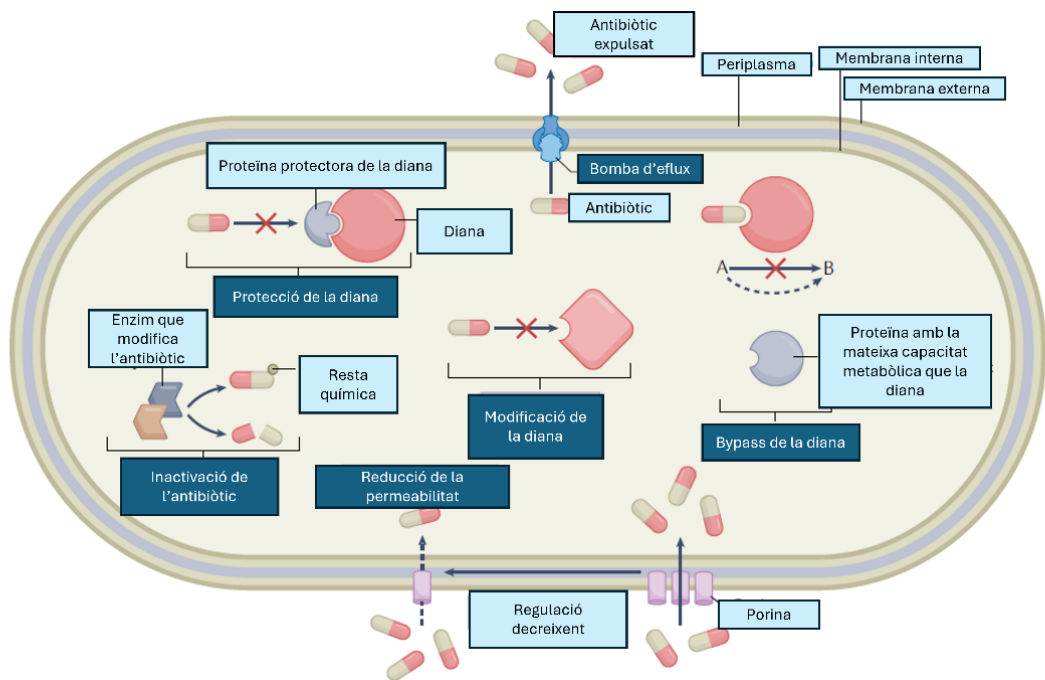
Aquesta existència de múltiples mecanismes d'acció ha fet que els bacteris desenvolupin també múltiples mecanismes de resistència (Figura 10), basats en quatre principis: reduir la concentració de l'antibiòtic a la cèl·lula, modificar el lloc d'unió de l'antibiòtic, inactivar l'antibiòtic o la competència pel lloc actiu.

Per reduir la concentració d'antibiòtic, els mecanismes més habituals són les bombes de flux (Lorusso et al., 2022). Per exemple, els gens *tet*, que codifiquen bombes per expulsar les tetraciclines (W. Wang et al., 2014), o la reducció de la permeabilitat de la membrana mitjançant mutacions puntuals en els gens que codifiquen per les porines i que permeten a l'antibiòtic entrar a la cèl·lula (G. Zhou et al., 2023).

Pel que fa a la inactivació de l'antibiòtic, els més típics són les beta-lactamases, que degraden l'anell dels beta-lactàmics (Bush, 2018); també és molt comú la modificació enzimàtica dels aminoglicòsids a través d'acetiltransferases (gens *acc*), nucleotidiltransferases (*ant*) o fosfotransferases (*aph*) (Wachino et al., 2020).

Basats en la modificació de la diana trobem el cas dels gens *mcr*, que confereixen resistència a la colistina, codificant la producció de la fosfoetanolamintransferasa, el qual modifica la membrana externa de la cèl·lula i impedeix la unió de l'antibiòtic (B. Li et al., 2020).

Finalment, relacionats amb la competència pel lloc d'unió amb l'antibiòtic trobem la protecció de la diana, és a dir, el recobriment de la diana antibiòtica per una proteïna similar. Un exemple són els gens *qnr*, que confereixen resistència a les quinolones, que produeixen unes proteïnes que s'adhereixen a les topoisomereses i impedeixen la replicació (Wilson i Török, 2018). També existeix un altre mecanisme similar conegut com bypass de la diana, que es basa en la sobreproducció de la diana fent que es necessiti una major concentració d'antibiòtic per eliminar el bacteri. L'exemple més clar és la resistència al trimetoprim mediada pel gens *dhfr*, que estimulen la producció de l'àcid fòlic i, per tant, l'antibiòtic s'uneix a totes les molècules que hi havia, però els nivells d'àcid fòlic es mantenen.



**Figura 10:** Mecanismes més comuns de resistència dels bacteris als antibiòtics. Modificat de Darby et al. (2023).

Històricament s'ha pensat que aquests mecanismes tenen un cost adaptatiu (“fitness cost”, en anglès) i que quan es deixaven d'utilitzar els antibiòtics en qüestió els gens o les mutacions desapareixerien (Palmer i Kishony, 2013). Però la realitat és una altra, ja que no és cert per tots els bacteris i gens de resistència. Un clar exemple d'això el trobem en els mecanismes de resistència innata, a on els gens que s'han acabat incorporant al cromosoma de certes espècies bacterianes, com ara el cas de *mdf(A)* amb *E. coli* (Edgar i Bibi, 1997) o *aac(6')-Iaa* amb *Salmonella* (Serrano-Fujarte et al., 2024), fan que, per molt que no s'utilitzin macròlids o aminoglicòsids, aquests bacteris segueixen essent resistents

a aquestes famílies. Però, a part, també existeixen mutacions o gens sencers que actuen compensant aquest extra de cost adaptatiu i poden fer que la resistència es mantingui (Millan et al., 2014). També és possible la co-selecció per la presència de més d'un gen diferent en un plasmidi, fent que per molt que es redueixi l'ús d'un compost, si se n'utilitza un altre, el gen persisteixi. En aquesta línia, també s'ha observat que nivells alts de conjugació promouen el manteniment dels gens a la població bacteriana (Lopatkin et al., 2017). En definitiva, eliminar els mecanismes de resistència no és tan simple com deixar d'utilitzar l'antibiòtic en qüestió.

#### **4.4 Relació entre les resistències antimicrobianes als hospitals i a la ramaderia**

El nombre de morts causades per la manca d'efectivitat dels antibiòtics és molt elevat i no para de créixer, sent especialment molt greus i predominants en els hospitals d'humana (Murray et al., 2022), que són punts amb un consum molt elevat d'antibiòtics.

Paral·lelament, com ja s'ha comentat, els antimicrobians també són utilitzats en agricultura i ramaderia. Durant molts anys van ser utilitzats com a promotors del creixement a concentracions subterapèutiques degut a l'efecte innegable en el guany de pes diari i la millora de l'índex de conversió (Fernández Miyakawa et al., 2024). Però, aquesta pràctica portava implícita un risc molt gran d'incrementar el percentatge de bacteris resistents i per això la Unió Europea va prohibir l'ús d'antibiòtics com a promotors de creixement a partir de l'1 de gener de 2006. No obstant això, els antibiòtics, amb diferències entre països, van seguir essent utilitzats en gran mesura (Dewulf et al., 2022), moltes vegades per suplir deficiències en el maneig, i han fet que els nivells de resistència en ramaderia siguin molt alts (Aguirre et al., 2020; Brennan et al., 2016).

En aquesta línia, s'ha observat a nivell nacional una relació epidemiològica entre el consum d'antibiòtics en animals i l'increment de les resistències en humans (Allel et al., 2023). Però el debat a nivell científic segueix obert i diversos estudis han buscat la relació a nivell genòmic entre els bacteris aïllats dels animals de granja i aquells presents als hospitals. Així, sembla que la relació és clara en aquells països en vies de desenvolupament, on els contactes amb els animals d'abastament és més estret i es troba una relació entre les soques clíniques humanes i aquelles aïllades dels animals (Gay et al., 2023; Miltgen et al., 2022; Muloï et al., 2022), però aquesta relació costa més d'observar en els països desenvolupats, on els animals es troben en granges aïllades (Gouliouris et al., 2018; Ludden et al., 2019; Thorpe et al., 2022) i la contribució de les soques dels



animals de granja a l'adquisició de gens de resistència en bacteris nosocomials seria limitada.

Ara bé, com ja s'ha comentat, els bacteris presenten elements genètics mòbils, com els plasmidis, que poden transmetre informació genètica, entre els quals es troben els gens de resistència. Quan l'anàlisi s'ha centrat en aquests elements, s'ha observat que, tot i que l'efecte no és immediat, juguen un paper clau en la transmissió de gens de resistència i acaben modelant el genoma de les soques bacterianes que afecten als humans (C. M. Liu et al., 2023; Matlock et al., 2023). Així, quan s'estudien els bacteris resistents als antibiòtics dels animals d'abastament el focus hauria de dirigir-se cap als plasmidis.

A part, s'ha observat que aquelles persones en contacte més estret amb els animals de granja, ja siguin veïns o treballadors de la granja i l'escorxador, tenen un risc més gran de ser portadors de *Staphylococcus aureus* resistents a la meticil·lina (MRSA, per les seves sigles en anglès de "Meticillin resistant *Staphylococcus aureus*") (Dorado-García et al., 2013; Reynaga et al., 2018) o un major nombre de gens de resistència en el seu microbioma (Van Gompel et al., 2020). També, dintre de la mateixa granja, s'ha observat que porcs i grangers poden compartir els mateixos plasmidis amb gens de resistència (Viñes et al., 2021), la qual cosa fa palesa la transmissió de soques i plasmidis entre els humans i els animals en contacte estret, així que els grangers i els veterinaris haurien de ser els principals interessats en reduir el consum d'antibiòtics.

Finalment, també se sap que molts dels gens de resistència actuals tenen el seu origen en mostres ambientals o d'animals. L'aparició del gen *mcr-1* a la Xina n'és un exemple clar, ja que té un origen en l'aqüicultura i després es va transmetre a mostres d'animals, per acabar afectant les persones (Y. Shen et al., 2018).

#### **4.5 Relació de les resistències als antibiòtics i l'ús dels metalls pesants**

No només l'ús dels antibiòtics genera l'aparició de resistències, sinó que l'exposició ambiental a compostos com els metalls, els biocides i fàrmacs no antibiòtics com puguin ser els antiinflamatoris no esteroidals o els anticancerígens, poden incrementar les AMR (Murray et al., 2024).

En el cas de la indústria porcina, l'acció dels metalls té especial rellevància perquè compostos com el sulfat de coure o especialment l'òxid de zinc, s'han utilitzat com additius durant molts anys per prevenir l'aparició de diarrea i millorar el guany de pes diari dels animals, però que al mateix temps contaminen els sòls (Daraei et al., 2024). Per

això, el 2022 la Unió Europea va prohibir-ne el seu ús en les altes dosis que s'utilitzaven fins al moment, limitar-ne el seu ús només permetent dosis molt reduïdes. Tot i així, encara es continua utilitzant a altres regions del món. A part de la contaminació ambiental, un dels motius esgrimits per a la seva prohibició ha estat el possible risc de co-selecció de resistència als antibiòtics (AEM, 2017). En aquesta línia, utilitzant la metagenòmica s'ha observat que l'ús de zinc augmentava el nombre de gens de resistència (Ortiz Sanjuán et al., 2024). No obstant això, el mecanisme pel qual succeeix encara no queda clarificat.

Així, existeixen tres principals mecanismes pels quals l'exposició a metalls pot generar resistència als antibiòtics:

- **Co-resistència:** pot passar que els gens de resistència als antibiòtics i als metalls coincideixin en el mateix element genètic mòbil, típicament integrons o plasmidis. Així, s'ha observat que aquells plasmidis que tenien gens de tolerància als metalls era més probable que tinguessin gens de resistència i que fossin conjugatius (Pal et al., 2015).
- **Resistència creuada:** un mateix mecanisme de resistència pot funcionar a la vegada per dos compostos. És típic especialment en mecanismes especialitzats amb bombes d'eflux (Sincak et al., 2023).
- **Co-regulació:** els gens de resistència als antibiòtics i als metalls poden compartir mecanismes transcripcionals i, per tant, la seva expressió estarà correlacionada de forma que si s'activa una via l'altra també ho farà i s'expressarà el gen de resistència en qüestió (Perron et al., 2004).

Aquests serien els mecanismes directes, però els metalls poden tenir altres maneres per disseminar les resistències. Per exemple, s'ha observat que l'òxid de zinc genera canvis en la microbiota (W. Wang et al., 2019), la qual cosa pot fer que se seleccionin espècies bacterianes que tendeixin a tenir més gens de resistència, ja sigui en el cromosoma o perquè són portadores de més plasmidis de resistència. Per altra banda, també el metall generen un estrès oxidatiu, que incrementa l'expressió dels gens de resistència (Ekhlhas et al., 2023), tot i que encara falta molt per comprendre totalment el mecanisme. Finalment, també poden incrementar la transmissió del gens de resistència degut a l'increment del rati de conjugació dels plasmidis, però tampoc està clar el mecanisme (Palm et al., 2022).

#### 4.6 Famílies d'antimicrobians de rellevància per a la salut pública

Existeixen moltes famílies d'antimicrobians diferents. Emperò, no totes s'utilitzen en les mateixes circumstàncies, ja que s'intenta preservar al màxim l'eficàcia d'aquelles que encara són efectives i el seu ús es reserva per quan no queden altres opcions. Concretament pel seu ús en ramaderia, l'Agència Europea del Medicament (AEM) ha creat una categorització dels antibiòtics per tal de preservar la seva eficàcia, sobretot de cara a la salut pública (Taula 3). En els animals de producció, a part de demanar proves de sensibilitat antibiòtica abans de començar els tractaments, s'han d'utilitzar primerament aquells antibiòtics de la categoria D, després els de la categoria C i, finalment, si no funcionen els de la C es poden utilitzar de categoria B. En canvi, els antibiòtics de la categoria A estan prohibits en ramaderia, ja que es tracten de fàrmacs d'última opció terapèutica en humana.

**Taula 3:** Categorització de la EMA dels antibiòtics pel seu ús en animals de producció

<b>Categoria</b>	<b>Utilització</b>	<b>Famílies</b>
<b>A</b>	No utilitzar	Cefalosporines de 5 <sup>a</sup> generació, carbapenems, fosfomicina, glicopèptids, glicilciclins, monobactams, oxazolinions, riminofenazines, sulfones
<b>B</b>	Restringit (última opció)	Cefalosporines de 3 <sup>a</sup> i 4 <sup>a</sup> generació, fluoroquinolones, polimixines
<b>C</b>	Cautela (segona opció)	Aminoglicòsids, aminopenicil·lins + inhibidors de les beta-lactamases, fenicols, cefalosporines de 1 <sup>a</sup> i 2 <sup>a</sup> generació, cefamicines, macròlids, lincosamides, pleuromutil·lins, rifamicines
<b>D</b>	Prudència (primera opció)	Bacitracina, metronidazol, penicil·lins, àcid fusídic, sulfonamides i trimetoprim (i combinacions), tetraciclins

Pel que fa als ARG, des d'un punt de vista de salut pública, serà especialment interessant detectar aquells que confereixen resistència a les categories A i B. Pel que fa als de la categoria A, a l'Estat espanyol i en animals de granja, per sort són molt estranys i, a part de trobar *Enterococcus* spp resistents a la vancomicina (Ramos et al., 2012), fins ara no s'han detectat, en contrast amb altres indrets del món on s'han detectat carbapenemases (Diaconu et al., 2020) o gens de resistència a les glicilciclins (X. Lu et al., 2022).

Pel que fa a la categoria B, tot i haver-se reduït molt el seu ús arran del programa REDUCE, han estat utilitzats durant molts anys en medicina veterinària i és relativament

habitual trobar-ne gens de resistència. Els que més preocupen són les beta-lactamases d'espectre estès (BLEE) i els gens de resistència a la colistina.

#### 4.6.1 Gens de resistència als beta-lactàmics

Els beta-lactàmics són un grup d'antibiòtics que tenen un anell beta-lactàmic al seu nucli i actuen inhibint la síntesi de la paret bacteriana.

Certs bacteris produeixen enzims anomenats beta-lactamases, que poden descompondre diversos tipus d'antibiòtics com els beta-lactàmics, les cefalosporines, les cefamicines i els carbapenems. Tot i que aquests enzims ja existien abans de l'ús d'antibiòtics, l'ús extensiu d'aquests medicaments ha incrementat la seva prevalença i ha contribuït a l'aparició de noves variants (Bush, 2018). Segons la classificació de Bush i Jacoby (2010), les beta-lactamases es poden categoritzar en tres grups basats en la seva funcionalitat i en quatre classes segons la seva seqüència d'aminoàcids (A-D) (Taula 4).

**Taula 4:** Classificació de les beta-lactamases d'acord amb el grup i la classe, i exemples dels gens de resistència més típics.

Funció	Grup	Classe	Exemple de famílies	Exemple de gens de resistències
Cefalosporinases	1	C	AmpC	CMY-1, CMY-2, DHA-2
Serine beta-lactamases	2	A	TEM, SHV, CTX-M	TEM-1B, SHV-11, CTX-M-1
		D	OXA	OXA-1, OXA-48
Metallo beta-lactamases	3	B	VIM, IMP, NDM, GES	VIM-1, IMP-1, NDM-1, NDM-4, GES-2

Els enzims del grup 1, classificats com a classe C, són cefalosporinases. Els gens que codifiquen aquests enzims es localitzen majoritàriament als cromosomes dels bacteris de la família *Enterobacteriaceae*, encara que també es poden trobar en alguns plasmidis. Els més importants d'aquest grup són els gens AmpC. Aquests enzims confereixen resistència als beta-lactàmics, incloent inhibidors de beta-lactamases com el clavulànic, així com a penicil·lines, cefamicines i cefalosporines de primera, segona i tercera generació. No obstant això, són vulnerables a la cefepima (una cefalosporina de quarta generació) i als carbapenems (Ghafourian et al., 2014). Dos exemples són els gens *bla*<sub>CMY-2</sub> i *bla*<sub>DHA-1</sub>, que s'han detectat en l'espècie porcina (Seo et al., 2022; Yu et al., 2021).

Els enzims del grup 2 contenen una serina en la seva estructura i solen trobar-se en plasmidis, fet que afavoreix la seva transmissió horitzontal. Aquest grup inclou les classes A i D. Dintre de la classe A, hem de considerar especialment les BLEE, la prevalença de les quals ha augmentat molt i confereixen resistència a les cefalosporines de tercera i quarta generació i a l'aztreonam, per la qual cosa generen una gran preocupació a nivell de salut pública (Kumar et al., 2014). Els tipus més freqüents de BLEE inclouen *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* (tot i que no tots aquests gens són BLEE) i *bla<sub>CTX-M</sub>*. Originalment, els gens *bla<sub>TEM-1</sub>* i *bla<sub>SHV-1</sub>* proporcionaven resistència a les penicil·lines i a les cefalosporines de primera i segona generació, però no afectaven les cefalosporines de tercera generació ni els carbapenems. Amb el temps, les mutacions d'aquests gens van donar lloc a noves variants, com el *bla<sub>TEM-2</sub>*, que poden hidrolitzar també les cefalosporines de tercera i quarta generació, així com els monobactàmics com l'aztreonam (Ghafourian et al., 2014). En el cas de *bla<sub>CTX-M</sub>*, l'origen no està clar, però es va trobar per primera vegada en cromosomes de *Kluyvera* spp (W. H. Zhao i Hu, 2013).

La detecció de les BLEE és molt típica en l'espècie porcina i s'ha descrit a múltiples països, en freqüències per sobre del 20% (Dohmen et al., 2017; Lima et al., 2022; Trongjit i Chuanchuen, 2021). Catalunya no n'és cap excepció i s'ha detectat en freqüències sobre el 15% a les maternitats (Aguirre et al., 2020; Vidal et al., 2020).

L'altre classe de serine beta-lactamases és la D. Dintre d'aquesta categoria, hem de destacar els gens *bla<sub>OXA</sub>*. Es tracta d'un grup molt divers, on es classifiquen d'acord amb l'evolució que han anat seguint. Depenent del tipus, o bé només confereixen resistència a cefalosporines de primera i segona generació (com és el cas del tipus *bla<sub>OXA-1</sub>*), ser BLEE (tipus *bla<sub>OXA-23</sub>*) o ser capaços de fins i tot hidrolitzar els carbapenems (tipus *bla<sub>OXA-48</sub>*) (Evans i Amyes, 2014). Generen molta preocupació en ambients nosocomials, especialment el tipus *bla<sub>OXA-48</sub>*, però a l'Estat Espanyol no s'han detectat mai en els porcs. Tot i això, sí que s'han trobat en altres països (Pulss et al., 2017).

Les beta-lactamases del grup 3, conegudes com a metal·lobeta-lactamases i classificades com a classe B, inclouen famílies com *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* o *bla<sub>GES</sub>*. Aquests enzims es distingeixen per la presència d'una o dues molècules de zinc en el seu lloc actiu. Solen estar localitzats en plasmidis conjugatius i proporcionen resistència a tots els beta-lactàmics, excepte als monobactàmics (Palzkill, 2013), per la qual cosa generen també una gran preocupació a nivell hospitalari. Tampoc s'han detectat mai a Espanya en els

porc, però sí que s'han detectat a altres països (Diaconu et al., 2020; Garofalo et al., 2024; Irrgang et al., 2017; X. Lu et al., 2022).

#### **4.6.2 Gens de resistència a la colistina**

La colistina o polimixina E pertany a la família de les polimixines i actua trencant la membrana cel·lular dels bacteris gram-negatius. Va començar a utilitzar-se el 1959 (Kawahara et al., 1950), però en medicina humana va deixar d'utilitzar-se degut a la seva toxicitat renal i neurològica (Spapen et al., 2011) i el 1970 es va restringir només per ús oftàlmic i tòpic (Koch-Weser et al., 1970). L'emergència de bacteris multirresistents (MDR) en els darrers anys l'ha recuperada per l'àmbit hospitalari, sent considerada ara com un antibiòtic d'última opció per a bacteris gram-negatius MDR (Dhariwal i Tullu, 2013).

L'ús de la colistina ha estat diferent en la ramaderia i, especialment, en la producció porcina, on s'ha utilitzat àmpliament durant molts anys per prevenir l'aparició de diarrea als garrins deslletats. El fet que la seva absorció via oral sigui baixa, fa que el fàrmac actui pràcticament només a nivell intestinal i la fa una molt bona elecció per infeccions gastrointestinals, per això s'administrava amb el pinso en les transicions per prevenir les diarrees (Rhouma et al., 2016). Per tant, ha estat l'eina per substituir unes pràctiques de maneig deficientes durant el deslletament (Rhouma et al., 2017). Inicialment, tot i que es reprengué l'ús de la colistina com a fàrmac d'última elecció en medicina humana, la situació en la ramaderia no preocupava massa al sector ja que només es coneixien els mecanismes de resistència basats en mutacions puntuals en el cromosoma, que només es podien transmetre verticalment i per tant, reduïa enormement el risc de transmissió d'animals a persones. Això fa un gir inesperat quan Y. Y. Liu et al. (2016) van descobrir el gen *mcr-1* que conferia resistència a la colistina i es podia transmetre horitzontalment a través de plasmidis, la qual cosa va fer saltar totes les alarmes sanitàries.

El gen *mcr-1* té el seu origen en el cromosoma del patogen respiratori *Actinobacillus pleuropneumoniae*, que es va mobilitzar cap a les enterobactèries a partir de la seqüència d'inserció IS*AplI* (Snesrud et al., 2016). En els enterobacteris, es va integrar majoritàriament en plasmidis, especialment en tres plasmidis conjugatius IncI2, IncX4 i IncHI2, (Matamoros et al., 2017). Això va facilitar molt la seva transmissió i va fer que la seva prevalença, tant en persones com en animals, fos molt elevada, especialment a la Xina (Jiang et al., 2020; C. Shen et al., 2020).

Arran d'això, a nivell europeu es va introduir una restricció d'ús de la colistina per només com última opció terapèutica (AEM, 2016). A Espanya, es va seguir la legislació europea i es va introduir el programa REDUCE Colistina, per la qual cosa el seu ús és pràcticament inexistent actualment en producció animal.

Aquestes mesures han estat molt efectives per reduir els nivells de resistència i de *mcr-1* (Jiang et al., 2020; Miguela-Villoldo et al., 2022; C. Shen et al., 2020). De fet, calculant un 30% del cost adaptatiu de *mcr-1* en un context on no es fa ús de l'antimicrobià (Q. Yang et al., 2017), aquest gen ja hauria d'haver desaparegut, però no és el cas i se segueix detectant en granges porcines del nostre territori (García et al., 2022; Vidal et al., 2020).

En aquesta línia, s'ha observat que el gen té mecanismes per reduir el seu cost adaptatiu. El més bàsic és integrar-se en els plasmidis IncI2 i IncX4 (Wu et al., 2018). Després, també s'ha observat que s'ha produït una pèrdua d'*ISAp11*, la seqüència que originalment va permetre que es mobilitzés des de les soques d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (R. Wang et al., 2018). Això és així, perquè, mitjançant aquest mètode de transmissió, es genera una sobre expressió i un major nombre de còpies de *mcr-1*, per la qual cosa la seva pèrdua provoca un menor cost energètic pel bacteri i li proporciona un benefici adaptatiu (Y. Lu et al., 2022). També, recentment, s'ha observat que en la regió promotora del gen, que en controla l'expressió i la traducció, s'han produït una sèrie de mutacions que en reduïen el cost adaptatiu (Ogunlana et al., 2023). Tot i que l'estudi d'aquestes troballes, a nivell epidemiològic, s'ha realitzat principalment a la Xina, posa de relleu que, malgrat el cessament de l'ús de la colistina, el gen *mcr-1* no s'eliminarà completament de les poblacions.

També existeixen altres gens que confereixen resistència a la colistina, trobant-se fins a deu gens diferents (*mcr 1-10*). *mcr-1* és el més comú en humans i animals, però en mostres ambientals el més comú (tot i, curiosament, sembla que no confereix resistència a la colistina (Tyson et al., 2020) és el *mcr-9* (Martiny et al., 2022). Concretament, en el cas del porcí, la majoria d'estudis també detecten el *mcr-1* com el gen més habitual (Göpel et al., 2024; J. Zhang et al., 2018), però la situació és diferent al sud d'Europa on sembla que és més prevalent el *mcr-4* (Aguirre et al., 2020; Carattoli et al., 2017; García et al., 2018).

## **5. Eines per a la caracterització de la susceptibilitat antimicrobiana**

Donada la seva ubiqüitat, *E. coli* ha estat utilitzat històricament com un marcador d'antibiorresistència, tant a nivell fenotípic com genotípic. El primer pas és aïllar-lo en el laboratori a partir de medis com l'agar sang i l'agar MacConkey. En aquest apartat s'expliquen els diferents mètodes per caracteritzar les soques d' *E. coli*.

### **5.1 Caracterització fenotípica de la resistència antimicrobiana**

Les proves de susceptibilitat antibiòtica són bàsiques per tal d'eleger el tractament òptim per les infeccions bacterianes i evitar l'aparició de resistència. Tot i anar sortint algunes alternatives que estalvien temps com són les proves d'antígens ("lateral flow test", en anglès) que s'estan començant a utilitzar en hospitals d'humana (Boutal et al., 2022), els mètodes més utilitzats són el de difusió en agar i el de la concentració mínima inhibidora.

El mètode de difusió en agar o de Kirby-Bauer (Bauer et al., 1966) és un mètode qualitatiu estandarditzat que consisteix en aplicar discos de paper impregnats amb una concentració determinada d'antibiòtic sobre una placa de cultiu bacterià. Després, s'incuba 24 hores, es mesura el diàmetre dels halos d'inhibició i es compara amb les taules estandarditzades per indicar si el bacteri és sensible, resistent o té una susceptibilitat intermèdia (Abmm et al., 2020). Aquí, per la seva rellevància en l'àmbit porcí, és important esmentar que aquest mètode no és adequat per les polimixines donat que no difondren bé en l'agar i se sobreestima el nombre de soques resistents (Moskowitz et al., 2010).

Per la seva banda, el mètode de la concentració mínima inhibidora (CMI) determina la menor concentració d'un antibiòtic necessària per inhibir el creixement d'un bacteri. Es realitzen dilucions successives de l'antibiòtic en un medi de cultiu amb el bacteri, i després d'incubar, s'identifica la concentració més baixa que impedeix el creixement bacterià (Wiegand et al., 2008). Ben igual que amb el mètode de Kirby-Bauer, també existeixen taules per tal de saber la susceptibilitat dels bacteris (Abmm et al., 2020). Aquest mètode és el d'elecció, ja que proporciona uns resultats més exactes que permeten ajustar les pautes posològiques. A part, en els últims anys, han aparegut aparells de diverses cases comercials que permeten la seva automatització i, per això, la gran majoria de laboratoris de diagnòstic ja l'utilitzen.

### **5.2 Caracterització genotípica de la resistència antimicrobiana**

Encara que a nivell de la clínica diària sigui suficient amb les proves fenotípiques, per entendre realment l'epidemiologia de les infeccions bacterianes es necessita una



caracterització genotípica. També és important per caracteritzar les soques que s'aïllen en funció dels factors de virulència coneguts.

Els mètodes han evolucionat molt en els darrers anys i els costos s'estan reduint molt, per la qual cosa cada vegada son més utilitzats. A continuació es descriuen des de les tècniques més bàsiques necessàries pel diagnòstic rutinari (com ara la PCR) fins als mètodes més sofisticats i innovadors utilitzats especialment per fer recerca.

### **5.2.1 PCR**

La PCR és àmpliament utilitzada per caracteritzar les soques d'*E. coli*, des del seu descobriment el 1983. Es basa en el principi d'amplificar regions de material genètic utilitzant encebadors ("primers" en anglès) dissenyats per amplificar el gen que es busca. L'amplificació es realitza en 3 fases: desnaturalització, hibridació i elongació.

El procés s'inicia amb la desnaturalització, on s'augmenta la temperatura fins a separar les dues cadenes complementàries, convertint-les en cadenes simples. A continuació, disminueix la temperatura per la fase d'hibridació, on els encebadors s'aparellen amb les seqüències complementàries del material genètic de la mostra. Finalment, durant l'extensió, la temperatura es manté a 72°C i la polimerasa sintetitza noves cadenes complementàries utilitzant els nucleòtids disponibles en la mescla. Aquest cicle de desnaturalització, alineament i extensió es repeteix entre 25 i 40 cicles normalment, produint milions de còpies del fragment de material genètic al qual van dirigits els encebadors.

La PCR també pot ser una tècnica quantitativa si s'afegeix un tercer encebador (sonda) marcat amb un fluorescent. Així, en el moment en el que comença l'amplificació, es començarà a emetre fluorescència i com abans es detecti, major quantitat de material genètic haurà a la mostra.

Així, per al diagnòstic rutinari en la indústria porcina, i concretament en el cas de les diarrees, la PCR és de les tècniques més utilitzades, tant per detectar patògens (Marthaler et al., 2014; van Asten et al., 2009) com per caracteritzar-los d'acord amb els factors de virulència coneguts actualment de les soques d' *E. coli* (Toledo et al., 2012).

En l'àmbit de la recerca, la PCR també és interessant per detectar gens de resistència (Darwich et al., 2019). Aquesta tècnica s'ha vist substituïda per la WGS, tot i que encara és una alternativa econòmica per fer un cribratge de certes soques.

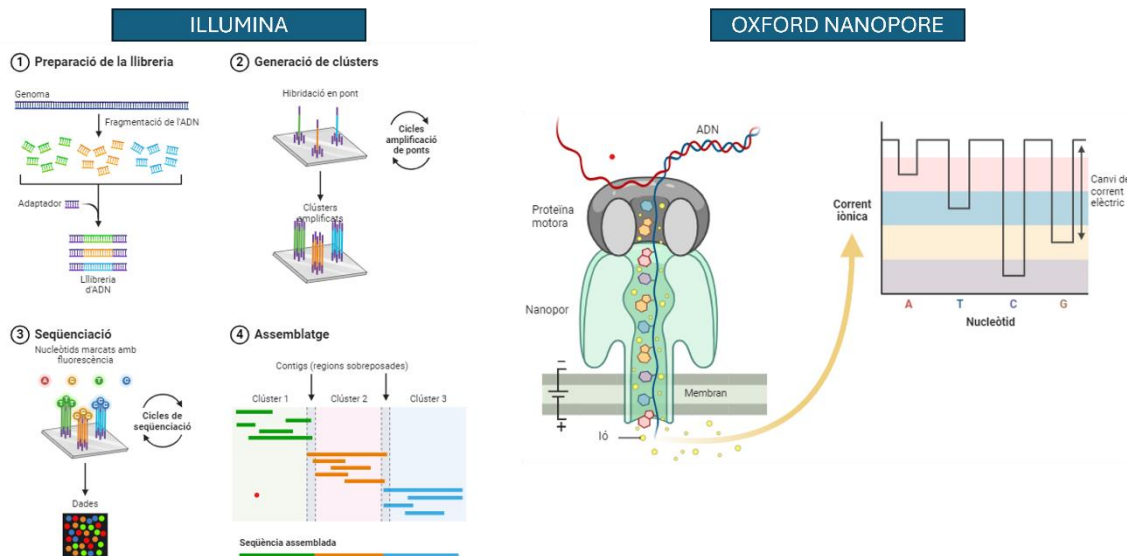
### 5.2.2 Seqüenciació de genoma complet

La WGS permet determinar la seqüència completa de nucleòtids del bacteri/virus/fong/gen que s'estigui estudiant. És una tècnica cada vegada més accessible ja que els seus costos s'han anat reduint molt. Específicament, la WGS per l'estudi dels gens de resistència als antibiòtics proporciona molta més informació, ja que no només ens permet detectar tots els gens que estan presents en una mateixa reacció, sinó que ens permet conèixer el seu context genètic (localització, proximitat amb elements genètics mòbils, nous al·lels del gen, etc.). Així, per conèixer l'epidemiologia i entendre la transmissió de les resistències als antibiòtics la aplicació de la WGS es fa imprescindible (Waddington et al., 2022).

Existeixen dos grans tipus de mètodes de WGS (Figura 11): un basat en lectures curtes (on la casa comercial més utilitzada és "Illumina") i un altre basat en lectures llargues (on destaca principalment "Oxford Nanopore").

Ambdós mètodes tenen pros i contres. La plataforma Illumina és superior a Oxford Nanopore, ja que aquesta última té un major percentatge d'errors, tot i que últimament s'està reduint enormement i apunta a seguir millorant (Wick, 2023), però encara no arriba al nivell de les lectures curtes. No obstant, el fet de fragmentar el genoma fa que, amb les lectures curtes s'obtinguin uns ensemblatges amb molts *contigs*, a diferència de les lectures llargues on se n'obtenen molt pocs, la qual cosa els fa ideals per a recuperar els plasmidis (Paganini et al., 2021).

Els plasmidis són uns elements claus en la transmissió de gens de resistència. Així, la manera ideal de recuperar-los és utilitzar ambdós mètodes, ja que així es combinen la precisió de les lectures curtes amb la capacitat de recuperar elements extracromosomals de les lectures llargues, generant genomes híbrids (Z. Chen et al., 2020). Per això, s'han creat diferents softwares que ho permeten fer, com són Hybracter (Bouras et al., 2024), Unicycler (Wick et al., 2017) o Polypolish (Wick i Holt, 2022).



**Figura 11:** Comparació del funcionament de les plataformes "Illumina" i "Oxford Nanopore". La seqüenciació de lectures curtes té diverses passes. Primer, es prepara una biblioteca d'ADN fragmentant l'ADN i afegint adaptadors als fragments. A continuació, la biblioteca creada s'hibrida formant clústers en forma de pont, que permet que sempre quedi una cadena exposada. La reacció de seqüenciació utilitza nucleòtids marcats amb fluorescents i una càmera detecta els colors i els classifica en cada nucleòtid. Això resulta en moltes lectures curtes diferents, que s'agrupen segons similitud, formant un clústers o *contigs* i a partir d'aquí es construeix la seqüència consens. En el cas de la seqüenciació de lectures llargues, s'utilitzen nanopors, que són petits canals a través dels quals passa l'ADN. A mesura que el fragment d'ADN passa per la nanopora, es genera un canvi de corrent elèctric que és registrat i convertit en una seqüència de nucleòtids. Al no fragmentar-se el material genètic, el nombre de contigs és molt més reduït. Figura creada a partir d'un motlle de Biorender.com

Tot i ser la millor elecció, moltes vegades no és possible realitzar-ho perquè duplica els costos de seqüenciació. Així, habitualment només es treballa amb les lectures llargues, malgrat, el seu rati d'error superior (Wick, 2023).

En altres ocasions només es té accés a plataformes de lectures curtes. Per això, s'han desenvolupat programaris que permeten identificar els plasmidis a partir d'aquestes lectures. Aquests mètodes es poden dividir en:

- **Classificació binària:** indiquen si cada contig és propi d'un cromosoma o un plasmidi. Són especialment utilitzats en metagenòmica, però per treballar amb WGS són una mica insuficients perquè el fet de no poder reconstruir els plasmidis fa que sigui complicat tipificar-los. Alguns exemples són Platon (Schwengers et al., 2020), RFPlasmid (van der Graaf-Van Bloois et al., 2021) o PlasmidSpades (Antipov et al., 2016).

- **Reconstrucció:** aquests mètodes mitjançant algorismes reconstrueixen els plasmidis. El més típic és MOB-Suite (Robertson i Nash, 2018), però n’hi ha d’altres com PLACNETw (Vielva et al., 2017) o gplas2 (Arredondo-Alonso et al., 2020).

No obstant això, aquest mètodes s’han demostrat que no són la solució ideal per identificar la localització dels gens de resistència (Paganini et al., 2021). Recentment hi han nous enfocaments que combinen ambdós mètodes, com les combinacions de plasmidEC (tres mètodes binaris diferents) i gplas2 (Paganini et al., 2024) o MOB-SUITE per així reduir les contaminacions cromosòmiques. Tota vegada, el mètode d’elecció per treballar amb plasmidis segueixen essent els genomes híbrids o, en el seu defecte, les lectures llargues.

Finalment, l’últim pas important és l’ anotació. Per detectar els gens de resistència, a partir dels genomes o dels plasmidis reconstruïts, s’han de realitzar cerques BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”) basades en bases de dades que contenguin tots els gens presents. Entre elles, trobem CARD (Alcock et al., 2020), AMRfinderPLUS (Feldgarden et al., 2021) o ARG-ANNOT (Gupta et al., 2014), però la que més se sol utilitzar és Resfinder, perquè està curada manualment per detectar aquells gens més importants a nivell de clínica (Florensa et al., 2022). Emperò, encara és arriscat fer prediccions des dels gens a partir del genoma i s’ha d’anar polint per cada espècie bacteriana (Coll et al., 2024; Cortes-Lara et al., 2021). No obstant això, proporcionen una gran informació a nivell epidemiològic per traçar la transmissió de les resistències als antibiòtics.

## 6. Bibliografia

- Abbafati, C., Abbas, K. M., Abbasi, M., Abbasifard, M., Abbasi-Kangevari, M., Abbastabar, H., Abd-Allah, F., Abdelalim, A., Abdollahi, M., Abdollahpour, I., Abedi, A., Abedi, P., Abegaz, K. H., Abolhassani, H., Abosetugn, A. E., Aboyans, V., Abrams, E. M., Abreu, L. G., Abrigo, M. R. M., ... Murray, C. J. L. (2020). Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *The Lancet*, 396(10258), 1204–1222. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9)
- Abmm, D., Tamma, D., Kirn, J., i Cullen, S. K. (2020). Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. *CLSI supplement M100, Wayne, PA*.
- AEM (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.
- AEM (2017). Zinc oxide Article-35 referral - Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species.
- Aguirre, L., Vidal, A., Seminati, C., Tello, M., Redondo, N., Darwich, L., i Martín, M. (2020). Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (*mcr*) genes in *Escherichia coli* from swine between 1999 and 2018. *Porcine Health Management*, 6(8), 4-9. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00146-2>
- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A. L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H. K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2020). CARD 2020: Antibiotic resistome surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, 48(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Allel, K., Day, L., Hamilton, A., Lin, L., Furuya-Kanamori, L., Moore, C. E., Van Boeckel, T., Laxminarayan, R., i Yakob, L. (2023). Global antimicrobial-resistance drivers: an ecological country-level study at the human–animal interface. *The Lancet Planetary Health*, 7(4), e291-e303. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00026-8)

- Alvarez-Ordóñez, A., Martínez-Lobo, F. J., Arguello, H., Carvajal, A., i Rubio, P. (2013). Swine dysentery: aetiology, pathogenicity, determinants of transmission and the fight against the disease. *International journal of environmental research and public health*, 10(5), 1927–1947. <https://doi.org/10.3390/ijerph10051927>
- Antipov, D., Hartwick, N., Shen, M., Raiko, M., Lapidus, A., i Pevzner, P. A. (2016). PlasmidSPAdes: Assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics*, 32(22), 3380–3387. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw493>
- Argüello, H., Rodríguez-Gómez, I. M., Sánchez-Carvajal, J. M., Pallares, F. J., Díaz, I., Cabrera-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P. D., Mateu, E., Martín-Valls, G., Carrasco, L., i Gómez-Laguna, J. (2022). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus impacts on gut microbiome in a strain virulence-dependent fashion. *Microbial Biotechnology*, 15(3), 1007–1016. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13757>
- Arredondo-Alonso, S., Bootsma, M., Hein, Y., Rogers, M. R. C., Corander, J., Willems, R. J. L., i Schürch, A. C. (2020). Gplas: A comprehensive tool for plasmid analysis using short-read graphs. *Bioinformatics*, 36(12), 3874-3876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btaa233>
- Asai, T., Otagiri, Y., Osumi, T., Namimatsu, T., Hirai, H., i Sato, S. (2002). Isolation of Salmonella from diarrheic feces of pigs. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64(2), 159-160. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.159>
- Baquero, F., i Levin, B. R. (2021). Proximate and ultimate causes of the bactericidal action of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 123–132 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00443-1>
- Barceló, J. (2009). *What is the best age for weaning piglets?* 3tres3. [https://www.pig333.com/articles/what-is-the-best-age-for-weaning-piglets-1-3\\_1566/](https://www.pig333.com/articles/what-is-the-best-age-for-weaning-piglets-1-3_1566/)
- Barros, M. M., Castro, J., Araújo, D., Campos, A. M., Oliveira, R., Silva, S., Outor-Monteiro, D., i Almeida, C. (2023). Swine Colibacillosis: Global Epidemiologic and Antimicrobial Scenario. *Antibiotics* 12(4), 682. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12040682>
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., i Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*, 45(4), 493-496.

- Beghain, J., Bridier-Nahmias, A., Nagard, H. Le, Denamur, E., i Clermont, O. (2018). ClermonTyping: An easy-to-use and accurate in silico method for Escherichia genus strain phylotyping. *Microbial Genomics*, 4(7), e000192. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000192>
- Belsham, G. J., Rasmussen, T. B., Normann, P., Vaclavek, P., Strandbygaard, B., i Bøtner, A. (2016). Characterization of a Novel Chimeric Swine Enteric Coronavirus from Diseased Pigs in Central Eastern Europe in 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(6), 595-601. <https://doi.org/10.1111/tbed.12579>
- Benfield, D. A., i Hesse, R. A. (2019). Adenoviruses. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.
- Bernad-Roche, M., Casanova-Higes, A., Marín-Alcalá, C. M., Cebollada-Solanas, A., i Mainar-Jaime, R. C. (2021). Salmonella infection in nursery piglets and its role in the spread of salmonellosis to further production periods. *Pathogens*, 10(2), 123. <https://doi.org/10.3390/pathogens10020123>
- Bessonov, K., Laing, C., Robertson, J., Yong, I., Ziebell, K., Gannon, V. P. J., Nichani, A., Arya, G., Nash, J. H. E., i Christianson, S. (2021). ECTyper: In silico escherichia coli serotype and species prediction from raw and assembled whole-genome sequence data. *Microbial Genomics*, 7(12), 000728. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000728>
- Boulbria, G., Teixeira Costa, C., Amenna-Bernard, N., Labrut, S., Normand, V., Nicolazo, T., Chocteau, F., Chevance, C., Jeusselin, J., Brissonnier, M., i Leuret, A. (2023). Microbiological Findings and Associated Histopathological Lesions in Neonatal Diarrhoea Cases between 2020 and 2022 in a French Veterinary Pig Practice. *Veterinary Sciences*, 10(4), 304. <https://doi.org/10.3390/vetsci10040304>
- Bouras, G., Houtak, G., Wick, R. R., Mallawaarachchi, V., Roach, M. J., Papudeshi, B., Judd, L. M., Sheppard, A. E., Edwards, R. A., i Vreugde, S. (2024). Hybracter: enabling scalable, automated, complete and accurate bacterial genome assemblies. *Microbial Genomics*, 10(5), 001244. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.001244>
- Boutal, H., Moguet, C., Pommiès, L., Simon, S., Naas, T., i Volland, H. (2022). The Revolution of Lateral Flow Assay in the Field of AMR Detection. *Diagnostics*, 12(7), 1744. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12071744>
- Brennan, E., Martins, M., McCusker, M. P., Wang, J., Martins Alves, B., Hurley, D., El Garch, F., Woehrlé, F., Miossec, C., McGrath, L., Srikumar, S., Wall, P., i Fanning, S. (2016).

- Multidrug-resistant *Escherichia coli* in Bovine animals, Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 22(9), 1650–1652. <https://doi.org/10.3201/eid2209.160140>
- Brewer, M. T., i Greve, J. H. (2019). Internal Parasites. En *Diseases of Swine*. <https://doi.org/10.1002/9781119350927.ch67>
- Burrough, E., Strait, E., Kinyon, J., Bower, L., Madson, D., Schwartz, K., Frana, T., i Songer, J. G. (2012). Comparison of atypical *Brachyspira* spp. clinical isolates and classic strains in a mouse model of swine dysentery. *Veterinary Microbiology*, 160(3-4), 387-394. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.06.008>
- Bush, K. (2018). Past and present perspectives on  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(10), e01076-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>
- Bush, K., i Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01009-09>
- Cameron-Veas, K., Solà-Ginés, M., Moreno, M. A., Fraile, L., i Migura-Garcia, L. (2015). Impact of the use of  $\beta$ -lactam antimicrobials on the emergence of *Escherichia coli* isolates resistant to cephalosporins under standard pig-rearing conditions. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(5), 1782-1787. <https://doi.org/10.1128/AEM.03916-14>
- Canibe, N., Højberg, O., Kongsted, H., Vodolazska, D., Lauridsen, C., Nielsen, T. S., i Schönherz, A. A. (2022). Review on Preventive Measures to Reduce Post-Weaning Diarrhoea in Piglets. *Animals*, 12(19):2585. <https://doi.org/10.3390/ani12192585>
- Cao, Z., Sugimura, N., Burgermeister, E., Ebert, M. P., Zuo, T., i Lan, P. (2022). The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *eBioMedicine* 81, 104113. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104113>
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., i Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31), 30589. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
- Carlson, S. A., Barnhill, A. E., i Griffith, R. W. (2019). Salmonellosis. *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.



- Carr, J., Chen, S.-P., Conner, J. F., Kirkwoor, R., i Segalés, J. (2018). *Pig Health*. Taylor & Francis.
- Castillo, M., Martín-Orúe, S. M., Nofrarías, M., Manzanilla, E. G., i Gasa, J. (2007). Changes in caecal microbiota and mucosal morphology of weaned pigs. *Veterinary Microbiology*, *124*(3-4), 239-247. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.04.026>
- Chandrasekaran, R., i Lacy, D. B. (2017). The role of toxins in clostridium difficile infection. *FEMS Microbiology Reviews*, *41*(6), 723–750. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux048>
- Chase, C., i Lunney, J. K. (2019). Immune system. En *Diseases of Swine*. Wiley-Blackwell.
- Chen, F., Knutson, T. P., Rossow, S., Saif, L. J., i Marthaler, D. G. (2019). Decline of transmissible gastroenteritis virus and its complex evolutionary relationship with porcine respiratory coronavirus in the United States. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40564-z>
- Chen, Z., Erickson, D. L., i Meng, J. (2020). Benchmarking hybrid assembly approaches for genomic analyses of bacterial pathogens using Illumina and Oxford Nanopore sequencing. *BMC Genomics*, *21*(1), 631. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-07041-8>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., i Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, *66*(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>
- Clermont, O., Condamine, B., Dion, S., Gordon, D. M., i Denamur, E. (2021). The E phylogroup of Escherichia coli is highly diverse and mimics the whole E. coli species population structure. *Environmental Microbiology*, *23*(11), 7139-7151. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15742>
- Coll, F., Gouliouris, T., Blane, B., Yeats, C. A., Raven, K. E., Ludden, C., Khokhar, F. A., Wilson, H. J., Roberts, L. W., Harrison, E. M., Horner, C. S., Le, T. H., Nguyen, T. H., Nguyen, V. T., Brown, N. M., Holmes, M. A., Parkhill, J., Estee Török, M., i Peacock, S. J. (2024). Antibiotic resistance determination using Enterococcus faecium whole-genome sequences: a diagnostic accuracy study using genotypic and phenotypic data. *The Lancet Microbe*, *5*(2), e151–e163. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(23\)00297-5](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00297-5)
- Cortes-Lara, S., Barrio-Tofiño, E. del, López-Causapé, C., Oliver, A., Martínez-Martínez, L., Bou, G., Zamorano, L., Sánchez-Diener, I., Galán, F., Gracia, I., Rodríguez, M. A.,

- Martín, L., Sánchez, J. M., Viñuela, L., García, M. V., Lepe, J. A., Aznar, J., López-Hernández, I., Seral, C., ... Oteo, J. (2021). Predicting *Pseudomonas aeruginosa* susceptibility phenotypes from whole genome sequence resistome analysis. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(11), 1631-1637. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2021.05.011>
- Cortey, M., Díaz, I., Vidal, A., Martín-Valls, G., Franco, G., Gómez De Nova, P. J., Darwich, L., Puente, H., Carvajal, A., Martín, M., i Mateu, E. (2019). High levels of unreported intraspecific diversity among RNA viruses in faeces of neonatal piglets with diarrhoea. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-2204-2>
- Cresci, G. A., i Bawden, E. (2015). Gut microbiome: What we do and don't know. *Nutrition in Clinical Practice* 30(6), 734–746. <https://doi.org/10.1177/0884533615609899>
- Currie, A., Honish, L., Cutler, J., Locas, A., Lavoie, M. C., Gaulin, C., Galanis, E., Tschetter, L., Chui, L., Taylor, M., Jamieson, F., Gilmour, M., Ng, C., Mutti, S., Mah, V., Hamel, M., Martinez, A., Buenaventura, E., Hoang, L., ... Farber, J. (2019). Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Linked to Mechanically Tenderized Beef and the Largest Beef Recall in Canada, 2012. *Journal of Food Protection*, 82(9), 1532-1538. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-19-005>
- Cuvertoret-Sanz, M., Weissenbacher-Lang, C., Lunardi, M., Brunthaler, R., Coma, M., Weissenböck, H., i Segalés, J. (2019). Coinfection with *Entamoeba polecki* and *Brachyspira hyodysenteriae* in a pig with severe diarrhea. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(2), 298-302. <https://doi.org/10.1177/1040638719829800>
- Czepiel, J., Drózdź, M., Pituch, H., Kuijper, E. J., Perucki, W., Mielimonka, A., Goldman, S., Wultańska, D., Garlicki, A., i Biesiada, G. (2019). *Clostridium difficile* infection: review. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(7), 1211-1221. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03539-6>
- Daniel Dubreuil, J. (2010). STb and AIDA-I: The missing link? *Critical Reviews in Microbiology*, 36(3), 212–220. <https://doi.org/10.3109/10408411003720191>
- Daraei, H., Bertone, E., Stewart, R. A., Awad, J., Leavesley, A., Gale, M., Jones, E., Cinque, K., Agnew, M., Burger, H. A., i Van Leeuwen, J. (2024). Organic matter concentration and characteristic dynamics in surface waters post-bushfires and cyclones: fDOM sensors

for environmental monitoring and control. *Environmental Sciences Advances*, 3(6), 950-963 <https://doi.org/10.1039/D4VA00036F>

Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., i Blair, J. M. A. (2023). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*, 21(5), 280-295. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>

Darwich, L., Vidal, A., Seminati, C., Albamonte, A., Casado, A., López, F., Molina-López, R. A., i Migura-Garcia, L. (2019). High prevalence and diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and emergence of OXA-48 producing Enterobacterales in wildlife in Catalonia. *PloS One*, 14(8), e0210686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210686>

Davies, J. (2006). Where have all the antibiotics gone? *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17(5), 287-290. <https://doi.org/10.1155/2006/707296>

Davies, J., i Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417-433. <https://doi.org/10.1128/membr.00016-10>

de la Fé Rodríguez, P. Y., Martín, L. O. M., Muñoz, E. C., Imberechts, H., Butaye, P., Goddeeris, B. M., i Cox, E. (2012). Several enteropathogens are circulating in suckling and newly weaned piglets suffering from diarrhea in the province of Villa Clara, Cuba. *Tropical Animal Health and Production*, 45(1), 435-440. <https://doi.org/10.1007/s11250-012-0236-8>

Decaro, N., i Lorusso, A. (2020). Novel human coronavirus (SARS-CoV-2): A lesson from animal coronaviruses. *Veterinary Microbiology*, 244, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2020.108693>

Dewulf, J., Joosten, P., Chantziaras, I., Bernaerdt, E., Vanderhaeghen, W., Postma, M., i Maes, D. (2022). Antibiotic Use in European Pig Production: Less Is More. *Antibiotics*, 11(11), 1493. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111493>

Dhariwal, A. K., i Tullu, M. S. (2013). Colistin: Re-emergence of the «forgotten» antimicrobial agent. *Journal of Postgraduate Medicine*, 59(3), 208-215. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.118040>

Diaconu, E. L., Carfora, V., Alba, P., Di Matteo, P., Stravino, F., Buccella, C., Dell'Aira, E., Onorati, R., Sorbara, L., Battisti, A., i Franco, A. (2020). Novel IncFII plasmid harbouring

- blaNDM-4 in a carbapenem-resistant *Escherichia coli* of pig origin, Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(12), 3475–3479. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa374>
- Dohmen, W., Dorado-García, A., Bonten, M. J. M., Wagenaar, J. A., Mevius, D., i Heederik, D. J. J. (2017). Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLoS ONE*, 12(3), 1-14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174094>
- Dorado-García, A., Bos, M. E. H., Graveland, H., Van Cleef, B. A. G. L., Verstappen, K. M., Kluytmans, J. A. J. W., Wagenaar, J. A., i Heederik, D. J. J. (2013). Risk factors for persistence of livestock-associated MRSA and environmental exposure in veal calf farmers and their family members: An observational longitudinal study. *BMJ Open*, 3(9), e003272. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2013-003272>
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhal, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., Huërou-Luron, I. L. E., i Abdennebi-Najar, L. (2017). Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS ONE*, 12(1), e0169851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169851>
- Dritz, S. S., Goodband, R. D., DeRouchey, J. M., Tokach, M. D., i Woodworth, J. C. (2019). Nutrient deficiencies and excesses. En *Diseases of Swine*. Wiley-Blackwell.
- Duangurai, T., Rungruengkitkul, A., Kong-Ngoen, T., Tunyong, W., Kosoltanapiwat, N., Adisakwattana, P., Vanaporn, M., Indrawattana, N., i Pumirat, P. (2022). Phylogenetic analysis and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from wild and domestic animals at an agricultural land interface area of Salaphra wildlife sanctuary, Thailand. *Veterinary World*, 15(12), 2800–2809. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2022.2800-2809>
- Dubreuil, J. D. (2017). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and probiotics in swine: What the bleep do we know? *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 36(3), 75-90. <https://doi.org/10.12938/bmfh.16-030>
- Dubreuil, J. D. (2019). EAST1 toxin: An enigmatic molecule associated with sporadic episodes of diarrhea in humans and animals. *Journal of microbiology (Seoul, Korea)*, 57(7), 541–549. <https://doi.org/10.1007/s12275-019-8651-4>

- Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E., i Schifferli, D. M. (2016). Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1), 10.1128. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>
- Edgar, R., i Bibi, E. (1997). MdfA, an *Escherichia coli* multidrug resistance protein with an extraordinarily broad spectrum of drug recognition. *Journal of Bacteriology*, 179(7), 2274–2280. <https://doi.org/10.1128/jb.179.7.2274-2280.1997>
- Ekhlas, D., Argüello, H., Leonard, F. C., Manzanilla, E. G., i Burgess, C. M. (2023). Insights on the effects of antimicrobial and heavy metal usage on the antimicrobial resistance profiles of pigs based on culture-independent studies. *Veterinary Research*, 54(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01143-3>
- Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., i Igarashi, K. (1988). Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes: RNA N-glycosidase activity of the toxins. *European Journal of Biochemistry*, 171(1-2), 45-50. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb13756.x>
- Ercoli, L., Farneti, S., Zicavo, A., Mencaroni, G., Blasi, G., Striano, G., i Scuota, S. (2016). Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 232, 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.002>
- Eriksen, E. Ø., Kudirkiene, E., Barington, K., Goecke, N. B., Blirup-Plum, S. A., Nielsen, J. P., Olsen, J. E., Jensen, H. E., Pankoke, K., Larsen, L. E., Liu, G., i Pedersen, K. S. (2023). An observational field study of porcine post-weaning diarrhea: clinical and microbiological findings, and fecal pH-measurements as a potential diagnostic tool. *Porcine Health Management*, 9(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40813-023-00325-x>
- Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., Le Gall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., Skurnik, D., i Denamur, E. (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*, 8(11), 1975-1984. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x>
- Evans, B. A., i Amyes, S. G. B. (2014). OXA  $\beta$ -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(2), 241–263. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-13>
- Fairbrother, J. M., i Gyles, C. L. (2019). Colibacillosis. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.

- Fairbrother, J. M., Nadeau, É., i Gyles, C. L. (2005). Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal Health Research Reviews*, 6(1), 17-39. <https://doi.org/10.1079/ahr2005105>
- Fan, Q., Yi, M., Liu, H., Wang, Y., Li, X., Yuan, J., Wang, L., Hou, B., i Li, M. (2020). The impact of age and pathogens type on the gut microbiota in infants with diarrhea in Dalian, China. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2020 , 8837156. <https://doi.org/10.1155/2020/8837156>
- Fang Li. (2017). Structure, Function, and Evolution of Coronavirus Spike Proteins. *Annual review of virology*, 3(1), 237-261. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., i Vargas-Remolina, L. V. (2016). Mecanismos de virulencia de Escherichia coli enteropatógena. *Revista chilena de infectología*, 33(4), 438-450. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182016000400009>
- Feldgarden, M., Brover, V., Gonzalez-Escalona, N., Frye, J. G., Haendiges, J., Haft, D. H., Hoffmann, M., Pettengill, J. B., Prasad, A. B., Tillman, G. E., Tyson, G. H., i Klimke, W. (2021). AMRFinderPlus and the Reference Gene Catalog facilitate examination of the genomic links among antimicrobial resistance, stress response, and virulence. *Scientific Reports*, 11(1), 12728. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91456-0>
- Fernández Miyakawa, M. E., Casanova, N. A., i Kogut, M. H. (2024). How did antibiotic growth promoters increase growth and feed efficiency in poultry? *Poultry Science*, 103(2), 103278. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2023.103278>
- Ferrari, E., Salogni, C., Martella, V., Alborali, G. L., Scaburri, A., i Boniotti, M. B. (2022). Assessing the Epidemiology of Rotavirus A, B, C and H in Diarrheic Pigs of Different Ages in Northern Italy. *Pathogens*, 11(4), 467. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040467>
- Fleming, A. (1945). Penicillin's finder assays its future. *New York Times*.
- Flohr, J. R., Tokach, M. D., Dritz, S. S., Derouchey, J. M., Goodband, R. D., i Nelssen, J. L. (2014). The effects of sodium sulfate in the water of nursery pigs and the efficacy of nonnutritive feed additives to mitigate those effects. *Journal of Animal Science*, 92(8), 3624–3635. <https://doi.org/10.2527/jas.2013-7436>

- Florensa, A. F., Kaas, R. S., Clausen, P. T. L. C., Aytan-Aktug, D., i Aarestrup, F. M. (2022). ResFinder – an open online resource for identification of antimicrobial resistance genes in next-generation sequencing data and prediction of phenotypes from genotypes. *Microbial Genomics*, 8(1), 000748.. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000748>
- Fratamico, P. M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D. S., Baranzoni, G. M., i Feng, P. (2016). Advances in molecular serotyping and subtyping of Escherichia coli. *Frontiers in Microbiology*, 7, 644. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00644>
- Fröhlicher, E., Krause, G., Zweifel, C., Beutin, L., i Stephan, R. (2008). Characterization of attaching and effacing Escherichia coli (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiology*, 8, 1-6. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-144>
- Furukawa, S., Kuroda, Y., i Sugiyama, A. (2014). A comparison of the histological structure of the placenta in experimental animals. *Journal of Toxicologic Pathology*, 27(1), 11-18. <https://doi.org/10.1293/tox.2013-0060>
- Gao, J., Yin, J., Xu, K., Li, T., i Yin, Y. (2019). What Is the Impact of Diet on Nutritional Diarrhea Associated with Gut Microbiota in Weaning Piglets: A System Review. *BioMed Research International*, 2019, 6916189. <https://doi.org/10.1155/2019/6916189>
- García, V., Gambino, M., Pedersen, K., Haugegaard, S., Olsen, J. E., i Herrero-Fresno, A. (2020). F4- and F18-Positive Enterotoxigenic Escherichia coli Isolates from Diarrhea of Postweaning Pigs: Genomic Characterization. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(23), e01913-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.01913-20>
- García, V., García-Meniño, I., Gómez, V., Jiménez-Orellana, M., Méndez, A., Aguarón, A., Roca, E., i Mora, A. (2022). Mobile colistin resistance (MCR), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and multidrug resistance monitoring in Escherichia coli (commensal and pathogenic) in pig farming: need of harmonized guidelines and clinical breakpoints. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1042612. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1042612>
- García, V., García-Meniño, I., Mora, A., Flament-Simon, S. C., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J. E., Alonso, M. P., i Blanco, J. (2018). Co-occurrence of mcr-1, mcr-4 and mcr-5 genes in multidrug-resistant ST10 Enterotoxigenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli in Spain (2006-2017). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 52(1), 104-108. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.03.022>

- Garcias, B. (2020). *Diarrea al postdeslletament i problemes de salut pública* [Màster en Zoonosi i Una Sola Salut]. Facultat de Veterinària UAB.
- Garofalo, C., Cesaro, C., Milanović, V., Belleggia, L., Matricardi, T., Osimani, A., Aquilanti, L., Cardinali, F., Rampanti, G., Simoni, S., Vignaroli, C., Brenciani, A., Pasquini, M., i Trombetta, M. F. (2024). Search for carbapenem-resistant bacteria and carbapenem resistance genes along swine food chains in Central Italy. *PLoS ONE*, *19*(1), e0296098. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296098>
- Gay, N., Rabenandrasana, M. A. N., Panandiniaina, H. P., Rakotonidrina, M. F., Ramahatafandry, I. T. H., Enouf, V., Roger, F., Collard, J. M., Cardinale, E., Rieux, A., i Loire, E. (2023). One Health compartment analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* reveals multiple transmission events in a rural area of Madagascar. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *78*(8), 1848–1858. <https://doi.org/10.1093/jac/dkad125>
- Gelalcha, B. D., Brown, S. M., Crocker, H. E., Agga, G. E., i Kerro Dego, O. (2022). Regulation Mechanisms of Virulence Genes in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathogens and Disease*, *19*(9), 598–612. <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0103>
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S., i Sekawi, Z. (2014). Extended spectrum beta-lactamases: Definition, classification and epidemiology. *Current Issues in Molecular Biology*, *17*(1), 11-22. <https://doi.org/10.21775/cimb.017.011>
- Gierse, L. C., Meene, A., Schultz, D., Schwaiger, T., Karte, C., Schröder, C., Wang, H., Wünsche, C., Methling, K., Kreikemeyer, B., Fuchs, S., Bernhardt, J., Becher, D., Lalk, M., Urich, T., Riedel, K., Mettenleiter, T., Beer, M., Blohm, U., ... Ulrich, R. (2020). A multi-omics protocol for swine feces to elucidate longitudinal dynamics in microbiome structure and function. *Microorganisms*, *8*(12), 1-20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121887>
- Gillieatt, B. F., i Coleman, N. V. (2024). Unravelling the mechanisms of antibiotic and heavy metal resistance co-selection in environmental bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, *48*(4), fuae017. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuae017>
- Gonçalves, C., Berthiaume, F., Mourez, M., i Dubreuil, J. D. (2008). *Escherichia coli* STb toxin binding to sulfatide and its inhibition by carragenan. *FEMS Microbiology Letters*, *281*(1), 30-35. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01075.x>



- Göpel, L., Prenger-Berninghoff, E., Wolf, S. A., Semmler, T., Bauerfeind, R., i Ewers, C. (2024). Occurrence of Mobile Colistin Resistance Genes *mcr-1*–*mcr-10* including Novel *mcr* Gene Variants in Different Pathotypes of Porcine *Escherichia coli* Isolates Collected in Germany from 2000 to 2021. *Applied Microbiology*, 4(1), 70-84. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4010005>
- Gouliouris, T., Raven, K. E., Ludden, C., Blane, B., Corander, J., Horner, C. S., Hernandez-Garcia, J., Wood, P., Hadjirin, N. F., Radakovic, M., Holmes, M. A., de Goffau, M., Brown, N. M., Parkhill, J., i Peacock, S. J. (2018). Genomic surveillance of enterococcus faecium reveals limited sharing of strains and resistance genes between livestock and humans in the United Kingdom. *mBio*, 9(6), e01780-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.01780-18>
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M. A., Van de Wiele, T., Forano, E., i Blanquet-Diot, S. (2017). Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends in Microbiology*, 25(10), 851-873. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.004>
- Gryaznova, M., Smirnova, Y., Burakova, I., Morozova, P., Nesterova, E., Gladkikh, M., Mikhaylov, E., i Syromyatnikov, M. (2023). Characteristics of the Fecal Microbiome of Piglets with Diarrhea Identified Using Shotgun Metagenomics Sequencing. *Animals*, 13(14), 2303. <https://doi.org/10.3390/ani13142303>
- Gryaznova, M. v., Dvoretzkaya, Y. D., Syromyatnikov, M. Y., Shabunin, S. v., Parshin, P. A., Mikhaylov, E. v., Strelnikov, N. A., i Popov, V. N. (2022). Changes in the Microbiome Profile in Different Parts of the Intestine in Piglets with Diarrhea. *Animals*, 12(3), 320. <https://doi.org/10.3390/ani12030320>
- Guitart-Matas, J., Ballester, M., Fraile, L., Darwich, L., Giler-Baquerizo, N., Tarres, J., López-Soria, S., Ramayo-Caldas, Y., i Migura-Garcia, L. (2024). Gut microbiome and resistome characterization of pigs treated with commonly used post-weaning diarrhea treatments. *Animal Microbiome*, 6(1), 24. <https://doi.org/10.1186/s42523-024-00307-6>
- Guo, Z., Ruan, H., Qiao, S., Deng, R., i Zhang, G. (2020). Co-infection status of porcine circoviruses (PCV2 and PCV3) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in pigs with watery diarrhea in Henan province, central China: Co-infection of PCV2, PCV3 and

- PEDV. *Microbial Pathogenesis*, 142(10), 104047.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104047>
- Gupta, S. K., Padmanabhan, B. R., Diene, S. M., Lopez-Rojas, R., Kempf, M., Landraud, L., i Rolain, J. M. (2014). ARG-annot, a new bioinformatic tool to discover antibiotic resistance genes in bacterial genomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 212-220. <https://doi.org/10.1128/AAC.01310-13>
- Hampson, D. J. (2018). The spirochete *brachyspira pilosicoli*, enteric pathogen of animals and humans. *Clinical microbiology reviews*, 31(1), e00087-17.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00087-17>
- Hampson, D. J., i Burrough, E. R. (2019). Swine Dysentery and Brachyspiral colitis. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.
- Han, C., Dai, Y., Liu, B., Wang, L., Wang, J., i Zhang, J. (2019). Diversity analysis of intestinal microflora between healthy and diarrheal neonatal piglets from the same litter in different regions. *Anaerobe*, 55, 136–141. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.12.001>
- Harleman, J. H., i Meyer, R. C. (1983). Isospora suis infection in piglets. A review. *The Veterinary quarterly* 5(4), 178–185. <https://doi.org/10.1080/01652176.1983.9693894>
- Harper, A., Vijayakumar, V., Ouwehand, A. C., ter Haar, J., Obis, D., Espadaler, J., Binda, S., Desiraju, S., i Day, R. (2021). Viral Infections, the Microbiome, and Probiotics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 10, 596166.  
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.596166>
- Hasan, N., i Yang, H. (2019). Factors affecting the composition of the gut microbiota, and its modulation. *PeerJ*, 7, e7502. <https://doi.org/10.7717/peerj.7502>
- Hawken, P., Weese, J. S., Friendship, R., i Warriner, K. (2013). Longitudinal study of clostridium difficile and methicillin-resistant staphylococcus aureus associated with pigs from weaning through to the end of processing. *Journal of Food Protection*, 76(4), 624-630. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-330>
- Hensgens, M. P. M., Goorhuis, A., Dekkers, O. M., i Kuijper, E. J. (2012). Time interval of increased risk for Clostridium difficile infection after exposure to antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(3), 742–748. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr508>

- Heo, J. M., Opapeju, F. O., Pluske, J. R., Kim, J. C., Hampson, D. J., i Nyachoti, C. M. (2013). Gastrointestinal health and function in weaned pigs: A review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(2), 207-237. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0396.2012.01284.x>
- Hinney, B., Cvjetković, V., Espigares, D., Vanhara, J., Waehner, C., Ruttkowski, B., Selista, R., Sperling, D., i Joachim, A. (2020). Cystoisospora suis Control in Europe Is Not Always Effective. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 113. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00113>
- Ho, W. S., Tan, L. K., Ooi, P. T., Yeo, C. C., i Thong, K. L. (2013). Prevalence and characterization of verotoxigenic-Escherichia coli isolates from pigs in Malaysia. *BMC Veterinary Research*, 9(109). <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-109>
- Homwong, N., Diaz, A., Rossow, S., Ciarlet, M., i Marthaler, D. (2016). Three-Level Mixed-Effects Logistic Regression Analysis Reveals Complex Epidemiology of Swine Rotaviruses in Diagnostic Samples from North America. *PloS One*, 11(5), e0154734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154734>
- Hu, J., Wang, D., Huang, X., Yang, Y., Lian, X., Wang, W., Xu, X., i Liu, Y. (2022). Effects of TolC on the pathogenicity of porcine extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Frontiers in Immunology*, 13, 929740. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.929740>
- Irrgang, A., Fischer, J., Grobbel, M., Schmogger, S., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K., Hensel, A., Tenhagen, B. A., i Käsbohrer, A. (2017). Recurrent detection of VIM-1-producing Escherichia coli clone in German pig production. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72(3), 944–946. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw479>
- Jackova, A., Sliz, I., Mandelik, R., Salamunova, S., Novotny, J., Kolesarova, M., Vlasakova, M., i Vilcek, S. (2017). Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A. *Infection, Genetics and Evolution*, 49, 73-77. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.011>
- Jang, S., Shin, S., Kim, S.-H., Kim, H., i Moon, C. (2019). Diagnosis of Enterococcus hirae infection in association with piglet diarrhea. *Journal of Biomedical Translational Research*, 20(4), 115-120. <https://doi.org/10.12729/jbtr.2019.20.4.115>

- Jiang, Y., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Cui, Y., Wang, Y., Quan, J., Zhao, D., Du, X., Liu, H., Li, X., Wu, X., Hua, X., Feng, Y., i Yu, Y. (2020). Clinical relevance and plasmid dynamics of mcr-1-positive *Escherichia coli* in China: a multicentre case-control and molecular epidemiological study. *The Lancet Microbe*, 1(1), e24-e33. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30001-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30001-X)
- Joensen, K. G., Tetzschner, A. M. M., Iguchi, A., Aarestrup, F. M., i Scheutz, F. (2015). Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2410-2426. <https://doi.org/10.1128/JCM.00008-15>
- Jolley, K. A., Bray, J. E., i Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their Applications. *Wellcome Open Research*, 3, 124. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14826.1>
- Karasova, D., Crhanova, M., Babak, V., Jerabek, M., Brzobohaty, L., Matesova, Z., i Rychlik, I. (2021). Development of piglet gut microbiota at the time of weaning influences development of postweaning diarrhea – A field study. *Research in Veterinary Science*, 135, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.022>
- Karte, C., Platje, N., Bullermann, J., Beer, M., Höper, D., i Blome, S. (2020). Re-emergence of porcine epidemic diarrhea virus in a piglet-producing farm in northwestern Germany in 2019. *BMC Veterinary Research*, 16(1), 329. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02548-4>
- Karuppanan, A. K., i Opriessnig, T. (2018). *Lawsonia intracellularis*: Revisiting the disease ecology and control of this fastidious pathogen in pigs. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 181. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00181>
- Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., i Tsunemitsu, H. (2006). Frequency of enteropathogen detection in suckling and weaned pigs with diarrhea in Japan. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 18(4), 350-354. <https://doi.org/10.1177/104063870601800405>
- Kauffmann, F. (1947). The Serology of the Coli Group. *The Journal of Immunology*, 57(1), 71-100. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.57.1.71>
- Kawahara, S., Utsunomiya, C., Ishikawa, S., i Sekiguchi, J. (1950). A new antibiotic «colistin» produced by spore-forming soil bacteria. *J. Antibiot.*, 3, 457-458.

- Keyburn, A. L., Boyce, J. D., Vaz, P., Bannam, T. L., Ford, M. E., Parker, D., Di Rubbo, A., Rood, J. I., i Moore, R. J. (2008). NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens*, 4(2), e26. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>
- Kim, A. H. J., Hogarty, M. P., Harris, V. C., i Baldrige, M. T. (2021). The Complex Interactions Between Rotavirus and the Gut Microbiota. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 586751. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.586751>
- Kirkland, P. D., Potier, M. Le, i Finlaison, D. (2019). Pestiviruses. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.
- Ko, Y. S., Tark, D., Moon, S. H., Kim, D. M., Lee, T. G., Bae, D. Y., Sunwoo, S. Y., Oh, Y., i Cho, H. S. (2023). Alteration of the Gut Microbiota in Pigs Infected with African Swine Fever Virus. *Veterinary Sciences*, 10(5), 360. <https://doi.org/10.3390/vetsci10050360>
- Koch-Weser, J., Sidel, V. W., Federman, E. B., Kanarek, P., Finer, D. C., i Eaton, A. E. (1970). Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Annals of internal medicine*, 72(6), 857-868. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-72-6-857>
- Kong, Q., Zhang, W., An, M., Kulyar, M. F. e. A., Shang, Z., Tan, Z., Xu, Y., Li, J., i Liu, S. (2022). Characterization of Bacterial Microbiota Composition in Healthy and Diarrheal Early-Weaned Tibetan Piglets. *Frontiers in Veterinary Science*, 9, 799862. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.799862>
- Koonpaew, S., Teeravechyan, S., Frantz, P. N., Chailangkarn, T., i Jongkaewwattana, A. (2019). PEDV and PDCoV pathogenesis: The interplay between host innate immune responses and porcine enteric coronaviruses. *Frontiers in Veterinary Science*, 6(2), 1-16. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00034>
- Kopic, S., i Geibel, J. P. (2010). Toxin mediated diarrhea in the 21st century: The pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, V. Cholerae and rotavirus infection. *Toxins*, 2(8), 2132-2157. <https://doi.org/10.3390/toxins2082132>
- Kuehne, S. A., Cartman, S. T., Heap, J. T., Kelly, M. L., Cockayne, A., i Minton, N. P. (2010). The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile* infection. *Nature*, 467(7316), 711-713. <https://doi.org/10.1038/nature09397>

- Kumar, D., Singh, A. K., Ali, M. R., i Chander, Y. (2014). Antimicrobial Susceptibility Profile of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Producing Escherichia coli from Various Clinical Samples. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 7, 1-8. <https://doi.org/10.4137/idrt.s13820>
- Kyung-hyo, D., Jae-won, B., i Wan-kyu, L. (2020). Antimicrobial resistance profiles of escherichia coli from diarrheic weaned piglets after the ban on antibiotic growth promoters in feed. *Antibiotics*, 9(11), 755. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110755>
- Labrie, S. J., Samson, J. E., i Moineau, S. (2010). Bacteriophage resistance mechanisms. En *Nature Reviews Microbiology*, 8(5), 317-327. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2315>
- Lacoma, A., Edwards, A. M., Young, B. C., Domínguez, J., Prat, C., i Laabei, M. (2019). Cigarette smoke exposure redirects Staphylococcus aureus to a virulence profile associated with persistent infection. *Scientific Reports*, 9(1), 10798. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47258-6>
- Larriestra, A. J., Wattanaphansak, S., Neumann, E. J., Bradford, J., Morrison, R. B., i Deen, J. (2006). Pig characteristics associated with mortality and light exit weight for the nursery phase. *Canadian Veterinary Journal*, 47(6). 560-566.
- Lawlor, P. G., Lynch, P. B., Caffrey, P. J., O'Reilly, J. J., i O'Connell, M. K. (2005). Measurements of the acid-binding capacity of ingredients used in pig diets. *Irish Veterinary Journal*, 58(8), 447–452. <https://doi.org/10.1186/2046-0481-58-8-447>
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L., i Finegold, S. M. (2016). Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe*, 40, 95–99. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2016.06.008>
- Lee, C. (2015). Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Virology Journal*, 12(1), 1-16. <https://doi.org/10.1186/s12985-015-0421-2>
- Lee, C. Y., Kim, S. J., Park, B. C., i Han, J. H. (2017). Effects of dietary supplementation of bacteriophages against enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) K88 on clinical symptoms of post-weaning pigs challenged with the ETEC pathogen. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(1), 88-95. <https://doi.org/10.1111/jpn.12513>

- Lekagul, A., Tangcharoensathien, V., i Yeung, S. (2019). Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review. *Veterinary and Animal Science*, 7, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2019.100058>
- Leme, R. A., Silva, D. R., Lorenzetti, E., Moraes, D. A., Alfieri, A. F., i Alfieri, A. A. (2019). Longitudinal survey of Teschovirus A, Sapelovirus A, and Enterovirus G fecal excretion in suckling and weaned pigs. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(1), 321-327. <https://doi.org/10.1007/s42770-018-0018-1>
- Li, B., Yin, F., Zhao, X., Guo, Y., Wang, W., Wang, P., Zhu, H., Yin, Y., i Wang, X. (2020). Colistin Resistance Gene *mcr-1* Mediates Cell Permeability and Resistance to Hydrophobic Antibiotics. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3015. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03015>
- Li, W., Yi, X., Wu, B., Li, X., Ye, B., Deng, Z., A, R., Hu, S., Li, D., Wu, H., i Zhou, Z. (2023). Neonatal Calf Diarrhea Is Associated with Decreased Bacterial Diversity and Altered Gut Microbiome Profiles. *Fermentation*, 9(9), 827. <https://doi.org/10.3390/fermentation9090827>
- Li, Y., Xia, S., Jiang, X., Feng, C., Gong, S., Ma, J., Fang, Z., Yin, J., i Yin, Y. (2021). Gut Microbiota and Diarrhea: An Updated Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 625210. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.625210>
- Lima, T., Fernandes, L., Matias, M., Mateus, A., Silveira, E., Domingues, S., Pomba, C., i Da Silva, G. J. (2022). Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and *mcr-1* and -4 Genes in *Escherichia coli* Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. *Animals*, 12(17), 2209. <https://doi.org/10.3390/ani12172209>
- Lin, C.-M., Gao, X., Oka, T., Vlasova, A. N., Esseili, M. A., Wang, Q., i Saif, L. J. (2015). Antigenic Relationships among Porcine Epidemic Diarrhea Virus and Transmissible Gastroenteritis Virus Strains. *Journal of Virology*, 89(6), 3332-3342. <https://doi.org/10.1128/jvi.03196-14>
- Liu, B., Furevi, A., Perepelov, A. V., Guo, X., Cao, H., Wang, Q., Reeves, P. R., Knirel, Y. A., Wang, L., i Widmalm, G. (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, 44(6), 655-683. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz028>
- Liu, C. M., Aziz, M., Park, D. E., Wu, Z., Stegger, M., Li, M., Wang, Y., Schmidlin, K., Johnson, T. J., Koch, B. J., Hungate, B. A., Nordstrom, L., Gauld, L., Weaver, B., Rolland,

- D., Statham, S., Hall, B., Sariya, S., Davis, G. S., ... Price, L. B. (2023). Using source-associated mobile genetic elements to identify zoonotic extraintestinal *E. coli* infections. *One Health*, *16*, 100518. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100518>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., i Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(2), 161-168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Loof, T., Johnson, T. A., Allen, H. K., Bayles, D. O., Alt, D. P., Stedtfeld, R. D., Sul, W. J., Stedtfeld, T. M., Chai, B., Cole, J. R., Hashsham, S. A., Tiedje, J. M., i Stanton, T. B. (2012). In-feed antibiotic effects on the swine intestinal microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(5). <https://doi.org/10.1073/pnas.1120238109>
- Lopatkin, A. J., Meredith, H. R., Srimani, J. K., Pfeiffer, C., Durrett, R., i You, L. (2017). Persistence and reversal of plasmid-mediated antibiotic resistance. *Nature Communications*, *8*(1), 1689. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01532-1>
- Lorusso, A. B., Carrara, J. A., Barroso, C. D. N., Tuon, F. F., i Faoro, H. (2022). Role of Efflux Pumps on Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(24), 15779. <https://doi.org/10.3390/ijms232415779>
- Lu, X., Du, Y., Peng, K., Zhang, W., Li, J., Wang, Z., i Li, R. (2022). Coexistence of tet(X4), mcr-1, and bla<sub>NDM-5</sub> in ST6775 *Escherichia coli* Isolates of Animal Origin in China. *Microbiology Spectrum*, *10*(2), e00196-22. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00196-22>
- Lu, Y., Liu, J. H., Yue, C., Bergen, P. J., Wu, R., Li, J., i Liu, Y. Y. (2022). Overexpression of mcr-1 disrupts cell envelope synthesis and causes the dysregulation of carbon metabolism, redox balance and nucleic acids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *60*(3), 106643. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2022.106643>
- Ludden, C., Raven, K. E., Jamrozy, D., Gouliouris, T., Blane, B., Coll, F., de Goffau, M., Naydenova, P., Horner, C., Hernandez-Garcia, J., Wood, P., Hadjirin, N., Radakovic, M., Brown, N. M., Holmes, M., Parkhill, J., i Peacock, S. J. (2019). One health genomic



- surveillance of escherichia coli demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *mBio*, 10(1), e02693-18. <https://doi.org/10.1128/mBio.02693-18>
- Luppi, A. (2017). Swine enteric colibacillosis: Diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Management*, 3, 16. <https://doi.org/10.1186/s40813-017-0063-4>
- MacFadden, D. R., McGough, S. F., Fisman, D., Santillana, M., i Brownstein, J. S. (2018). Antibiotic resistance increases with local temperature. *Nature Climate Change*, 8(6), 510-514. <https://doi.org/10.1038/s41558-018-0161-6>
- Macias Rioseco, M., Beingesser, J., i Uzal, F. A. (2012). Freezing or adding trypsin inhibitor to equine intestinal contents extends the lifespan of Clostridium perfringens beta toxin for diagnostic purposes. *Anaerobe*, 18(3), 357-360. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2012.03.003>
- Mageiros, L., Méric, G., Bayliss, S. C., Pensar, J., Pascoe, B., Mourkas, E., Calland, J. K., Yahara, K., Murray, S., Wilkinson, T. S., Williams, L. K., Hitchings, M. D., Porter, J., Kemmett, K., Feil, E. J., Jolley, K. A., Williams, N. J., Corander, J., i Sheppard, S. K. (2021). Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian Escherichia coli. *Nature Communications*, 12(1), 765. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20988-w>
- Magiorakos, A.-P., Srinivasan, A., Carey, R. B., Carmeli, Y., Falagas, M. E., Giske, C. G., Harbarth, S., Hindler, J. F., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, D. L., Rice, L. B., Stelling, J., Struelens, M. J., Vatopoulos, A., Weber, J. T., i Monnet, D. L. (2012). Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection : The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 18(3), 268-281. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>
- Malik, Y. A. (2020). Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *The Malaysian journal of pathology*, 42(1), 3-11.
- Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Meyer, E., i Okoh, A. (2018). Antibiotic use in agriculture and its consequential resistance in environmental sources: Potential public health implications. *Molecules*, 23(4), 795. <https://doi.org/10.3390/molecules23040795>

- Manzanilla, E. G., Perez, J. F., Martin, M., Kamel, C., Baucells, F., i Gasa, J. (2004). Effect of plant extracts and formic acid on the intestinal equilibrium of early-weaned pigs. *Journal of Animal Science*, 82(11), 3210-3218. <https://doi.org/10.2527/2004.82113210x>
- Marchetti, R., Faeti, V., Gallo, M., Pindo, M., Bochicchio, D., Buttazzoni, L., i Della Casa, G. (2023). Protein Content in the Diet Influences Growth and Diarrhea in Weaning Piglets. *Animals*, 13(5), 795. <https://doi.org/10.3390/ani13050795>
- Marthaler, D., Homwong, N., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnsens, J., i Ciarlet, M. (2014). Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *Journal of Virological Methods*, 209, 30-34. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.018>
- Martínez-Meléndez, A., Cruz-López, F., Morfin-Otero, R., Maldonado-Garza, H. J., i Garza-González, E. (2022). An Update on Clostridioides difficile Binary Toxin. *Toxins*, 14(5), 305. <https://doi.org/10.3390/toxins14050305>
- Martiny, H.-M., Munk, P., Brinch, C., Szarvas, J., Aarestrup, F. M., i Petersen, T. N. (2022). Global Distribution of mcr Gene Variants in 214K Metagenomic Samples. *mSystems*, 7(2), e0010522. <https://doi.org/10.1128/msystems.00105-22>
- Massacci, F. R., Berri, M., Lemonnier, G., Guettier, E., Blanc, F., Jardet, D., Rossignol, M. N., Mercat, M. J., Doré, J., Lepage, P., Rogel-Gaillard, C., i Estellé, J. (2020). Late weaning is associated with increased microbial diversity and Faecalibacterium prausnitzii abundance in the fecal microbiota of piglets. *Animal Microbiome*, 2(1), 2. <https://doi.org/10.1186/s42523-020-0020-4>
- Matamoros, S., Van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Willemse, N., Melles, D. C., Penders, J., Vinh, T. N., Thi Hoa, N., Bootsma, M. C. J., Van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Grobusch, M., Molhoek, N., Oude Lashof, A. M. L., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., De Jong, M. D., i Schultsz, C. (2017). Global phylogenetic analysis of Escherichia coli and plasmids carrying the mcr-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific Reports*, 7(1), 15364. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>
- Mateu, E. M., Martin, M., Darwich, L., Mejía, W., Fría, N., i García Peña, F. J. (2002). Antimicrobial susceptibility of Salmonella strains isolated from swine in Catalonia, Spain. *Veterinary Record*, 150(5), 147-150. <https://doi.org/10.1136/vr.150.5.147>

- Matlock, W., Lipworth, S., Chau, K. K., Oun, M. A., Barker, L., Kavanagh, J., Andersson, M., Oakley, S., Morgan, M., Crook, D. W., Read, D. S., Anjum, M., Shaw, L. P., i Stoesser, N. (2023). Enterobacterales plasmid sharing amongst human bloodstream infections, livestock, wastewater, and waterway niches in Oxfordshire, UK. *eLife*, *12*, e85302. <https://doi.org/10.7554/elife.85302>
- Matsubayashi, M., Suzuta, F., Terayama, Y., Shimojo, K., Yui, T., Haritani, M., i Shibahara, T. (2014). Ultrastructural characteristics and molecular identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis: Implications for pathogenicity. *Parasitology Research*, *113*(8), 3023–3028. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3965-y>
- Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S. M., Palombo, E. A., Iturriza-Gómara, M., Maes, P., Patton, J. T., Rahman, M., i Van Ranst, M. (2008). Full Genome-Based Classification of Rotaviruses Reveals a Common Origin between Human Wa-Like and Porcine Rotavirus Strains and Human DS-1-Like and Bovine Rotavirus Strains. *Journal of Virology*, *82*(7), 3204-3219. <https://doi.org/10.1128/jvi.02257-07>
- McClane, B. A. (2005). Clostridial enterotoxins. En *Handbook on Clostridia*. Taylor & Francis.
- Mendelson, M., Laxminarayan, R., Limmathurotsakul, D., Kariuki, S., Gyansa-Lutterrodt, M., Charani, E., Singh, S., Walia, K., Gales, A. C., i Mpundu, M. (2024). Antimicrobial resistance and the great divide: inequity in priorities and agendas between the Global North and the Global South threatens global mitigation of antimicrobial resistance. *The Lancet Global Health*, *12*(3), e516–e521. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(23\)00554-5](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(23)00554-5)
- Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C., i Segalés, J. (2018). Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain. *Porcine Health Management*, *4*, 5. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0083-8>
- Michalski, C. W., Di Mola, F. F., Kümmel, K., Wendt, M., Köninger, J. S., Giese, T., Giese, N. A., i Friess, H. (2006). Human inflammatory bowel disease does not associate with *Lawsonia intracellularis* infection. *BMC Microbiology*, *6*, 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-6-81>

- Miguela-Villoldo, P., Hernández, M., Moreno, M. A., Rodríguez-Lázaro, D., Quesada, A., Domínguez, L., i Ugarte-Ruiz, M. (2019). National colistin sales versus colistin resistance in Spanish pig production. *Research in Veterinary Science*, 123(1), 141-143. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.010>
- Miguela-Villoldo, P., Moreno, M. A., Rodríguez-Lázaro, D., Gallardo, A., Hernández, M., Serrano, T., Sáez, J. L., de Frutos, C., Agüero, M., Quesada, A., Domínguez, L., i Ugarte-Ruiz, M. (2022). Longitudinal study of the mcr-1 gene prevalence in Spanish food-producing pigs from 1998 to 2021 and its relationship with the use of polymyxins. *Porcine Health Management*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00255-0>
- Millan, A. S., Peña-Miller, R., Toll-Riera, M., Halbert, Z. V., McLean, A. R., Cooper, B. S., i Maclean, R. C. (2014). Positive selection and compensatory adaptation interact to stabilize non-transmissible plasmids. *Nature Communications*, 5, 5208. <https://doi.org/10.1038/ncomms6208>
- Miltgen, G., Martak, D., Valot, B., Kamus, L., Garrigos, T., Verchere, G., Gbaguidi-Haore, H., Ben Cimon, C., Ramiandrisoa, M., Picot, S., Lignereux, A., Masson, G., Jaffar-Bandjee, M. C., Belmonte, O., Cardinale, E., Hocquet, D., Mavingui, P., i Bertrand, X. (2022). One Health compartmental analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* on Reunion Island reveals partitioning between humans and livestock. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(5), 1254-1262. <https://doi.org/10.1093/jac/dkac054>
- Mirajkar, N. S., Phillips, N. D., La, T., Hampson, D. J., i Gebhart, C. J. (2016). Characterization and recognition of *Brachyspira hampsonii* sp. Nov., a novel intestinal spirochete that is pathogenic to pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 54(12), 2942-2949. <https://doi.org/10.1128/JCM.01717-16>
- Moeser, A. J., Klok, C. Vander, Ryan, K. A., Wooten, J. G., Little, D., Cook, V. L., i Blikslager, A. T. (2007). Stress signaling pathways activated by weaning mediate intestinal dysfunction in the pig. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, 173-181. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00197.2006.-Weaning>
- Moeser, A. J., Pohl, C. S., i Rajput, M. (2017). Weaning stress and gastrointestinal barrier development: Implications for lifelong gut health in pigs. *Animal Nutrition*, 3(4), 313-321. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.003>

- Mohapatra, S. S., Dwibedy, S. K., i Padhy, I. (2021). Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of Biosciences*, 46(3), 85. <https://doi.org/10.1007/s12038-021-00209-8>
- Moskowitz, S. M., Garber, E., Chen, Y., Clock, S. A., Tabibi, S., Miller, A. K., Doctor, M., i Saiman, L. (2010). Colistin susceptibility testing: Evaluation of reliability for cystic fibrosis isolates of *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(7), 1416-1423. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq131>
- Moxley, R. A. (2000). Edema Disease. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 16(1), 175-185. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0749-0720\(15\)30142-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0749-0720(15)30142-0)
- Muloi, D. M., Hassell, J. M., Wee, B. A., Ward, M. J., Bettridge, J. M., Kivali, V., Kiyong'a, A., Ndinda, C., Gitahi, N., Ouko, T., Imboma, T., Akoko, J., Murungi, M. K., Njoroge, S. M., Muinde, P., Alumasa, L., Kaitho, T., Amany, F., Ogendo, A., ... Woolhouse, M. E. J. (2022). Genomic epidemiology of *Escherichia coli*: antimicrobial resistance through a One Health lens in sympatric humans, livestock and peri-domestic wildlife in Nairobi, Kenya. *BMC Medicine*, 20(1), 471. <https://doi.org/10.1186/s12916-022-02677-7>
- Murray, C. J., Ikuta, K. S., Sharara, F., Swetschinski, L., Robles Aguilar, G., Gray, A., Han, C., Bisignano, C., Rao, P., Wool, E., Johnson, S. C., Browne, A. J., Chipeta, M. G., Fell, F., Hackett, S., Haines-Woodhouse, G., Kashef Hamadani, B. H., Kumaran, E. A. P., McManigal, B., ... Naghavi, M. (2022). Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*, 399(10325), 629-655. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02724-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02724-0)
- Murray, L. M., Hayes, A., Snape, J., Kasprzyk-Hordern, B., Gaze, W. H., i Murray, A. K. (2024). Co-selection for antibiotic resistance by environmental contaminants. *npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 9. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00026-7>
- Murrell, T. G. C., i Walker, P. D. (1978). Pig-bel: A zoonosis? *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(11), 231-235.
- Mushtaq, M., Zubair, S., Råsbäck, T., Bongcam-Rudloff, E., i Jansson, D. S. (2015). *Brachyspira suanatina* sp. nov., an enteropathogenic intestinal spirochaete isolated from pigs and mallards: Genomic and phenotypic characteristics. *BMC Microbiology*, 15(1), 208. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0537-y>

- Nagahama, M., Ochi, S., Oda, M., Miyamoto, K., Takehara, M., i Kobayashi, K. (2015). Recent insights into *Clostridium perfringens* beta-toxin. *Toxins*, 7(2), 396–406. <https://doi.org/10.3390/toxins7020396>
- Nagai, M., Wang, Q., Oka, T., i Saif, L. J. (2020). Porcine sapoviruses: Pathogenesis, epidemiology, genetic diversity, and diagnosis. *Virus Research*, 286(1), 198025. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198025>
- Nagy, B., Wilson, R. A., i Whittam, T. S. (1999). Genetic diversity among *Escherichia coli* isolates carrying fl8 genes from pigs with porcine postweaning diarrhea and edema disease. *Journal of Clinical Microbiology*, 37(5), 1642–1645. <https://doi.org/10.1128/jcm.37.5.1642-1645.1999>
- Nantel-Fortier, N., Gauthier, M., L’Homme, Y., Lachapelle, V., Fravalo, P., i Brassard, J. (2022). The swine enteric virome in a commercial production system and its association with neonatal diarrhea. *Veterinary Microbiology*, 266, 109366. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2022.109366>
- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D. M., i Fairbrother, J. M. (2003). Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 15(3), 242–252. <https://doi.org/10.1177/104063870301500305>
- Ogunlana, L., Kaur, D., Shaw, L. P., Jangir, P., Walsh, T., Uphoff, S., i MacLean, R. C. (2023). Regulatory fine-tuning of *mcr-1* increases bacterial fitness and stabilises antibiotic resistance in agricultural settings. *The ISME Journal*, 17(11), 2058–2069. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01509-7>
- Ortiz Sanjuán, J. M., Manzanilla, E. G., Cabrera-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P. D., Garrido, J. J., Ekhlas, D., O’Neill, L., i Argüello, H. (2024). Fine-tuning of post-weaning pig microbiome structure and functionality by in-feed zinc oxide and antibiotics use. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14, 1354449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1354449>
- Paganini, J. A., Kerkvliet, J. J., Vader, L., Plantinga, N. L., Meneses, R., Corander, J., Willems, R. J. L., Arredondo-Alonso, S., i Schürch, A. C. (2024). PlasmidEC and *gplas2*: an optimized short-read approach to predict and reconstruct antibiotic resistance plasmids in

Escherichia coli. *Microbial Genomics*, 10(2), 001193.  
<https://doi.org/10.1099/mgen.0.001193>

Paganini, J. A., Plantinga, N. L., Arredondo-alonso, S., Willems, R. J. L., i Schürch, A. C. (2021). Recovering escherichia coli plasmids in the absence of long-read sequencing data. *Microorganisms*, 9(8), 1613. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9081613>

Pal, C., Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., i Larsson, D. G. J. (2015). Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics*, 16(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-2153-5>

Palm, M., Fransson, A., Hultén, J., Búcaro Stenman, K., Allouche, A., Chiang, O. E., Constandse, M. L., van Dijk, K. J., Icli, S., Klimesova, B., Korhonen, E., Martínez-Crespo, G., Meggers, D., Naydenova, M., Polychronopoulou, M. A., Schuntermann, D. B., Unal, H., Wasylkowska, A., i Farewell, A. (2022). The Effect of Heavy Metals on Conjugation Efficiency of an F-Plasmid in Escherichia coli. *Antibiotics*, 11(8), 1123. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11081123>

Palmer, A. C., i Kishony, R. (2013). Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. *Nature Reviews Genetics*, 14(4), 243-248. <https://doi.org/10.1038/nrg3351>

Palzkill, T. (2013). Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 91-104. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06796.x>

Pankey, G. A., i Sabath, L. D. (2004). Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases* 38(6), 864–870. <https://doi.org/10.1086/381972>

Paton, J. C., i Paton, A. W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing Escherichia coli infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(3), 450-479. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.3.450>

Pérez-Bosque, A., Polo, J., i Torrallardona, D. (2016). Spray dried plasma as an alternative to antibiotics in piglet feeds, mode of action and biosafety. *Porcine Health Management*, 2, 1-10. <https://doi.org/10.1186/s40813-016-0034-1>

- Perron, K., Caille, O., Rossier, C., Van Delden, C., Dumas, J. L., i Köhler, T. (2004). CzcR-CzcS, a Two-component System Involved in Heavy Metal and Carbapenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Biological Chemistry*, 279(10), 243-248. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312080200>
- Perry, J., Waglechner, N., i Wright, G. (2016). The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 6(6), a025197. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025197>
- Pierron, A., Alassane-Kpembé, I., i Oswald, I. P. (2016). Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. *Animal Nutrition*, 2(2), 63–68. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2016.03.001>
- Pires, J., Huisman, J. S., Bonhoeffer, S., i Van Boeckel, T. P. (2021). Multidrug Resistance Dynamics in Salmonella in Food Animals in the United States: An Analysis of Genomes from Public Databases. *Microbiology Spectrum*, 9(2), e0049521. <https://doi.org/10.1128/spectrum.00495-21>
- Posthaus, H., Kittl, S., Tarek, B., i Bruggisser, J. (2020). Clostridium perfringens type C necrotic enteritis in pigs: diagnosis, pathogenesis, and prevention. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 32(2), 203-212. <https://doi.org/10.1177/1040638719900180>
- Puente, H., Cortey, M., de Nova, P. J. G., Mencía-Ares, Ó., Gómez-García, M., Díaz, I., Arguello, H., Martín, M., Rubio, P., i Carvajal, A. (2021). First identification and characterization of rotavirus H in swine in Spain. *Transboundary and Emerging Diseases*, 68(6), 3055-3069. <https://doi.org/10.1111/tbed.13992>
- Pulss, S., Semmler, T., Prenger-Berninghoff, E., Bauerfeind, R., i Ewers, C. (2017). First report of an Escherichia coli strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50(2), 232-236. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.03.014>
- Ramis, G., Pérez-Esteruelas, L., Gómez-Cabrera, C. G., de Pascual-Monreal, C., Gonzalez-Guijarro, B., Párraga-Ros, E., Sánchez-Urbe, P., Claver-Mateos, M., Mendonça-Pascoal, L., i Martínez-Alarcón, L. (2022). Oral and Parenteral Vaccination against Escherichia coli in Piglets Results in Different Responses. *Animals*, 12(20), 2758. <https://doi.org/10.3390/ani12202758>



- Ramos, S., Igrejas, G., Rodrigues, J., Capelo-Martinez, J. L., i Poeta, P. (2012). Genetic characterisation of antibiotic resistance and virulence factors in vanA-containing enterococci from cattle, sheep and pigs subsequent to the discontinuation of the use of avoparcin. *Veterinary Journal*, 193(1), 301-303. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2011.12.007>
- Rath, A., Rautenschlein, S., Rzeznitzek, J., Breves, G., Hewicker-Trautwein, M., Waldmann, K. H., i von Altrock, A. (2021). Impact of *Campylobacter* spp. On the integrity of the porcine gut. *Animals*, 11(9), 2742. <https://doi.org/10.3390/ani11092742>
- Ren, W., Yu, B., Yu, J., Zheng, P., Huang, Z., Luo, J., Mao, X., He, J., Yan, H., Wu, J., Chen, D., i Luo, Y. (2022). Lower abundance of *Bacteroides* and metabolic dysfunction are highly associated with the post-weaning diarrhea in piglets. *Science China Life Sciences*, 65(10), 2062–2075. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-2068-6>
- Reynaga, E., Torres, C., Garcia-Nuñez, M., Navarro, M., Vilamala, A., Puigoriol, E., Enrico Lucchetti, G., Nunes, D., Silva, A., i Sabrià, M. (2018). Prevalence of MRSA ST398 carriage in nursing home residents in an area of Spain with a high density of pig farming. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 39(1), 90-93. <https://doi.org/10.1017/ice.2017.244>
- Rhoades, N. S., Cinco, I. R., Hendrickson, S. M., Prongay, K., Haertel, A. J., Flores, G. E., Slifka, M. K., i Messaoudi, I. (2024). Infant diarrheal disease in rhesus macaques impedes microbiome maturation and is linked to uncultured *Campylobacter* species. *Communications Biology*, 7(1), 37. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05695-0>
- Rhouma, M., Beaudry, F., i Letellier, A. (2016). Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(2), 119-126. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008>
- Rhouma, M., Fairbrother, J. M., Beaudry, F., i Letellier, A. (2017). Post weaning diarrhea in pigs: Risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 59(1), 31. <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7>
- Robertson, J., i Nash, J. H. E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial genomics*, 4(8), e000206. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>

- Robinson, T. P., Bu, D. P., Carrique-Mas, J., Fèvre, E. M., Gilbert, M., Grace, D., Hay, S. I., Jiwakanon, J., Kakkar, M., Kariuki, S., Laxminarayan, R., Lubroth, J., Magnusson, U., Ngoc, P. T., Van Boeckel, T. P., i Woolhouse, M. E. J. (2016). Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *110*(7), 377–380. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trw048>
- Rood, J. I., Adams, V., Lacey, J., Lyras, D., McClane, B. A., Melville, S. B., Moore, R. J., Popoff, M. R., Sarker, M. R., Songer, J. G., Uzal, F. A., i Van Immerseel, F. (2018). Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. *Anaerobe*, *53*, 5-10. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.04.011>
- Saif, L. J., Pensaert, M. B., Sestak, K., Yeo, S.-G., i Jung, K. (2019). Coronaviruses. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.
- Sánchez-Vizcaíno, J. M., Laddomada, A., i Arias, M. L. (2019). African Swine Fever Virus. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.
- Sato, R., Yahata, Y., Taira, H., Saito, T., Ishii, T., Yamazaki, S., Yamamoto, K., Kikuchi, R., Izumiya, H., Iyoda, S., Ohnishi, M., i Takahashi, Y. (2022). Multijurisdictional Outbreak of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 Caused by Consumption of Ready-to-Eat Grilled Skewered Meat in Niigata, Japan. *Foodborne Pathogens and Disease*, *19*(6), 400-407. <https://doi.org/10.1089/fpd.2021.0083>
- Schwengers, O., Barth, P., Falgenhauer, L., Hain, T., Chakraborty, T., i Goesmann, A. (2020). Platon: Identification and characterization of bacterial plasmid contigs in short-read draft assemblies exploiting protein sequence-based replicon distribution scores. *Microbial Genomics*, *6*(10), mgen000398. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000398>
- Segalés, J. (2012). Porcine circovirus type 2 (PCV2) infections: Clinical signs, pathology and laboratory diagnosis. *Virus Research*, *164*(1-2), 10-19. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.10.007>
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N., i Whittam, T. S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*, *51*(5), 873–884. <https://doi.org/10.1128/aem.51.5.873-884.1986>

- Seo, K., Do, K. H., i Lee, W. K. (2022). Molecular characteristics of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolated from suckling piglets with colibacillosis. *BMC Microbiology*, 22(1), 216. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02632-9>
- Serrano-Fujarte, I., Calva, E., García-Domínguez, J., Ortiz-Jiménez, S., i Puente, J. L. (2024). Population structure and ongoing microevolution of the emerging multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium ST213. *npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 10. <https://doi.org/10.1038/s44259-024-00027-6>
- Shen, C., Zhong, L. L., Yang, Y., Doi, Y., Paterson, D. L., Stoesser, N., Ma, F., El-Sayed Ahmed, M. A. E. G., Feng, S., Huang, S., Li, H. Y., Huang, X., Wen, X., Zhao, Z., Lin, M., Chen, G., Liang, W., Liang, Y., Xia, Y., ... Tian, G. B. (2020). Dynamics of *mcr-1* prevalence and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* after the cessation of colistin use as a feed additive for animals in China: a prospective cross-sectional and whole genome sequencing-based molecular epidemiological study. *The Lancet Microbe*, 1(1), e34–e43. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30005-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30005-7)
- Shen, Y., Zhou, H., Xu, J., Wang, Y., Zhang, Q., Walsh, T. R., Shao, B., Wu, C., Hu, Y., Yang, L., Shen, Z., Wu, Z., Sun, Q., Ou, Y., Wang, Y., Wang, S., Wu, Y., Cai, C., Li, J., ... Wang, Y. (2018). Anthropogenic and environmental factors associated with high incidence of *mcr-1* carriage in humans across China. *Nature Microbiology*, 3(9), 1054–1062. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0205-8>
- Shi, J., Zhu, H., Liu, C., Xie, H., Li, C., Cao, X., i Shen, H. (2023). Epidemiological and genomic characteristics of global *mcr*-positive *Escherichia coli* isolates. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1105401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1105401>
- Sincak, M., Šoltisová, K., Luptakova, A., i Sedlakova-Kadukova, J. (2023). Overproduction of Efflux Pumps as a Mechanism of Metal and Antibiotic Cross-Resistance in the Natural Environment. *Sustainability*, 15(11), 8767. <https://doi.org/10.3390/su15118767>
- Siu, K. L., Kok, K. H., Ng, M. H. J., Poon, V. K. M., Yuen, K. Y., Zheng, B. J., i Jin, D. Y. (2009). Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3·TANK·TBK1/IKKε complex. *Journal of Biological Chemistry*, 284(24), 16202–16209. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.008227>

- Sjölund, M., Zoric, M., i Wallgren, P. (2014). Financial impact on pig production: III. Gastrointestinal disorders. *European Symposium of Porcine Health Management*, 7-9.
- Snesrud, E., He, S., Chandler, M., Dekker, J. P., Hickman, A. B., McGann, P., i Dyda, F. (2016). A model for transposition of the colistin resistance gene *mcr-1* by ISAp11. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(11), 6973–6976. <https://doi.org/10.1128/AAC.01457-16>
- Soliani, L., Rugna, G., Prosperi, A., Chiapponi, C., i Luppi, A. (2023). Salmonella Infection in Pigs: Disease, Prevalence, and a Link between Swine and Human Health. *Pathogens*, 12(10), 1267. <https://doi.org/10.3390/pathogens12101267>
- Songer, J. G., i Uzal, F. A. (2005). Clostridial enteric infections in pigs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 17(6), 528–536. <https://doi.org/10.1177/104063870501700602>
- Spapen, H., Jacobs, R., Van Gorp, V., Troubleyn, J., i Honoré, P. M. (2011). Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Annals of Intensive Care*, 1(1), 14. <https://doi.org/10.1186/2110-5820-1-14>
- Sun, J., Du, L., Li, X. L., Zhong, H., Ding, Y., Liu, Z., i Ge, L. (2019). Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets. *Scientific Reports*, 9(1), 18675. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55328-y>
- Susick, E. K., Putnam, M., Bermudez, D. M., i Thakur, S. (2012). Longitudinal study comparing the dynamics of *Clostridium difficile* in conventional and antimicrobial free pigs at farm and slaughter. *Veterinary Microbiology*, 157(1-2), 172–178. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.017>
- Szczotka-Bochniarz, A., Karamon, J., Nowak, A., Porowski, M., Karbowski, P., Holeniewski, A., i Pejsak, Z. (2021). *Balantidium coli* in pig farms suspected of porcine circovirus type 2 (PCV2) associated enteritis. *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 65(4), 425–430. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2021-0057>
- Tang, Q., Lan, T., Zhou, C., Gao, J., Wu, L., Wei, H., Li, W., Tang, Z., Tang, W., Diao, H., Xu, Y., Peng, X., Pang, J., Zhao, X., i Sun, Z. (2024). Nutrition strategies to control post-weaning diarrhea of piglets: From the perspective of feeds. *Animal Nutrition*, 17, 297-311. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aninu.2024.03.006>

- Tang, X., Xiong, K., Fang, R., i Li, M. (2022). Weaning stress and intestinal health of piglets: A review. *Frontiers in Immunology*, 13, 1042778. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1042778>
- Thomson, J. R., i Friendship, R. M. (2019). Digestive system. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.
- Thorpe, H. A., Booton, R., Kallonen, T., Gibbon, M. J., Couto, N., Passet, V., López-Fernández, S., Rodrigues, C., Matthews, L., Mitchell, S., Reeve, R., David, S., Merla, C., Corbella, M., Ferrari, C., Comandatore, F., Marone, P., Brisse, S., Sasser, D., ... Feil, E. J. (2022). A large-scale genomic snapshot of *Klebsiella* spp. isolates in Northern Italy reveals limited transmission between clinical and non-clinical settings. *Nature Microbiology*, 7(12), 2054–2067. <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01263-0>
- Tian, Q. Y., i Piao, X. S. (2019). Essential oil blend could decrease diarrhea prevalence by improving antioxidative capability for weaned pigs. *Animals*, 9(10), 847. <https://doi.org/10.3390/ani9100847>
- Tiwari, S. K., van der Putten, B. C. L., Fuchs, T. M., Vinh, T. N., Bootsma, M., Oldenkamp, R., La Ragione, R., Matamoros, S., Hoa, N. T., Berens, C., Leng, J., Álvarez, J., Ferrandis-Vila, M., Ritchie, J. M., Fruth, A., Schwarz, S., Domínguez, L., Ugarte-Ruiz, M., Bethe, A., ... Schultsz, C. (2023). Genome-wide association reveals host-specific genomic traits in *Escherichia coli*. *BMC Biology*, 21(1), 76. <https://doi.org/10.1186/s12915-023-01562-w>
- Toledo, A., Gómez, D., Cruz, C., Carreón, R., López, J., Giono, S., i Castro, A. M. (2012). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *Journal of Medical Microbiology*, 61(1), 148-156. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.031302-0>
- Trongjit, S., i Chuanchuen, R. (2021). Whole genome sequencing and characteristics of *Escherichia coli* with coexistence of ESBL and mcr genes from pigs. *PLoS ONE*, 16(11), e0260011. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260011>
- Tyson, G. H., Li, C., Hsu, C. H., Ayers, S., Borenstein, S., Mukherjee, S., Tran, T. T., McDermot, P. F., i Zhao, S. (2020). The mcr-9 gene of salmonella and escherichia coli is not associated with colistin resistance in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 64(8), e00573-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00573-20>

- Uzal, F. A. (2016). Diseases Produced by *Clostridium perfringens* Type A in Mammalian Species. En *Clostridial Diseases in Animals*. Wiley-Blackwell.
- Uzal, F. A., i Glenn Songer, J. (2019). Clostridial diseases. En *Diseases of Swine*. Wiley-Blackwell.
- Uzal, F. A., Navarro, M. A., Asin, J., Boix, O., Ballarà-Rodríguez, I., i Gibert, X. (2023). Clostridial diarrheas in piglets: A review. *Veterinary Microbiology*, 280, 109691. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2023.109691>
- Uzal, F. A., Plattner, B. L., i Hostetter, J. M. (2016). Alimentary system. En *Jubb, Kennedy and Palmer's Pathology of Domestic Animals Volume Two*. Elsevier.
- Valkó, A., Bálint, Á., Bozsa, Á., i Cságola, A. (2019). Prevalence of antibodies against transmissible gastroenteritis virus (TGEV) in Hungary. *Veterinary and Animal Science*, 7(November 2018), 100042. <https://doi.org/10.1016/j.vas.2018.11.003>
- van Asten, A. J. A. M., van der Wiel, C. W., Nikolaou, G., Houwers, D. J., i Gröne, A. (2009). A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. *Veterinary Microbiology*, 136(3-4), 411–412. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.11.024>
- van Beers-Schreurs, H. M. G., Nabuurs, M. J. A., Vellenga, L., Valk, H. J. K. der, Wensing, T., i Breukink, H. J. (1998). Weaning and the Weanling Diet Influence the Villous Height and Crypt Depth in the Small Intestine of Pigs and Alter the Concentrations of Short-Chain Fatty Acids in the Large Intestine and Blood. *The Journal of Nutrition*, 128(6), 947-953. <https://doi.org/10.1093/jn/128.6.947>
- van der Graaf-Van Bloois, L., Wagenaar, J. A., i Zomer, A. L. (2021). RFPlasmid: predicting plasmid sequences from short-read assembly data using machine learning. *Microbial Genomics*, 7(11), 000683. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000683>
- Van Gompel, L., Luiken, R. E. C., Hansen, R. B., Munk, P., Bouwknecht, M., Heres, L., Greve, G. D., Scherpenisse, P., Jongerius-Gortemaker, B. G. M., Tersteeg-Zijderveld, M. H. G., García-Cobos, S., Dohmen, W., Dorado-García, A., Wagenaar, J. A., Urlings, B. A. P., Aarestrup, F. M., Mevius, D. J., Heederik, D. J. J., Schmitt, H., ... Smit, L. A. M. (2020). Description and determinants of the faecal resistome and microbiome of farmers and slaughterhouse workers: A metagenome-wide cross-sectional study. *Environment International*, 143, 105939. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105939>

- Vangroenweghe, F. A. C. J., i Boone, M. (2022). Vaccination with an Escherichia coli F4/F18 Vaccine Improves Piglet Performance Combined with a Reduction in Antimicrobial Use and Secondary Infections Due to Streptococcus suis. *Animals*, 12(17), 2231. <https://doi.org/10.3390/ani12172231>
- Vannucci, F. A., Gebhart, C. J., i McOrist, S. (2019). Proliferative Enteropathy. En *Diseases of swine*. Wiley-Blackwell.
- Vannucci, F. A., Wattanaphansak, S., i Gebhart, C. J. (2012). An alternative method for cultivation of Lawsonia intracellularis. *Journal of Clinical Microbiology*, 50(3) , 1070-1072. <https://doi.org/10.1128/JCM.05976-11>
- Vasquez, R., Oh, J. K., Song, J. H., i Kang, D. K. (2022). Gut microbiome-produced metabolites in pigs: a review on their biological functions and the influence of probiotics. *Journal of Animal Science and Technology*, 64(4), 671–695. <https://doi.org/10.5187/jast.2022.e58>
- Vidal, A., Aguirre, L., Seminati, C., Tello, M., Redondo, N., Martín, M., i Darwich, L. (2020). Antimicrobial Resistance Profiles and Characterization of Escherichia coli Strains from Cases of Neonatal Diarrhea in Spanish Pig Farms. *Veterinary Sciences*, 7(2), 48. <https://doi.org/10.3390/vetsci7020048>
- Vidal, A., Martín-Valls, G. E., Tello, M., Mateu, E., Martín, M., i Darwich, L. (2019). Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain. *Veterinary Microbiology*, 237(9), 108419. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108419>
- Vielva, L., De Toro, M., Lanza, V. F., i De La Cruz, F. (2017). PLACNETw: A web-based tool for plasmid reconstruction from bacterial genomes. *Bioinformatics*, 33(23) , 3796–3798. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx462>
- Viñes, J., Cuscó, A., Napp, S., Alvarez, J., Saez-Llorente, J. L., Rosàs-Rodoreda, M., Francino, O., i Migura-Garcia, L. (2021). Transmission of similar mcr-1 carrying plasmids among different escherichia coli lineages isolated from livestock and the farmer. *Antibiotics*, 10(3), 313. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10030313>
- VinodhKumar, O. R., Sircar, S., Pruthvishree, B. S., Nirupama, K. R., Singh, B. R., Sinha, D. K., Rupner, R., Karthikeyan, A., Karthikeyan, R., Dubal, Z. B., & Malik, Y. S. (2020). Cross-sectional study on rotavirus A (RVA) infection and assessment of risk factors in

- pre- and post-weaning piglets in India. *Tropical animal health and production*, 52(1), 445–452. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01999-8>
- Vlasova, A. N., Amimo, J. O., i Saif, L. J. (2017). Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses*, 9(3), 1-27. <https://doi.org/10.3390/v9030048>
- Vlasova, A. N., Wang, Q., Jung, K., Langel, S. N., Malik, Y. S., i Saif, L. J. (2020). Porcine Coronaviruses. En *Emerging and Transboundary Animal Viruses*. Springer
- Wachino, J. I., Doi, Y., i Arakawa, Y. (2020). Aminoglycoside Resistance: Updates with a Focus on Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*, 34(4), 887–902. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2020.06.002>
- Waddington, C., Carey, M. E., Boinett, C. J., Higginson, E., Veeraraghavan, B., i Baker, S. (2022). Exploiting genomics to mitigate the public health impact of antimicrobial resistance. *Genome Medicine*, 14(1), 15. <https://doi.org/10.1186/s13073-022-01020-2>
- Wang, R., Van Dorp, L., Shaw, L. P., Bradley, P., Wang, Q., Wang, X., Jin, L., Zhang, Q., Liu, Y., Rieux, A., Dorai-Schneiders, T., Weinert, L. A., Iqbal, Z., Didelot, X., Wang, H., i Balloux, F. (2018). The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene *mcr-1*. *Nature Communications*, 9(1), 1179. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03205-z>
- Wang, W., Guo, Q., Xu, X., Sheng, Z. K., Ye, X., i Wang, M. (2014). High-level tetracycline resistance mediated by efflux pumps Tet(A) and Tet(A)-1 with two start codons. *Journal of Medical Microbiology*, 63(11), 1454-1459. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.078063-0>
- Wang, W., Van Noten, N., Degroote, J., Romeo, A., Vermeir, P., i Michiels, J. (2019). Effect of zinc oxide sources and dosages on gut microbiota and integrity of weaned piglets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 103(1), 231-241. <https://doi.org/10.1111/jpn.12999>
- Wang, X., Tsai, T., Deng, F., Wei, X., Chai, J., Knapp, J., Apple, J., Maxwell, C. V., Lee, J. A., Li, Y., i Zhao, J. (2019). Longitudinal investigation of the swine gut microbiome from birth to market reveals stage and growth performance associated bacteria. *Microbiome*, 7(1), 109. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0721-7>
- Wang, Z., Li, J., Li, J., Li, Y., Wang, L., Wang, Q., Fang, L., Ding, X., Huang, P., Yin, J., Yin, Y., i Yang, H. (2019). Protective effect of chicken egg yolk immunoglobulins (IgY)



- against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 adhesion in weaned piglets. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1958-x>
- Weese, J. S., Wakeford, T., Reid-Smith, R., Rousseau, J., i Friendship, R. (2010). Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe*, 16(5), 501-504. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.08.001>
- Weström, B., Arévalo Sureda, E., Pierzynowska, K., Pierzynowski, S. G., i Pérez-Cano, F. J. (2020). The Immature Gut Barrier and Its Importance in Establishing Immunity in Newborn Mammals. *Frontiers in Immunology*, 11, 1153. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01153>
- Wick, R. (2023). *ONT-only accuracy: 5 kHz and Dorado*. Ryan Wick's bioinformatics blog. <https://rrwick.github.io/2023/10/24/ont-only-accuracy-update.html>
- Wick, R. R., i Holt, K. E. (2022). Polypolish: Short-read polishing of long-read bacterial genome assemblies. *PLoS Computational Biology*, 18(1), e1009802. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1009802>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., i Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), e1005595. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Wiegand, I., Hilpert, K., i Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163-175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
- Wiegers, C., van Beek, E. H. T., i Larsen, O. F. A. (2023). Clinical research with probiotics as an indicator of global valorization since the year 2000. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1323920. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1323920>
- Wieler, L. H., Ilieff, A., Herbst, W., Bauer, C., Vieler, E., Bauerfeind, R., Failing, K., Klös, H., Wengert, D., Baljer, G., i Zahner, H. (2008). Prevalence of Enteropathogens in Suckling and Weaned Piglets with Diarrhoea in Southern Germany. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 48(2), 151-159. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2001.00431.x>
- Willey, J. M., Sherwood, Linda., Woolverton, C. J., i Prescott, L. M. (2009). En *Prescott, Harley, and Klein microbiología*. McGraw-Hill.

- Wilson, H., i Török, M. E. (2018). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics*, 4(7), e000197. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., i Achtman, M. (2006). Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
- Woyda, R., Oladeinde, A., i Abdo, Z. (2023). Chicken Production and Human Clinical *Escherichia coli* Isolates Differ in Their Carriage of Antimicrobial Resistance and Virulence Factors. *Applied and Environmental Microbiology*, 89(2), e0116722. <https://doi.org/10.1128/aem.01167-22>
- Wu, R., Yi, L. X., Yu, L. F., Wang, J., Liu, Y., Chen, X., Lv, L., Yang, J., i Liu, J. H. (2018). Fitness advantage of *mcr-1*-bearing IncI2 and IncX4 plasmids in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 9(2), 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00331>
- Yang, Q., Huang, X., Wang, P., Yan, Z., Sun, W., Zhao, S., i Gun, S. (2019). Longitudinal development of the gut microbiota in healthy and diarrheic piglets induced by age-related dietary changes. *MicrobiologyOpen*, 8(12), e923. <https://doi.org/10.1002/mbo3.923>
- Yang, Q., Li, M., Spiller, O. B., Andrey, D. O., Hinchliffe, P., Li, H., MacLean, C., Niumsup, P., Powell, L., Pritchard, M., Papkou, A., Shen, Y., Portal, E., Sands, K., Spencer, J., Tansawai, U., Thomas, D., Wang, S., Wang, Y., ... Walsh, T. (2017). Balancing *mcr-1* expression and bacterial survival is a delicate equilibrium between essential cellular defence mechanisms. *Nature Communications*, 8(1), 2054. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02149-0>
- Yang, S., Li, Y., Wang, B., Yang, N., Huang, X., Chen, Q., Geng, S., Zhou, Y., Shi, H., Wang, L., Brugman, S., Savelkoul, H., i Liu, G. (2020). Acute porcine epidemic diarrhea virus infection reshapes the intestinal microbiota. *Virology*, 548, 200-212. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.07.001>
- Yu, B., Zhang, Y., Yang, L., Xu, J., i Bu, S. (2021). Analysis of antibiotic resistance phenotypes and genes of *Escherichia coli* from healthy swine in Guizhou, China. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 88(1), e1-e8. <https://doi.org/10.4102/OJVR.V88I1.1880>

- Zajacova, Z. S., Konstantinova, L., i Alexa, P. (2012). Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. *Veterinary Microbiology*, *154*(3-4), 369–375. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.029>
- Zapata, C., Estrada, R., Oros, O., Sánchez, D., Maicelo, J. L., Arbizu, C. I., i Coila, P. (2024). Alterations in the gut microbial composition and diversity associated with diarrhea in neonatal Peruvian alpacas. *Small Ruminant Research*, *235*, 107273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2024.107273>
- Zhang, J., Chen, L., Wang, J., Yassin, A. K., Butaye, P., Kelly, P., Gong, J., Guo, W., Li, J., Li, M., Yang, F., Feng, Z., Jiang, P., Song, C., Wang, Y., You, J., Yang, Y., Price, S., Qi, K., ... Wang, C. (2018). Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry. *Scientific Reports*, *8*(1), 3705. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22084-4>
- Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A., & Francis, D. (2007). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Veterinary microbiology*, *123*(1-3), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.02.018>
- Zhao, J., Wan, S., Sun, N., Sun, P., Sun, Y., Khan, A., Guo, J., Zheng, X., Fan, K., Yin, W., i Li, H. (2021). Damage to intestinal barrier integrity in piglets caused by porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *Veterinary research*, *52*(1), 93. <https://doi.org/10.1186/s13567-021-00965-3>
- Zhao, W. H., i Hu, Z. Q. (2013). Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, *39*(1), 79-101. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2012.691460>
- Zheng, X., Nie, K., Xu, Y., Zhang, H., Xie, F., Xu, L., Zhang, Z., Ding, Y., Yin, Z., i Zhang, X. (2023). Fecal Microbial Structure and Metabolic Profile in Post-Weaning Diarrheic Piglets. *Genes*, *14*(6), 1166. <https://doi.org/10.3390/genes14061166>
- Zhou, G., Wang, Q., Wang, Y., Wen, X., Peng, H., Peng, R., Shi, Q., Xie, X., i Li, L. (2023). Outer Membrane Porins Contribute to Antimicrobial Resistance in Gram-Negative

<https://doi.org/10.3390/microorganisms11071690>

Zhou, P., Fan, H., Lan, T., Yang, X. Lou, Shi, W. F., Zhang, W., Zhu, Y., Zhang, Y. W., Xie, Q. M., Mani, S., Zheng, X. S., Li, B., Li, J. M., Guo, H., Pei, G. Q., An, X. P., Chen, J. W., Zhou, L., Mai, K. J., ... Ma, J. Y. (2018). Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature*, 556(7700), 255-259. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0010-9>

Zhou, Z., Shuai, X., Lin, Z., Yu, X., Ba, X., Holmes, M. A., Xiao, Y., Gu, B., i Chen, H. (2023). Association between particulate matter (PM)<sub>2.5</sub> air pollution and clinical antibiotic resistance: a global analysis. *The Lancet Planetary Health*, 7(8), e649–e659. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(23\)00135-3](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(23)00135-3)



# **PART II: OBJECTIUS**



## OBJECTIUS

A partir de la revisió bibliogràfica realitzada, s'han pogut identificar diversos buits de coneixement en relació a la diarrea porcina i l'estudi de l'antibiorresistència associada. Primer de tot, hi ha una manca d'estudis en porcí que confirmin l'associació dels distints patògens amb la diarrea i, a Catalunya, només s'han realitzat amb casos de diarrea neonatal, sense conèixer-ho als garrins en les transicions. Després, tot i que no són pocs els estudis intentant aclarir la relació entre la microbiota i la presentació de diarrea, la majoria s'han realitzat en condicions experimentals o en granges experimentals, fent molt complicada l'extrapolació a les condicions de camp i a la pràctica clínica. També és sabut que l'elevat ús d'antibiòtics en les primeres edats de vida, fa que els nivells de resistència siguin alts i s'hagin de monitoritzar periòdicament. L'ús dels metalls pesants també sembla que implica una major prevalença de resistències, però el mecanisme no està clar. Una hipòtesi seria la co-selecció dels gens de resistència als antibiòtics i als metalls pesants dins del mateix plasmidi, que, per altra banda, també han estat descrits com els elements més importants de cara a la transmissió de les resistències des dels animals de granja als humans.

Així, els objectius de la present tesi doctoral són:

1. Determinar la prevalença dels agents infecciosos en els casos de diarrea en porcs a les transicions, al temps que analitzar la relació de cada agent amb la presentació de diarrea.
2. Estudiar l'associació de la microbiota en condicions de camp i en més d'una granja.
3. Determinar el perfil de resistències antimicrobianes a nivell fenotípic de les soques d'*E. coli* aïllades a les transicions.
4. Caracteritzar a escala genòmica aquestes soques per valorar la localització del gens de resistència als antibiòtics i als metalls pesants en el plasmidi o en el cromosoma i la possible coselecció d'ambdós compostos.
5. Avaluar, donada la seva rellevància per a la salut pública, l'impacte que va tenir la restricció de l'ús de la colistina en el context genòmic del gen *mcr-1* a escala global.





# **PART III: ESTUDIS**



**Estudi 1: Differences in enteric pathogens and intestinal microbiota between  
diarrheic weaned piglets and healthy penmates**

*Veterinary microbiology*, 295, 110162. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110162>

Aquest treball disposa de material suplementari que pot ser consultat a la versió online de l'article: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110162>.





## Differences in enteric pathogens and intestinal microbiota between diarrheic weaned piglets and healthy penmates

Biel Garcias<sup>a,\*</sup>, Lourdes Migura-Garcia<sup>b,c</sup>, Noemí Giler<sup>b,c</sup>, Marga Martín<sup>a</sup>, Laila Darwich<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departament Sanitat i Anatomia Animals, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Cerdanyola del Vallès 08193, Spain

<sup>b</sup> IRTA-UAB Mixed Research Unit in Animal Health, Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), Barcelona, Spain

<sup>c</sup> IRTA Animal Health Programme, CRESA, WOAHA Collaborating Centre for the Research and Control of Emerging and Re-emerging Swine Diseases in Europe, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Postweaning Diarrhea  
Escherichia coli  
Rotavirus  
Microbiota  
16 S  
Swine  
Infectious diseases  
Lactobacillus

### ABSTRACT

Postweaning diarrhea (PWD) is a multifactorial disease caused by different aetiological agents, like viruses or bacteria and where the role of the microbiota remains unclear. The aim of this study was to assess differences between healthy and diarrheic weaned pigs concerning the prevalence of pathogens and changes in the intestinal microbiota. Eighteen farms with PWD were selected and 277 fecal samples were collected (152 diarrheic vs 125 healthy). Presence of Rotavirus A (RVA), B (RVB), C (RVC) and Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV), virulence factors of *Escherichia coli* and *Clostridioides difficile* were analyzed by PCR. Finally, the microbiota composition was also studied by 16 S rRNA sequencing on 148 samples (102 diarrheic vs 46 healthy). RVA (53.95 % vs 36 %,  $p=0.04$ ) and RVB (49.67 % vs 28.8 %,  $p<0.001$ ) were more frequent in diarrheic animals. Furthermore, RVA viral load was higher in diseased animals. VT2 toxin was significantly associated with diarrhea, whereas other virulence factors were not. Presence of *C. difficile* and PEDV was almost negligible. Regarding microbiota changes, Fusobacteriota phylum was more frequent in diarrheic samples and Ruminococcaceae family in healthy penmates. During the first week postweaning, Enterobacteriaceae and Campylobacteriaceae were enriched in animals presenting diarrhea. Furthermore, *Lactobacillus* was detected in those individuals with no RVA infection. In conclusion, RVA seems to play a primary role in PWD. Classic *E. coli* virulence factors were not associated with diarrhea, indicating the need for revising their implication in disease. Moreover, *Lactobacillus* was found frequently in animals negative for RVA, suggesting some protective effect.

### 1. Introduction

Weaning represents a critical phase for animal health since it is generally a very stressful time for the animals. Under natural conditions, piglets are gradually weaned between 10 and 20 weeks of age. However, in conventional farming, piglets are weaned after 3 or 4 weeks of age. This circumstance causes stress and leads to anorexia that generates intestinal inflammation and increases the susceptibility to pathogens. Furthermore, a disruption in the microbiota occurs after the sudden change of feed, making animals prone to enteric pathogens (Gresse et al., 2017).

The environmental and husbandry conditions during this phase favor the emergence of postweaning diarrhea (PWD), which has become a serious problem in swine industry in terms of animal health and economic impact. In addition to viral or bacterial agents known to cause

diarrhea, other factors such as nutrition, poor husbandry practices or different stressors can trigger the occurrence of PWD (Rhouma et al., 2017). This multifactorial aetiology impers a definitive diagnosis. Moreover, at this age piglets are very vulnerable, and they need a fast treatment to survive, which usually consists of empiric antibiotic administration. Thus, weaning is a hotspot of antimicrobial consumption in intensive farms, generating high levels of antimicrobial resistance, worsening the impact on animal and public health (Kyung-hyo et al., 2020).

Regarding viral agents, Rotavirus has been considered the main causative agent of diarrhea in young animals. Different species of Rotavirus such as A (RVA), B (RVB), C (RVC), E (RVE) and H (RVH) have been detected in swine (Vlasova et al., 2017). High prevalence of RVA has been found as causative agent of PWD (Eriksen et al., 2021). The rest of rotavirus species have been less studied, even though they have been

\* Corresponding author.

E-mail address: [biel.garcias@uab.cat](mailto:biel.garcias@uab.cat) (B. Garcias).

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110162>

Received 1 February 2023; Received in revised form 17 June 2024; Accepted 20 June 2024

Available online 25 June 2024

0378-1135/© 2024 The Author(s). Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

found when targeted (Molinari et al., 2016). Coronavirus can also generate PWD. The classical ones are porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and transmissible gastroenteritis virus (TGEV), but other such as swine enteric coronavirus (SeCoV), porcine deltacoronavirus (PDCoV) and swine enteric alphacoronavirus (SeACoV) can also generate diarrhea. In Spain, PEDV re-emerged in 2014 creating serious issues to porcine farms (de Nova et al., 2020).

*Escherichia coli* (*E. coli*) is also considered one of the main causes of PWD. There are different pathotypes involved. Historically, the most frequent pathotype has been enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), with F4 or F18 fimbriae like, which facilitates the entry of bacteria into the enterocytes. Toxins such as LT, STa, or STb that alter the electrolytic equilibrium of the gut cells and provoke the excretion of water to intestinal lumen are also a common cause (Dubreuil et al., 2016). Other pathotypes such as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) or verotoxigenic *E. coli* (VTEC) can also be involved in PWD outbreaks (Ercoli et al., 2016; Lecce et al., 1982). In consonance, virulence factors such F4, F18, LT, STa, STb, VT1, VT2 or eae are targeted by diagnosis and vaccines. However, since they were first described, swine genetics, farm conditions and vaccines have greatly improved.

Up to date, a high number of studies have been done on the causative agents of PWD, but most of them focused mainly on diseased animals and on a single pathogen (Yang et al., 2019; Renzhammer et al., 2020). Thus, there is a lack of knowledge about the presence of different enteric pathogens in healthy animals from farms with recurrent problems of PWD.

On the other hand, intestinal dysbiosis has been associated with the occurrence of PWD (Gresse et al., 2017). Some studies have tried to better understand which microbiota composition predisposes to the development of disease and which can be considered protective. However, they have been performed in experimental conditions or only assessing individual farms (Karasova et al., 2021; Gryaznova et al., 2022).

In the present research, we have studied the prevalence of enteric pathogens involved in PWD, as well as the intestinal microbiota composition of weaned piglets with diarrhea and healthy penmates under field conditions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sampling

Samples from eighteen conventional pig farms (14 farms with active and recurrent PWD outbreaks and 4 farms with no records of PWD outbreaks in the last 12 months) were analysed between February 2020 and December 2021. A total of 277 fecal samples were collected from 3 to 5 weeks old piglets: 152 out of them were diarrheic animals and 125 were healthy penmates that were considered controls.

### 2.2. Microbiological diagnosis

Presence of *E. coli* and *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) was assessed in stool samples. Briefly, for *E. coli* isolation, stool samples were cultured on Columbia blood agar (BD GmBh, Germany) and MacConkey agar (Oxoid, UK) and were incubated aerobically for 24 hours at 37 °C. A pure culture was obtained for most of the samples, but, in those cases were two or more colony morphologies were found, the most abundant one was selected. The strains were confirmed as *E. coli* using conventional biochemical tests (oxidase, catalase, TSI, SIM, urease, citrate, and methyl red) and the API system (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France). For *C. difficile* detection, samples were cultured on a selective medium *C. difficile* agar base (Conda Laboratorios, Spain) and incubated anaerobically for 48 hours at 37 °C. All bacterial colonies collected were confirmed as *C. difficile* using a molecular diagnosis.

### 2.3. Molecular diagnosis of bacterial agents

DNA was extracted by boiling the growth from MacConkey agar and *C. difficile* selective plates. Briefly, all the bacterial growths were diluted in 600 µL of sterile distilled water, and 200 µL of the dilution was then transferred to a new tube. Two-hundred microliters of sterile distilled water was added to each tube. The tubes were boiled at 100 °C in a water bath for 10 min, and then centrifuged at 16,000 g for 5 min. After centrifugation, the supernatant was recovered and stored at -20 °C until processing.

Conventional PCR was performed, as previously reported by Vidal et al., (2019) to detect *E. coli* toxins (LT, STa, STb, VT1, VT2 and EAST1) and adhesins (F4, F18 and eae) and *C. difficile* toxins (TcdA and TcdB). Analysis of the amplified products was performed on 1.5 % agarose gel by electrophoresis.

### 2.4. Molecular diagnosis of viral agents

RNA was extracted from fecal samples using MagMAX™ CORE Nucleic Acid Extraction kit (ThermoFisher Scientific, USA) following the manufacturer's instructions. Detection of RVA, RVB, RVC and PEDV was done using the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR kit (Applied Biosystems, ThermoFisher, USA) following the protocol of RT-PCR described by Marthaler et al. (2014).

### 2.5. Microbiota analysis

Eleven farms with active PWD outbreaks were selected for the analysis of the microbiota. A total of 148 faecal samples, 102 from diarrheic and 46 from healthy piglets were selected. DNA was extracted with QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Briefly, for each sample, 250 mg of stool and 800 µL of buffer were homogenised with a TissueLyser. After following the manufacturer's instructions, DNA was eluted in 50 µL of the final solution buffer. DNA was quantified by Qubit DNA broad range fluorometer (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) and shipped frozen to the sequencing provider (Novogene, Cambridge, UK).

Amplicon library preparation and sequencing was performed by Novogene in a NovaSeq platform to generate 250 bp paired-end raw reads. The region targeted to perform the 16 S amplification was spanning the V3 and V4 region of 16 S rRNA gene.

Paired-end reads were assigned to samples based on their unique barcodes and truncated by cutting off the barcode and primer sequences. Paired-end reads were merged using FLASH (V1.2.7). Quality filtering on the raw tags were performed following Bokulich et al., (2013) approach, with the default parameter settings (Phred >=Q20) to obtain the high-quality clean tags, according to the Qiime (V1.7.0) quality-controlled process. The tags were compared to SILVA138 Database using UCHIME algorithm to detect chimera sequences, and then the chimera sequences were removed. Sequences analyses were performed by UPARSE software using all the effective tags. Sequences with ≥97 % similarity were assigned to the same Operation Taxonomic Units (OTU). For each representative sequence, Qiime in Mothur method was performed against the SSUrRNA database of SILVA138 Database for species annotation at each taxonomic rank (kingdom, phylum, class, order, family, genus, species).

Alpha-diversity was analyzed using Qiime2 studying four metrics: number of observed species, phylogenetic diversity index, Shannon and Simpson. Beta-diversity was studied with generalized UniFrac distances matrices to do Principal Components Analysis (PCoA) with Qiime2 and were displayed with WGCNA and ggplot2 packages. Statistical differences regarding taxonomy were calculated by method of permuted test and False Discovery Rate according Benjamini and Hochberg method.

## 2.6. Statistical analysis

Statistics were applied to detect differences in pathogens frequencies between groups using Chi-square Test and were visualised using R (version 4.2.1, (R Core Team, 2014)) with ggplot2 package. Odds ratio was calculated using R function glm().

## 3. Results

### 3.1. Prevalence of enteric pathogens

All farms were positive for RVB, 72 % for RVA and 55 % for RVC (Table 1). PEDV was only detected in one farm just in one animal (0.4 % of pigs).

The most frequent classical virulent factors detected for *E. coli* isolates at farm level were EAST1 (83 %), F4 (78 %), eae (72 %), STa (55 %) and STb (50 %). The prevalence in infected pigs was also remarkable for EAST1 (49 %), eae (29 %), F4 (25 %), STa (21.1 %) and STb (15 %). Other factors such as F18 (5.4 %), VT1 (7.5 %) and VT2 (8.6 %) had lower frequencies in pigs and were less distributed among farms (Supplementary Table 1). Toxigenic *C. difficile* was only found in one pig.

Comparing the prevalence of viral pathogens between healthy and diarrheic animals, RVA (OR=1.78,  $p=0.04$ ) and RVB (OR=2.41,  $p=0.02$ ) were the most prevalent, being present in more than half of diarrheic cases and statistically related with disease presentation in PWD outbreaks. The same relationship was found analysing the set of farms. Conversely, no statistical differences were found between groups for RVC (Fig. 1).

Regarding *E. coli* virulence factors in farms with active PWD outbreaks, F4 (OR=2.32,  $p=0.02$ ), STb (OR=4.81,  $p=0.04$ ) and VT2 (OR=2.62,  $p=0.05$ ) were associated with the presence of PWD. Moreover, despite being at a low prevalence, F18 and LT were only present in diarrheic animals sampled on farms with active PWD outbreaks. On the other hand, eae (OR= 0.33,  $p<0.001$ ) and EAST1 (OR= 0.53,  $p=0.02$ ) were found more frequently in healthy animals. However, when the overall group of farms were included in the analyses (Figs. 1B and 1D), only VT2 was found to be related with diarrhea (OR=3.25,  $p=0.03$ ) and frequencies of F18 and STa were higher in healthy animals. Thus, *E. coli* isolates with virulence factors were also present in healthy animals and farms without PWD problems.

The analysis of Ct values of rotavirus infections between healthy and diarrheic piglets showed that RVA viral load was higher in diarrheic pigs than in healthy penmates ( $p=0.002$ ), indicating its correlation with diarrhea (Supplementary Figure 1). However, no differences were found for RVB and RVC. Moreover, the Ct values were higher for RVB and RVC than for RVA, so their role in the presentation of PWD was not conclusive.

### 3.2. Microbiota composition in PWD and healthy penmates

A total of 148 faecal samples from 11 farms with active outbreaks of PWD were analysed: 102 samples from diarrheic pigs and 46 from

healthy penmates. A total of 11,264,394 reads were obtained, representing a mean of 76,111 reads per sample. The sample with the highest coverage had 96,056 reads and the lowest 58,509 reads.

Alpha-diversity metrics showed that the number of observed species was statistically higher in healthy animals ( $p=0.04$ ). However, considering more sophisticated indexes such as phylogenetic diversity, Shannon and Simpson, no alpha-diversity differences were found between diarrheic and healthy pigs (Supplementary Figure 2).

Moreover, Principal Coordinate Analysis (PCoA) clustering was used to elucidate differences between the microbiota of PWD and healthy animals. However, no clear cluster was found (Fig. 2a). De novo clustering following Rhea pipeline (Lagkouvardos et al., 2017) was performed and three clusters were encountered. The two biggest ones were formed by equally proportions of diarrheic and healthy samples and few conclusions could be extracted. The smallest one ( $n=12$ ) was mostly formed by diarrheic samples ( $n=10$ ), specially from animals weaned two weeks ago, but it was not exclusively. Additional metadata such diarrhea severity, vaccine status of the piglets, feeding behaviour or previous infections would be needed to shed light on the matter, but it was not available for this study.

Thus, further analyses were performed to find taxa abundance differences that were not affecting PCoA. Firstly, phyla abundance comparison between groups was performed (Fig. 2b), being Bacillota (previously Firmicutes, 48.7 % in healthy animals vs 44.6 % in diarrheic animals), Bacteroidota (29.6 % vs 28.4 %) and Pseudomonadota (previously Proteobacteria, 7.6 % vs 10.6 %) the most frequent phyla detected in both groups. In a second step, a t-test approach was used to compare taxa between groups considering significant differences those with a False Discovery Ratio lower than 0.1. At phylum level, Fusobacteriota was more represented in diarrheic animals whereas Oscillospirales and Ruminococcaceae were more abundant in healthy piglets (Fig. 2c).

### 3.3. Changes in the microbiota and enteric pathogens according to the age

Taxonomic relative abundance comparison between PWD and control animals was performed individually for each farm. However, a high heterogeneity of results was found at farm level, being very difficult to find a defined pattern (Supplementary Spreadsheet file). When samples were re-analysed according to the age of the animals presenting PWD (first or second week postweaning), significant differences were found between diarrheic and healthy pigs (Table 1). For animals presenting diarrhea the 1st week postweaning, *Euryarchaeota* and *Clostridia* class were found to be more abundant in healthy animals, being especially important families such Oscillospiraceae and Ruminococcaceae. Conversely, Pseudomonadota (especially Enterobacteriaceae) and Campylobacterota were enriched in pigs showing diarrhea during the first week postweaning.

Animals presenting diarrhea during the second week exhibited taxas *Spirochaetaceae* and *Clostridia vadin* BB60 group which were missing in healthy animals (Table 2).

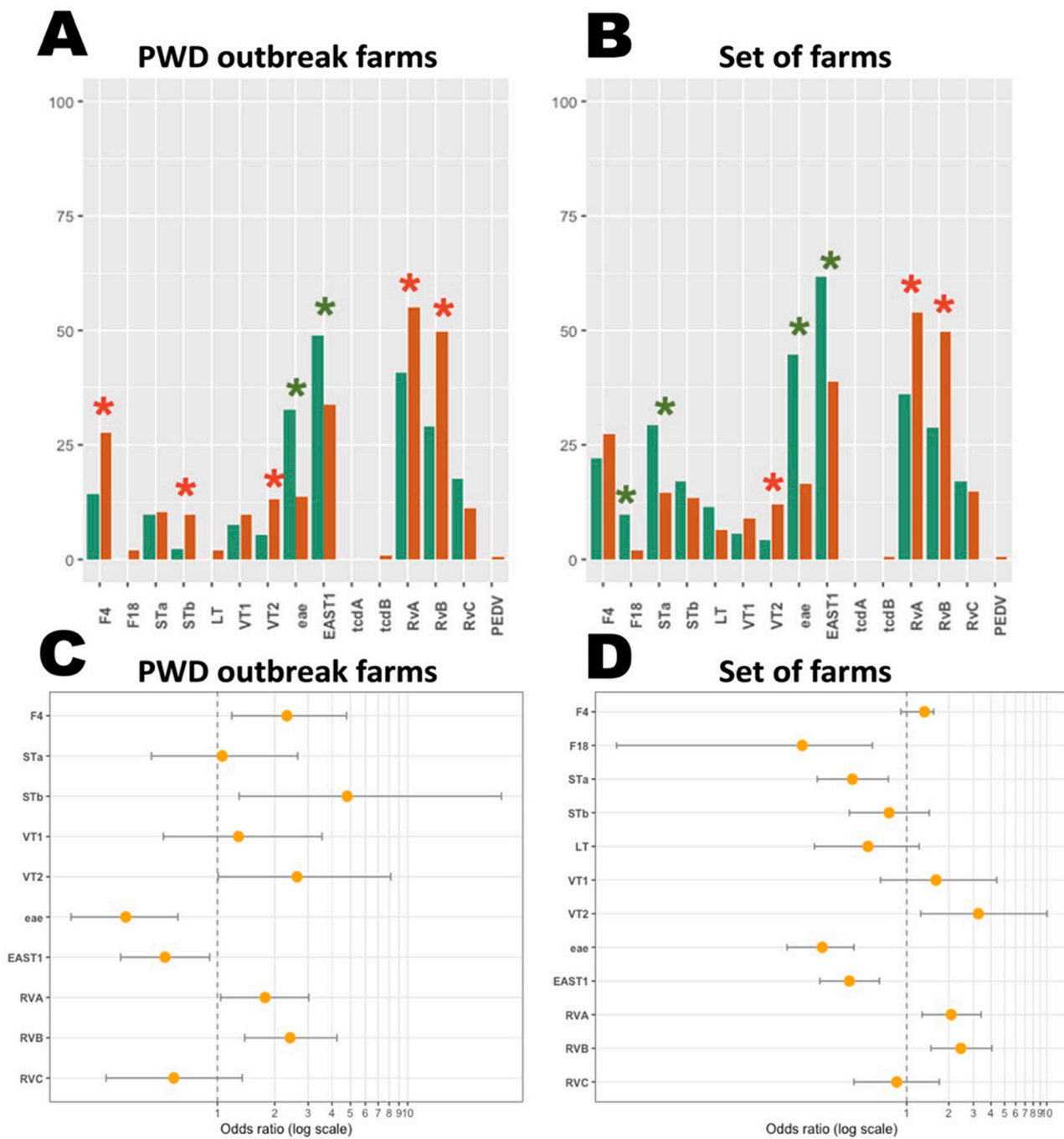
The frequency of enteric pathogens in animals presenting PWD also

**Table 1**

Significant differences in taxonomic abundance between healthy and diarrheic animals during the first week post-weaning. Taxa with  $FDR<0.1$  and a difference between groups of animals bigger than 1 %.

Taxonomy	Control	Difference (%)	FDR	PWD	Difference	FDR
Phylum	<i>Euryarchaeota</i>	3.4	0.1	<i>Campilobacterota</i>	2.8	0.09
	-	-	-	<i>Pseudomonadota</i>	4.8	0.07
Class	<i>Clostridia</i>	7.2	0.08	<i>Campylobacteria</i>	2.8	0.1
	-	-	-	<i>Gammaproteobacteria</i>	4.9	0.08
Order	<i>Oscillospirales</i>	4.8	0.02	-	-	-
Family	<i>Oscillospiraceae</i>	2.2	0.06	<i>Enterobacteriaceae</i>	4.5	0.06
	<i>Ruminococcaceae</i>	2.1	0.06	-	-	-
Genus	-	-	-	-	-	-
Species	-	-	-	-	-	-



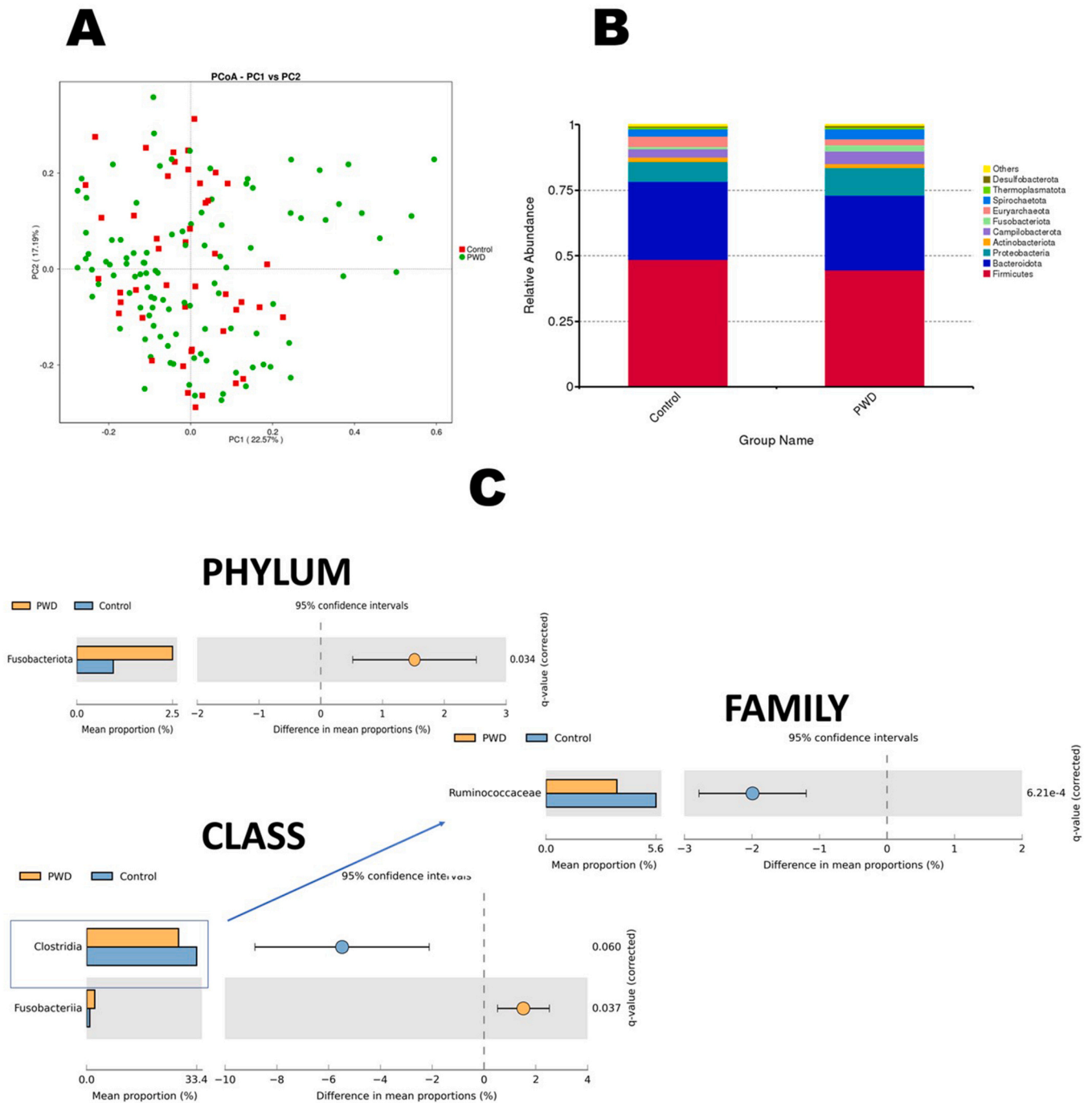


**Fig. 1.** : Prevalence of enteric pathogens in healthy and diarrheic animals. Red: diarrheic piglets. Green: healthy piglets. Asterisk: statistical significance (p-value < 0.05) A: Barplot comparing frequencies in farms with active PWD outbreaks (n=14). B: Barplot comparing frequencies in the set of farms (n=18). C: Odds ratio in farms with active PWD outbreaks. D: Odds ratio in all studied farms.

differed between ages (Supplementary Table 2). Regarding *E. coli* virulence factors, F18 (9.7 % at 1st week postweaning vs 0.9 % at 2nd week), VT1 (9.7 % vs 0.9 %), eae (35.2 % vs 18.3 %) and EAST1 (57.9 % vs 38.3 %) were more frequently found during the first week after weaning in healthy animals. Interestingly, prevalence of RVA was significantly higher the second week postweaning (64.2 %) compared to the first week (29.1 %). Moreover, although the RVA mean Ct values (Supplementary Table 3) were similar during first week in diarrheic (27.24) and healthy pigs (27.52), the second week postweaning, RVA viral load was significantly higher in diarrheic animals (Ct=24.34) compared to the healthy group (Ct=28.94), indicating that RVA is especially relevant the second week after weaning.

### 3.4. Microbiota associated with Rotavirus A infection

Considering the presence or absence of RVA in the sample, no significant differences were found between groups. However, considering the viral load, samples with high RVA viral load (Ct-value < 25) presented differences of bacterial abundance compared with lower or negative viral load (Table 3). Thus, *Sphaerochaeta* genus was associated with high viral load of RVA whereas *Bacillota* phylum and *Lactobacillus* genus were more abundant in samples with negative or low RVA load, 8.7 % and 5.2 % of abundance respectively.



**Fig. 2.** : Taxonomic abundance differences between groups. A: Principal Coordinate Analysis (PCoA). B: Phylum taxonomic relative abundance comparison between healthy and diarrhetic piglets. C: Statistically taxonomic relative abundance differences (FDR>0.1) between groups for phylum, class and family (no differences were observed for order, genus or species).

**4. Discussion**

This study contributes to a better understanding of the epidemiology of enteric pathogens involved in PWD. Frequency of pathogens was compared between diarrhetic and non-diarrhetic weaned pigs. Moreover, the intestinal microbiota associated with diarrhea was analysed. Up to date, most of studies focused on PWD associated microbiota are based on a low number of farms (Karasova et al., 2021; Ren et al., 2022). Herein, we present a study design considering the individual factors of each farm with many samples analysed, contributing to improve our understanding of intestinal microbiota changes under field conditions.

In general, RVA and RVB were detected in almost all farms and in half of samples, being the most frequent viral agents circulating in the farms. *E. coli* isolates, as expected, were also found in all farms with a variable combination of virulence factors. Specifically, F4, EAST1 and eae were the most frequent virulence factors and were ubiquitously found. Moreover, the microbiota composition was very heterogenous between farms and animals, showing the complexity of PWD.

RVA has been described as the causative agent of diarrhea in neonatal piglets in Spain and other regions in the world (Kongsted et al., 2018; Mesonero-Escuredo et al., 2018; Vidal et al., 2019). In the present study, RVA was also detected in faecal samples of diarrhetic weaned pigs,

**Table 2**

Significant differences in taxonomic abundance between healthy and diarrheic animals during the second week post-weaning. Taxa with FDR<0.1 and a difference between groups bigger than 1 %.

Taxonomy	Control	Difference (%)	FDR	PWD	Difference (%)	FDR
Phylum	-	-	-	<i>Spirochaetota</i>	2.8	0.04
Class	-	-	-	<i>Spirochaetia</i>	2.7	0.07
Order	-	-	-	<i>Spirochaetales</i>	2.8	0.08
Family	-	-	-	<i>Clostridiales vadin BB60 group</i>	2.5	>0.001
	-	-	-	<i>Spirochaetaceae</i>	2.7	0.09
	-	-	-	<i>Clostridiaceae vadin BB60 group</i>	2.3	0.01
Genus	-	-	-	<i>Clostridia vadin BB60 group</i>	2.5	0.02
Species	-	-	-	-	-	-

**Table 3**

Significant differences in taxonomic abundance between healthy and diarrheic animals according the RVA infection status. Taxa with FDR<0.1 and a difference between groups bigger than 1 %.

Taxonomy	Negative/Low load RVA	Difference (%)	FDR	High load RVA	Difference (%)	FDR
Phylum	<i>Bacillota</i>	8.7	0.006	<i>Spirochaetota</i>	3.3	0.02
Class	-	-	-	<i>Spirochaetia</i>	3.3	0.05
Order	<i>Lachnospirales</i>	2.9	0.02	<i>Spirochaetales</i>	3.3	0.02
Family	<i>Lachnospiraceae</i>	2.9	0.02	<i>Spirochaetaceae</i>	3.4	0.03
	<i>Ruminococcaceae</i>	1.4	<0.001	-	-	-
	<i>Lactobacillaceae</i>	5.3	0.06	-	-	-
Genus	<i>Lactobacillus</i>	5.2	0.06	<i>Sphaerochaeta</i>	3.2	0.01
Species	<i>Lactobacillus reuterii</i>	3.2	0.08	<i>Fusobacterium mortiferum</i>	3.1	0.04

as recently described (Eriksen et al., 2021). Moreover, RVA was present with higher prevalence and viral load in diseased animals than in healthy penmates, especially for piglets exhibiting diarrhea during the second week postweaning. Weaning is a stressful period for piglets that can lead to an impairment of the immune system during the first week of the transitions, increasing the risk to be infected by pathogens that are circulating in the farm. Whereas RVB was present in most of the farms and almost half of the animals, RVC was less frequent. This situation differs from other studies done in suckling piglets (Vidal et al., 2019), where RVC was more frequent while RVB was almost absent. These results indicate that rotavirus epidemiology is different between suckling and weaning pigs, as reported by Marthaler et al. (2014) where RVB was more prevalent in weaned animals. RVB has already been described as primary agent of diarrhea in both, neonatal piglets (Miyabe et al., 2020) and postweaned pigs (Marthaler et al., 2014; Molinari et al., 2016). However, our results evidence that there is a lack of knowledge about its presence in healthy animals, and our study is not conclusive about RVB role. Despite its higher prevalence in diarrhea cases, no significant differences were found in the viral load between healthy and diseased animals. Thus, further studies should be done to clarify RVB implication in PWD.

Other pathogens studied herein, such as PEDV and *C. difficile* were almost absent in the farms. In the case of PEDV, a decreasing trend has been observed, since 2014 when re-emerged causing severe problems to the swine industry. *C. difficile*, despite being commonly found in neonatal diarrhea (Vidal et al., 2019), its presence in PWD was residual. This finding agrees with Arruda et al. (2013), where a drop of prevalence with age is described.

*E. coli* has been historically considered the main cause of PWD leading to a high antibiotic use during the transition stage (Fairbrother et al., 2005). Virulence factors implicated in *E. coli* causing diarrhea have been described long ago and are still being targeted by vaccines and diagnostic purposes. However, farm conditions have changed during the last decades and bacterial pathogens have evolved. In this study, few differences were found between diarrheic and control animals. Thus, information about virulence factors should be updated. In this line, some genome wide association studies have identified new virulence genes in avian *E. coli* (Mageiros et al., 2021) or *Streptococcus suis* (Guo et al., 2021). Thus, similar approach should be explored in PWD caused by *E. coli* infections.

Regarding intestinal microbiota, although many differences were detected between distinct farms, some trends were observed. Fusobacteriota was found in higher prevalence in diarrheic animals and Ruminococcaceae family was more frequent in healthy animals. These findings agree with previous studies (Dou et al., 2017; Sun et al., 2019; Kong et al., 2022) reinforcing their contribution in the development of diarrhea.

Interestingly, the microbiota associated with health and disease varied with the age of the animals. During the first week postweaning, animals had a significant increase in *E. coli*. Moreover, at this age, Campylobacteria was associated with diseased piglets. Despite being described as a causative agent of diarrhea (Thompson et al., 2019), Campylobacteria have also been found in healthy piglets (Ruiz et al., 2016). The association with diarrhea in our study could be more related with the weaning stress (one of the main non-infectious contributors to PWD), as *Campylobacter* shedding is increased by stress (Whyte et al., 2001). During the second week postweaning, only Spirochaetaceae family and *Clostridium vadin BB60* group were more frequent in diarrheic animal. Since there are no previous reports in the literature about the role of these bacteria in the emergence of PWD, further studies are needed to confirm this association.

Microbiota changes have been associated to infections caused by other enteric porcine virus such as PEDV (Yang et al., 2020). However, these types of associations have not been studied for porcine RVA. Additionally, there is a lack of treatment for this pathogen, therefore studies on the microbiota associated to its infection could be useful to explore new alternatives to prevent PWD. It is especially remarkable the fact that Bacillota and *Lactobacillus* were less abundant in infected animals. Despite the lack of studies in pig production, *Lactobacillus* has been linked with beneficial effects such as alleviation of diarrhea in gnotobiotic pigs infected with human rotavirus (Liu et al., 2013), enhancement of mucosal B cell responses (Kandasamy et al., 2015) and an improvement of the vaccine efficacy (Parreno et al., 2022). For these reasons, *Lactobacillus* probiotics have been proposed as a treatment for acute rotavirus gastroenteritis in humans, showing promising results (Lee et al., 2015; Park et al., 2017). In consequence, *Lactobacillus* administrated as probiotics could be an option to explore to prevent or to reduce the incidence of diarrhea and reduce antimicrobial use. However, further studies are needed to really assess their efficacy in pig production, as probiotics are not always the best solution often are

washed out. Other alternative to study could be the use of prebiotics that increase the *Lactobacillus* concentration.

Although this study improves our understanding of PWD, there are some limitations that need to be considered. First, the farms enrolled for the study were those reporting recurrent cases of PWD, where field veterinarians needed assistance to confirm the diagnostics. Therefore, it is probable that previous batches of animals would have been treated with antimicrobials, resulting in under-detection of other bacterial aetiologies involved in the disease. Second, this is a cross-sectional study where sampling was conducted at one time point in each farm, without following up sampled animals. Thus, the disease evolution of healthy pen-mates could not be registered and therefore the implication of the presence of viral agents in the future development of diarrhea is unknown. However, this is not usually the case for PWD, which usually occurs during the first two weeks of the transition and at the same time-point for the whole batch. Finally, it needs to be stated that they existed better parameters than OTUs such Amplicon Sequence Variants (ASV) or zero radius OTUs (zOTUs). However, we were trying to get a comparison with the previous studies done in the field and we decided to use OTUs. Nonetheless, use of ASV or zOTUs should be implemented for the future studies done in the field.

## 5. Conclusion

RVA was the main pathogen involved in PWD, being especially relevant during the second week postweaning. Classic *E. coli* virulence factors were not exclusively related with diarrhetic cases. In consequence, virulence factors information should be updated. The microbiota associated to clinical cases of PWD was composed by Enterobacteriaceae and Campylobacteria during the first week postweaning, and Spirochaetaceae and *Clostridium vadin BB60* group in the second week after weaning. In contrast, *Ruminococcaceae* was more frequent in healthy animals with *Lactobacillus* being associated with a lower prevalence of RVA infections. These results can be useful to explore the use of *Lactobacillus* as alternative treatment to prevent PWD and reduce the antimicrobial use in conventional pig farms.

## CRedit authorship contribution statement

**Noemí Giler:** Methodology, Investigation. **Marga Martín:** Writing – review & editing, Supervision, Formal analysis, Conceptualization. **Laila Darwich:** Writing – review & editing, Supervision, Project administration, Funding acquisition, Formal analysis, Conceptualization. **Biel Garcias:** Writing – original draft, Methodology, Investigation, Formal analysis, Data curation, Conceptualization. **Lourdes Migura-Garcia:** Writing – review & editing, Project administration, Funding acquisition.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare to not have competing interests.

## Acknowledgements

This work was funded by the project RTI2018-095586-B-C22 from the Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO), and by the CERCA program from Generalitat de Catalunya, Biel Garcias is a PhD candidate supported by Departament de Recerca i Universitats de la Generalitat de Catalunya (FI-SDUR 2020). We sincerely thank all the field veterinarians who sent samples and made possible this study

## Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.vetmic.2024.110162](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2024.110162).

## References

- Arruda, P.H.E., Madson, D.M., Ramirez, A., Rowe, E., Lizer, J.T., Songer, J.G., 2013. Effect of age, dose and antibiotic therapy on the development of *Clostridium difficile* infection in neonatal piglets. *Anaerobe* 22. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.04.010>.
- Bokulich, N.A., Subramanian, S., Faith, J.J., Gevers, D., Gordon, J.I., Knight, R., Mills, D.A., Caporaso, J.G., 2013. Quality-filtering vastly improves diversity estimates from Illumina amplicon sequencing. *Nat. Methods* 10. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2276>.
- de Nova, P.J.G., Cortey, M., Díaz, I., Puente, H., Rubio, P., Martín, M., Carvajal, A., 2020. A retrospective study of porcine epidemic diarrhoea virus (PEDV) reveals the presence of swine enteric coronavirus (SeCoV) since 1993 and the recent introduction of a recombinant PEDV-SeCoV in Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* 67. <https://doi.org/10.1111/tbed.13666>.
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhali, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., Huërrou-Luron, I.L.E., Abdennebi-Najar, L., 2017. Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS One* 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169851>.
- Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E., Schifferli, D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal* 7. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>.
- Ercoli, L., Farneti, S., Zicavo, A., Mencaroni, G., Blasi, G., Striano, G., Scuota, S., 2016. Prevalence and characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from pigs and pork products in Umbria and Marche regions of Italy. *Int J. Food Microbiol* 232, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.05.002>.
- Eriksen, E.Ø., Kudirkiene, E., Christensen, A.E., Agerlin, M.V., Weber, N.R., Nødtvedt, A., Nielsen, J.P., Hartmann, K.T., Skade, L., Larsen, L.E., Pankoke, K., Olsen, J.E., Jensen, H.E., Pedersen, K.S., 2021. Post-weaning diarrhea in pigs weaned without medicinal zinc: risk factors, pathogen dynamics, and association to growth rate. *Porc. Health Manag* 7, 54. <https://doi.org/10.1186/s40813-021-00232-z>.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, E., Gyles, C.L., 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res Rev.* 6, 17–39. <https://doi.org/10.1079/ahr2005105>.
- Gresse, R., Chaucheyras-Durand, F., Fleury, M.A., van de Wiele, T., Forano, E., Blanquet-Diot, S., 2017. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol* 25, 851–873. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.05.004>.
- Gryaznova, M. V., Dvoretzkaya, Y.D., Syromyatnikov, M.Y., Shabunin, S. v, Parshin, P.A., Mikhaylov, E. v, Strelinikov, N.A., Popov, V.N., 2022. Changes in the Microbiome Profile in Different Parts of the Intestine in Piglets with Diarrhea. *Animals* 12. <https://doi.org/10.3390/ani12030320>.
- Guo, G., Kong, X., Du, D., Wei, D., Yu, Y., Zhang, W., 2021. Genome-wide association study identifies the virulence-associated marker in *Streptococcus suis* serotype 2. *Infect., Genet. Evol.* 92. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2021.104894>.
- Kandasamy, S., Chhattha, K.S., Vlasova, A.N., Rajashekara, G., Saif, L.J., 2015. Lactobacilli and Bifidobacteria enhance mucosal B cell responses and differentially modulate systemic antibody responses to an oral human rotavirus vaccine in a neonatal gnotobiotic pig disease model. *Gut Microbes* 5. <https://doi.org/10.4161/19490976.2014.969972>.
- Karasova, D., Crhanova, M., Babak, V., Jerabek, M., Brzobohaty, L., Matesova, Z., Rychlik, I., 2021. Development of piglet gut microbiota at the time of weaning influences development of postweaning diarrhea – A field study. *Res Vet. Sci.* 135, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.022>.
- Kong, Q., Zhang, W., An, M., Kulyar, M.F. e A., Shang, Z., Tan, Z., Xu, Y., Li, J., Liu, S., 2022. Characterization of Bacterial Microbiota Composition in Healthy and Diarrheal Early-Weaned Tibetan Piglets. *Front Vet. Sci.* 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.799862>.
- Kongsted, H., Pedersen, K., Hjulsgaard, C.K., Larsen, L.E., Pedersen, K.S., Jorsal, S.E., Bækbo, P., 2018. Diarrhoea in neonatal piglets: A case control study on microbiological findings. *Porc. Health Manag* 4. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0094-5>.
- Kyung-hyo, D., Jae-won, B., Wan-kyu, L., 2020. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from diarrhetic weaned piglets after the ban on antibiotic growth promoters in feed. *Antibiotics* 9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110755>.
- Lagkouvardos, I., Fischer, S., Kumar, N., Clavel, T., 2017. Rhea: A transparent and modular R pipeline for microbial profiling based on 16S rRNA gene amplicons. *PeerJ* 2017. <https://doi.org/10.7717/peerj.2836>.
- Lecce, J.G., Balsbaugh, R.K., Clare, D.A., King, M.W., 1982. Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weanling diarrhoea of pigs. *J. Clin. Microbiol* 16, 715–723.
- Lee, D.K., Park, J.E., Kim, M.J., Seo, J.G., Lee, J.H., Ha, N.J., 2015. Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus in vitro and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. *Clin. Res Hepatol. Gastroenterol.* 39. <https://doi.org/10.1016/j.clinre.2014.09.006>.
- Liu, F., Li, G., Wen, K., Wu, S., Zhang, Y., Bui, T., Yang, X., Kocher, J., Sun, J., Jortner, B., Yuan, L., 2013. *Lactobacillus rhamnosus* gg on rotavirus-induced injury of ileal epithelium in gnotobiotic pigs. *J. Pediatr Gastroenterol. Nutr.* 57. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3182a356e1>.
- Magieiros, L., Méric, G., Bayliss, S.C., Pensar, J., Pascoe, B., Mourkas, E., Calland, J.K., Yahara, K., Murray, S., Wilkinson, T.S., Williams, L.K., Hitchings, M.D., Porter, J., Kemmett, K., Feil, E.J., Jolley, K.A., Williams, N.J., Corander, J., Sheppard, S.K., 2021. Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. *Nat. Commun.* 12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20988-w>.
- Marthaler, D., Homwong, N., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijssens, J., Ciarlet, M., 2014. Rapid detection and high occurrence of porcine

- rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J. Virol. Methods* 209, 30–34. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2014.08.018>.
- Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C., Segalés, J., 2018. Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain. *Porc. Health Manag* 4, 5. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0083-8>.
- Miyabe, F.M., Dall Agnol, A.M., Leme, R.A., Oliveira, T.E.S., Headley, S.A., Fernandes, T., de Oliveira, A.G., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2020. Porcine rotavirus B as primary causative agent of diarrhea outbreaks in newborn piglets. *Sci. Rep.* 10 <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78797-y>.
- Molinari, B.L.D., Possatti, F., Lorenzetti, E., Alfieri, A.F., Alfieri, A.A., 2016. Unusual outbreak of post-weaning porcine diarrhea caused by single and mixed infections of rotavirus groups A, B, C, and H. *Vet. Microbiol* 193, 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.08.014>.
- Park, M.S., Kwon, B., Ku, S., Ji, G.E., 2017. The efficacy of *Bifidobacterium longum* BORI and *Lactobacillus acidophilus* AD031 probiotic treatment in infants with rotavirus infection. *Nutrients* 9. <https://doi.org/10.3390/nu9080887>.
- Parreno, V., Bai, M., Liu, F., Jing, J., Olney, E., Li, G., Wen, K., Yang, X., Castellucc, T.B., Kocher, J.F., Zhou, X., Yuan, L., 2022. Probiotic as adjuvant significantly improves protection of the Lanzhou trivalent rotavirus vaccine against heterologous challenge in a gnotobiotic pig model of human rotavirus infection and disease. *Vaccines* 10. <https://doi.org/10.3390/vaccines10091529>.
- R Core Team, 2014. R Core Team (2014). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Ren, W., Yu, B., Yu, J., Zheng, P., Huang, Z., Luo, J., Mao, X., He, J., Yan, H., Wu, J., Chen, D., Luo, Y., 2022. Lower abundance of *Bacteroides* and metabolic dysfunction are highly associated with the post-weaning diarrhea in piglets. *Sci. China Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s11427-021-2068-6>.
- Renzhammer, R., Loncaric, I., Roch, F.F., Piniór, B., Käsbohrer, A., Spersger, J., Ladinig, A., Unterweger, C., 2020. Prevalence of virulence genes and antimicrobial resistances in *e. Coli* associated with neonatal diarrhea, postweaning diarrhea, and edema disease in pigs from Austria. *Antibiotics* 9. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040208>.
- Rhouma, M., Fairbrother, J.M., Beaudry, F., Letellier, A., 2017. Post weaning diarrhea in pigs: Risk factors and non-colistin-based control strategies. *Acta Vet. Scand.* <https://doi.org/10.1186/s13028-017-0299-7>.
- Ruiz, V.L.A., Bersano, J.G., Carvalho, A.F., Catroxo, M.H.B., Chiebao, D.P., Gregori, F., Miyashiro, S., Nassar, A.F.C., Oliveira, T.M.F.S., Ogata, R.A., Scarcelli, E.P., Toniatti, P.O., 2016. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. *Veterinary Research. BMC Res Notes* 9, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13104-015-1751-2>.
- Sun, J., Du, L., Li, X.L., Zhong, H., Ding, Y., Liu, Z., Ge, L., 2019. Identification of the core bacteria in rectums of diarrheic and non-diarrheic piglets. *Sci. Rep.* 9 <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55328-y>.
- Vidal, A., Martín-Valls, G.E., Tello, M., Mateu, E., Martín, M., Darwich, L., 2019. Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain. *Vet. Microbiol* 237, 108419. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108419>.
- Vlasova, A.N., Amimo, J.O., Saif, L.J., 2017. Porcine rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses* 9, 1–27. <https://doi.org/10.3390/v9030048>.
- Whyte, P., Collins, J.D., McGill, K., Monahan, C., O'Mahony, H., 2001. The effect of transportation stress on excretion rates of campylobacters in market-age broilers. *Poult. Sci.* 80 <https://doi.org/10.1093/ps/80.6.817>.
- Yang, G.Y., Guo, L., Su, J.H., Zhu, Y.H., Jiao, L.G., Wang, J.F., 2019. Frequency of diarrheagenic virulence genes and characteristics in *Escherichia coli* isolates from pigs with diarrhea in china. *Microorganisms* 7, 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7090308>.
- Yang, S., Li, Y., Wang, B., Yang, N., Huang, X., Chen, Q., Geng, S., Zhou, Y., Shi, H., Wang, L., Brugman, S., Savelkoul, H., Liu, G., 2020. Acute porcine epidemic diarrhea virus infection reshapes the intestinal microbiota. *Virology* 548. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.07.001>.



**Estudi 2: Characterization of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli  
Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia**

*Animals* 2024, 14(3), 487; <https://doi.org/10.3390/ani14030487>



## Article

# Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia

Biel Garcias, Marga Martin <sup>\*</sup>  and Laila Darwich <sup>\*</sup> 

Department Sanitat i Anatomia Animals, Veterinary School, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Valles, Spain; biel.garcias@uab.cat

\* Correspondence: marga.martin@uab.cat (M.M.); laila.darwich@uab.cat (L.D.)

**Simple Summary:** Postweaning diarrhea (PWD) is a significant concern in the swine industry, causing substantial economic losses due to decreased growth rates, increased mortality, and the extensive use of antimicrobials. Certain *Escherichia coli* (*E. coli*) pathovars are frequently implicated in PWD cases among piglets. Regular surveillance and testing of *E. coli* susceptibility to different antimicrobials is essential. This helps veterinarians and farmers select appropriate treatments, avoid unnecessary antibiotic use, and prevent the further spread of antimicrobial resistance (AMR). Herein, we tested the susceptibility to fourteen antimicrobials of 251 *E. coli* strains isolated from fecal samples of diarrheic (n = 148) and apparently healthy piglets (n = 103) in farms in Catalonia. The results of this study showed that 41.4% of the *E. coli* were multidrug-resistant (MDR) strains, presenting high resistance to conventional veterinary antimicrobials such as erythromycin, amoxicillin, streptomycin, tetracycline, lincospectin, sulfamethoxazole/trimethoprim, and florfenicol. A special concern was also observed for human last-resort antimicrobials, like quinolones and colistin. Moreover, pigs suffering from diarrhea had a higher frequency of infection with MDR strains than the healthy ones. To reduce the incidence and impact of PWD in pig herds, optimization of antimicrobial therapies had to be implemented with other strategies, such as good hygiene practices, optimizing nutrition, managing stress levels, and employing proper vaccination protocols.



**Citation:** Garcias, B.; Martin, M.; Darwich, L. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia. *Animals* **2024**, *14*, 487. <https://doi.org/10.3390/ani14030487>

Academic Editors: Susan Sanchez and Olli A.T. Peltoniemi

Received: 16 December 2023

Revised: 11 January 2024

Accepted: 30 January 2024

Published: 1 February 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** Postweaning diarrhea (PWD) is a multifactorial concern in the swine industry that leads to high antibiotic consumption, usually without testing susceptibility, increasing the risk of the selection of *Escherichia coli*-resistant strains. In this study, 251 *E. coli* strains isolated from fecal samples of diarrheic (n = 148) and apparently healthy piglets (n = 103) in farms in Catalonia were tested against their susceptibility to fourteen different antimicrobials. The phenotypic antimicrobial resistance (AMR) testing revealed high levels of AMR, with 41.4% of the isolates presenting a multidrug-resistant (MDR) profile. More specifically, resistance to class D (prudence) antimicrobials such as erythromycin (99.6%), amoxicillin (95.2%), streptomycin (91.6%), tetracycline (88.8%), lincospectin (64.5%), and sulfamethoxazole/trimethoprim (60%) was very high, as well as to class C (caution) antimicrobials such as florfenicol (45%). A special concern was observed for antimicrobial category B (restrict), like quinolones and colistin, that both presented a high rate of resistance. Colistin use was substantially reduced in Spain, but resistance is still present in weaned pigs, presenting a MIC<sub>90</sub> of 4 µg/mL. This suggests that reducing antibiotic use is not enough to eliminate this AMR. Finally, it was found that piglets suffering diarrhea were more commonly carriers of MDR strains than the healthy ones (49.3% vs. 35%, *p* = 0.031). Therefore, given the high rates of resistance to the most commonly used antimicrobials, especially in diseased pigs, a new non-antibiotic-based approach should be implemented for the management of PWD.

**Keywords:** *Escherichia coli*; antimicrobial resistance; postweaning diarrhea



## 1. Introduction

In natural conditions, piglets are weaned in a gradual way at 12 weeks of life [1]. However, intensive productive conditions in the swine industry are quite different since animals are early-weaned at 3–4 weeks, when their intestines and immune system have not matured yet. This circumstance represents a stressful situation for the young animals, which leads them to anorexia that can last for even 48 h, with associated intestinal inflammation [2]. Moreover, stress generates an immunosuppressive state, which makes pigs susceptible to infectious agents [3]. Finally, the sudden change from a liquid to a solid diet leads to changes in the microbiota composition and diversity, which, although not fully understood, make piglets more susceptible to PWD [4].

Adding more complexity to the problem, postweaning diarrhea (PWD) has a multifactorial etiology. *Escherichia coli* (*E. coli*) is the main bacteria implicated in the process, with different virulence factors implicated, such as fimbriae F4 and F18, thermostable (STa, STb) and thermolabile (LT) toxins, verotoxins (VT1 and VT2), or the gene that encodes for intimin *eae* [5]. However, previous research on the role of *E. coli* as a main pathogen in the development of diarrhea reported nonconclusive results [6]. Viral infections are also commonly related to intestinal disorders, especially those caused by Rotavirus A, B, and C [7], as well as coronaviruses such as the porcine epidemic diarrhea virus or transmissible gastroenteritis virus. All these viruses have been identified as primary enteric pathogens [6,8,9]. On the other hand, non-infectious causes like nutrition, bad husbandry practices, or any stressful situation could lead to the development of PWD [10]. Furthermore, various factors can co-exist simultaneously, making PWD a complex and multifactorial concern. In consequence, identifying a precise cause or origin can pose significant challenges. Nevertheless, young animals find themselves in a particularly vulnerable state, prompting the implementation of antimicrobial treatments, even in cases where a bacterial cause has not been definitively confirmed as the etiological agent.

As already expected by Alexander Fleming, antimicrobial use over the years has led to the apparition of antimicrobial resistance (AMR) bacteria. This has been specifically proven in swine production [11,12], and principally, it has been shown that AMR levels were significantly high at the weaning phase [13]. Reduced effectiveness of antimicrobial agents may lead to higher mortality rates from bacterial infections, posing a threat to animal well-being and causing significant economic losses. Moreover, AMR has become an important cause of death in humans [14]. But, although an epidemiological link has been found [15], livestock contribution to human AMR remains unclear since this relationship seems not to be present at the genomic level [16,17]. However, transmission of AMR genes via plasmids from livestock to humans has been proven [18], and it has been shown that people in close contact with farms have a higher risk of certain AMR bacteria, such as methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* [19,20], and those bacteria are carriers of more AMR genes [21]. Therefore, AMR bacteria in livestock should be considered a public health threat, especially for farm and slaughterhouse workers.

The European Medicines Agency (EMA) categorizes antimicrobials used in veterinary medicine into different categories based on their importance, intended use, and impact on antimicrobial resistance [22]. These categories are designed to guide veterinarians and stakeholders in the responsible use of these medications, determining which antimicrobials veterinarians can use as first-line treatments and those that should be avoided or restricted. Category A (avoid) includes antimicrobials that are deemed critically important for human medicine and are not authorized for veterinary use (i.e., carbapenems). Category B (restrict) includes antimicrobials considered important for human medicine and should be used in animals with great caution and only when no suitable alternatives are available and when they are based on antimicrobial susceptibility testing (i.e., 3rd and 4th generation cephalosporins, quinolones, and polymyxins). In categories C (caution) or D (prudence), antimicrobials like the 1st generation of cephalosporins, aminoglycosides, chloramphenicol, penicillin/ $\beta$ -lactam inhibitors, tetracyclines, and trimethoprim/sulfonamides are included. These antimicrobials are considered acceptable and authorized for veterinary use as initial

treatments for bacterial infections. It is important to follow these guidelines to prevent antibiotic resistance and ensure the responsible use of antimicrobials in veterinary medicine.

The study of AMR in livestock is indeed crucial. Techniques like whole-genome sequencing (WGS) of bacterial genomes and metagenomics play a significant role in identifying and understanding AMR determinants and transmission routes in various bacterial populations [23,24]. However, despite these advanced techniques, there are instances, as in the case of porcine *E. coli*, where phenotypical susceptibility analyses remain essential. This is especially important in PWD, where animals often require prompt antibiotic treatment before the availability of bacteriological diagnosis and antibiotic susceptibility test results. Therefore, field studies are crucial in creating adequate guidelines to help veterinary practitioners use antimicrobials in ways that prioritize animal health while minimizing the risk of antimicrobial resistance development.

In the present study, *E. coli* strains isolated from farms experiencing PWD in Catalonia, an area known for high pig production, were analyzed to understand the antibiotic susceptibility patterns. Moreover, this study aimed to investigate whether there are distinct antimicrobial susceptibility phenotype patterns in *E. coli* strains associated with PWD in diarrheic piglets compared to those found in healthy animals within the same environment.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Bacterial Identification

*E. coli* strains were isolated from 17 pig farms (14 farms with active and recurrent PWD outbreaks and 3 farms with sporadic PWD outbreaks in the last 12 months) between February 2020 and December 2021. All the studied farms were distributed in Catalonia (NE of Spain), the Spanish region with the greatest number of intensive production farms and one of the highest pig-density regions in Europe. A total of 251 fecal samples were collected from 3- to 5-week-old piglets; 148 out of them were diarrheic animals, and 103 were healthy pen mates that were considered healthy controls.

One gram of fresh stool samples was obtained directly from the animals using sterile rectal swabs. Swab samples were transported on Amies transport medium (Deltalab, Rubí, Spain) and submitted for diagnostic testing to the Veterinary Infectious Diseases Diagnostic Laboratory of the Autonomous University of Barcelona (UAB) (Bellaterra, Spain). All samples were cultured in Columbia blood agar (BD GmBh, Heidelberg, Germany) and MacConkey agar (Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated for 24 h at 37 °C. Suspected colonies were identified using conventional biochemical tests (oxidase, catalase, TSI, SIM, urease, citrate, and methyl red) or Api System® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

### 2.2. Antimicrobial Susceptibility Testing

A Kirby–Bauer disk diffusion susceptibility test protocol [25] was used to determine the phenotypic antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates. Briefly, colonies were suspended in 5 mL of distilled, sterile water to achieve a turbidity of 0.5 on the McFarland scale. The dilution was then seeded onto Mueller–Hinton (Oxoid, UK) plates. Each isolate was tested for the following antimicrobial groups using commercial disks (Oxoid, UK): aminopenicillins (amoxicillin 25 µg and amoxicillin/clavulanic acid 20 µg/10 µg); cephalosporins (ceftiofur 30 µg, cephalexin 30 µg); carbapenems (imipenem 10 µg); quinolones (enrofloxacin 5 µg); aminoglycosides (gentamicin 10 µg, streptomycin 10 µg); macrolides (erythromycin 15 µg) tetracyclines (tetracycline 30 µg); sulfonamides (sulfamethoxazole/trimethoprim 23.75 µg/1.25 µg); florfenicol (30 µg); and lincospectin (2 µg).

Additionally, a minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed to evaluate antimicrobial susceptibility to colistin using the broth microdilution method in 96-well plates [26]. *E. coli* ATCC 25922 was used as the quality control strain. Briefly, the tested colistin concentrations ranged from 0.25 to 8 µg/mL. The studied strains were considered resistant when their MIC value was higher than the wild-type cut-off value, which was at MIC > 2 µg/mL [27]. MIC50 and MIC90 were considered the median and percentile 90 of the population, respectively.

The susceptibility of bacteria to each antimicrobial agent was interpreted as susceptible (S), intermediate (I), and resistant (R) based on the breakpoints provided by the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) and the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). CLSI veterinary breakpoints were preferably used [28], and when not available, CLSI human [29], EUCAST, or CASFM veterinary breakpoints were applied as previously published by Vidal et al. [30]. In addition, multidrug resistance (MDR) was defined as resistance to at least one agent in  $\geq 3$  antimicrobial categories according to the Magiorakos et al. classification [31].

### 2.3. Statistical Analysis

Chi-squared or Fisher exact tests were used for comparison between proportions when appropriate. These statistical tests, employed to scrutinize differences in proportions, were complemented with visualizations created using R (version 4.2.1) [32] with the ggplot2 package [33]. The threshold for establishing statistical significance was set at a  $p$ -value of less than 0.05.

## 3. Results

### 3.1. Antimicrobial Susceptibility Testing

Antibiotic susceptibility testing was performed on 251 *E. coli* isolates: 148 were from PWD-diseased pigs and 103 were from healthy pen mates. In general, levels of AMR were high, presenting 104 out of 251 isolates (41.4%) with a multidrug resistance (MDR) profile.

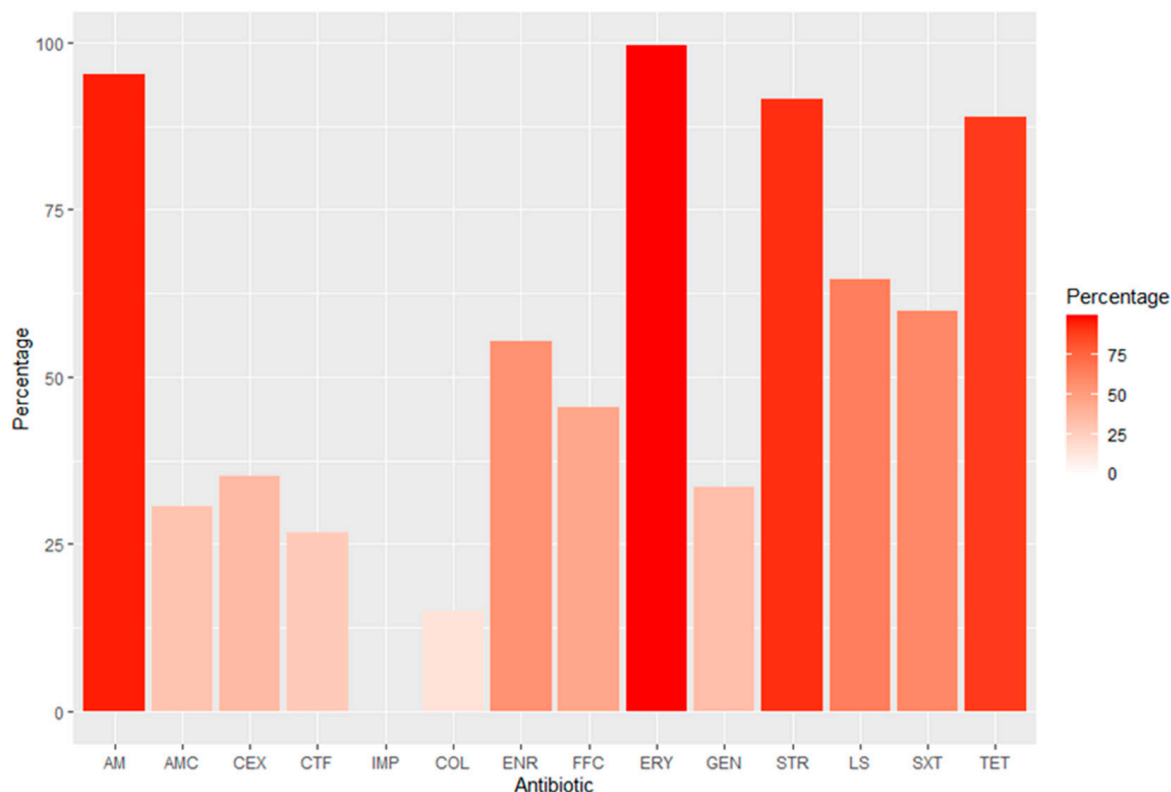
Most of the *E. coli* strains presented high levels of resistance to antimicrobials commonly used in veterinary medicine. Results are presented in Table 1.

**Table 1.** Comparison of resistance frequency between apparently healthy and diarrheic piglets for each antibiotic.

Class	Antimicrobial	% Resistant		
		Apparently Healthy	Diarrheic	Total
Penicillin	Amoxicillin	93.3	91.4	92.1
Penicillin + betalactamase inhibitor	Amoxicillin + clavulanic acid	29.1	31.8	31.7
1st generation cephalosporin	Cephalexin	15.9	47.8	35.1
3rd generation cephalosporin	Ceftiofur	22.2	32.6	27.7
Carbapenem	Imipenem	0.0	0.0	0.0
Polymyxins	Colistin	11.5	17.7	15.0
Quinolones	Enrofloxacin	55.5	57.5	56.7
Phenicols	Florfenicol	46.6	44.6	45.4
Macrolide	Erythromycin	99.0	100.0	99.6
Aminoglycoside	Gentamycin	34.0	33.1	33.5
Aminoglycoside	Streptomycin	93.2	90.5	91.6
Aminoglycoside	Lincospectin	59.7	66.2	63.1
Trimethoprim + sulfamide	Trimethoprim + sulphamethoxazole	56.5	60.2	58.7
Tetracycline	Tetracycline	90.3	87.9	88.8

For class D antimicrobials, AMR was broadly observed to affect erythromycin (99.6%), amoxicillin (95.2%), streptomycin (91.6%), tetracycline (88.8%), lincospectin (64.5%), and sulfamethoxazole/trimethoprim (60%). For class C antimicrobials, it is interesting to note that more than 45% of the isolates showed resistance to florfenicol (Figure 1). However, of particular concern were the resistance levels within class B antimicrobials, with over half of the isolates demonstrating resistance to quinolones, particularly against enrofloxacin (56.7%). In contrast, AMR was demonstrated to be relatively lower for certain antimicrobials, such as cephalexin with 35.1% of resistance, gentamycin with 33.5%, and amoxicillin clavulanic acid with 30.7%. Additionally, the observed levels of AMR against other class B antimicrobials like colistin were notably low at 15%, and ceftiofur exhibited a resistance rate

of 26.7%. Furthermore, no instances of resistance were detected for class A carbapenems, underlining their efficacy within this bacterial population (Figure 1).



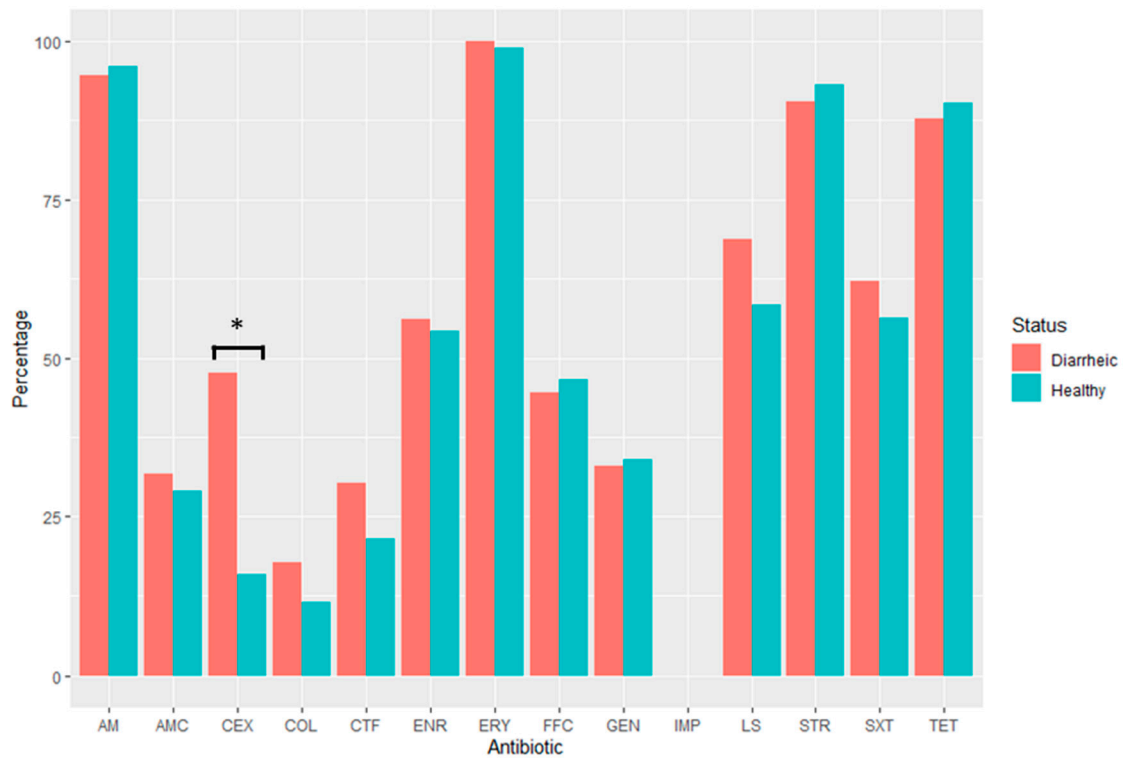
**Figure 1.** Percentage of antimicrobial resistance in *E. coli* isolates (n = 251). AM: Amoxicillin; AMC: Amoxicillin + Clavulanic Acid; CEX: Cephalexin; CTF: Ceftiofur; IMP: Imipenem; COL: Colistin; ENR: Enrofloxacin; FFC: Florfenicol; ERY: Erythromycin; GEN: Gentamycin; STR: Streptomycin; LS: Lincospectin; SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim; TET: Tetracycline.

### 3.2. Comparison between Diarrheic Pigs and Healthy Pen Mates

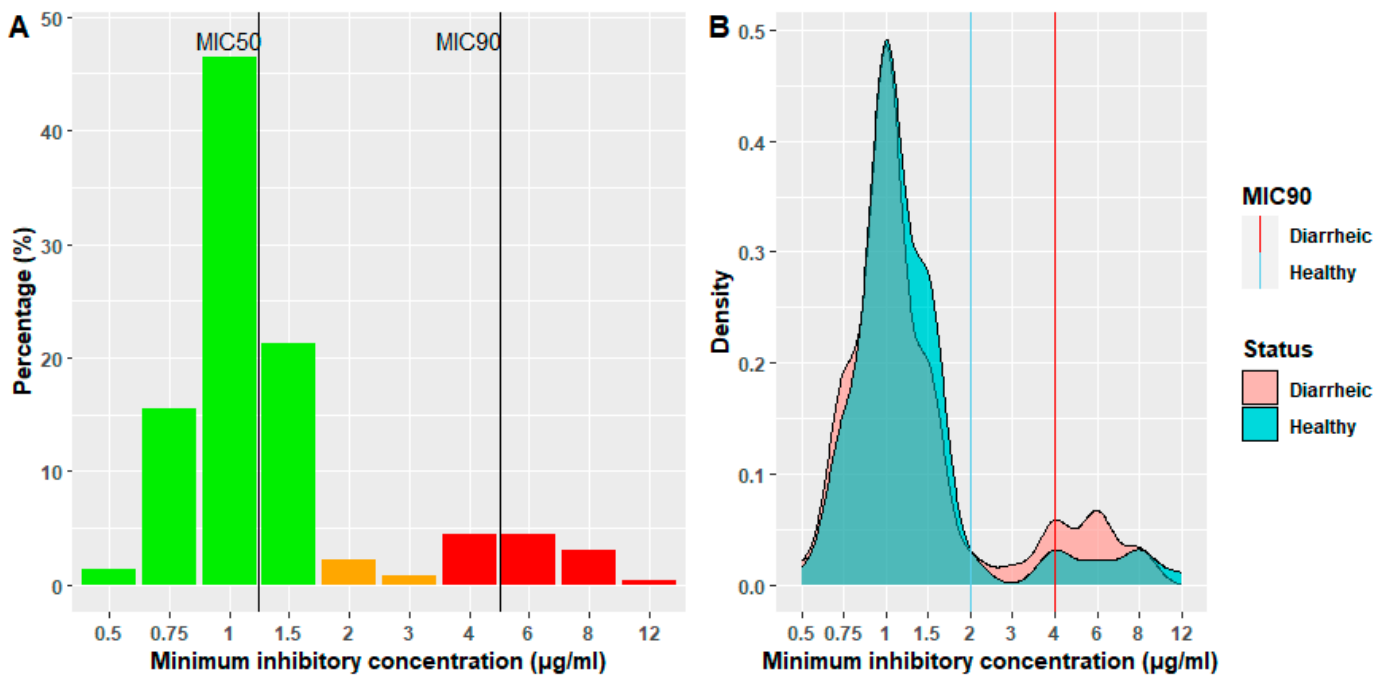
The comparison analyses between isolates from diseased and healthy pigs showed that diarrheic animals were carriers of a higher percentage of MDR bacteria compared to apparently healthy piglets (49.3% vs. 35%,  $p = 0.031$ ). Specific differences for each antibiotic and animal group are shown in Figure 2.

In general, AMR was quite similar between both groups, with the exception of some antimicrobials such as cephalexin, ceftiofur, lincospectin, and colistin, whose resistance levels seemed more prevalent in diarrheic pigs. However, statistical differences were only observed for the cephalexin, where diarrheic animals had higher frequencies of resistance than the healthy ones (47.7% vs. 15.9%,  $p = 0.003$ ).

Finally, given its importance in human medicine and the implementation of reduction use programs [34], colistin results from the qualitative MIC method were considered for the analysis to understand its epidemiology, as the disk diffusion method has been described as not reliable when testing polymyxin E (colistin) susceptibility. The MIC results showed that most of the isolates were susceptible to colistin (84.5%). A particular focus was put on MIC50 and MIC90 to provide a better understanding of colistin activity (Figure 3A). Thus, MIC50 was established at 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which means that the median of *E. coli* isolates was sensible to colistin. However, MIC90 was 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , which, according to EUCAST, is considered a resistance profile.



**Figure 2.** Comparison of antibiotic resistance levels between diarrheic (n = 148) and apparently healthy (n = 103) animals. AM: Amoxicillin; AMC: Amoxicillin + Clavulanic Acid; CEX: Cephalexin; CTF: Cef-tiofur; IMP: Imipenem; COL: Colistin; ENR: Enrofloxacin; FFC: Florfenicol; ERY: Erythromycin; GEN: Gentamycin; STR: Streptomycin; LS: Lincospectin; SXT: sulfamethoxazole/trimethoprim; TET: Tetracycline. Red: diarrheic animals; blue: healthy animals. \*  $p < 0.05$ .



**Figure 3.** (A): Histogram showing the colistin minimum inhibitory concentration. Green: susceptible. Orange: intermediate. Red: resistant. The vertical lines represent percentiles 50 and 90 of minimum inhibitory concentration. (B): Density plot of MIC distribution comparing healthy and diarrheic animals. Red line: MIC90 of diarrheic piglets. Blue line: MIC90 of healthy piglets.

Indeed, comparing diarrheic versus healthy animals, it was observed in the density plot (Figure 3B) that diarrheic animals were carriers of more resistant *E. coli* strains than their healthy pen mates. Despite the MIC<sub>50</sub> being equal for both groups (1 µg/mL), the MIC<sub>90</sub> was significantly different, with diarrheic animals presenting a higher concentration (4 µg/mL) than control healthy pigs (2 µg/mL) ( $p < 0.05$ ).

#### 4. Discussion

The goal of this study was to characterize the antimicrobial susceptibility pattern of 251 *E. coli* strains obtained from weaned pigs originating from farms experiencing postweaning diarrhea (PWD) and to compare the AMR patterns between pigs suffering from diarrhea and their apparently healthy pen mates.

Despite weaning being a hotspot of antimicrobial consumption, projects analyzing AMR in *E. coli* strains are usually not focused exclusively on this phase but also include other productive stages [35–39]. This is not criticizable at all, but given the peculiarity of weaning, a stop needs to be put there. A study from Korea [13] found high levels of AMR, very similar to those found in this study, but differed from another conducted in Australia between 1999 and 2005 [40], where levels were quite lower, showing that the extrapolation of results is not advisable in all cases.

The most remarkable findings were that 41.4% of the isolates presented an MDR profile, showing elevated resistance not only to antibiotics typically used in veterinary medicine (classified as D and C categories) but also to critical human last-resort antibiotics such as quinolones and colistin. Moreover, this high prevalence of MDR isolates, coupled with a higher MIC<sub>90</sub> for colistin, was notably more prevalent among pigs suffering from diarrhea compared to their healthy pen mates. This discrepancy highlights a concerning correlation between disease status and the prevalence of multidrug-resistant strains, especially with higher resistance to critical antibiotics in diarrheic pigs. This would mean that the therapeutic options to treat PWD are limited. This reality should make swine practitioners aware of the need to ask for antibiotic susceptibility tests before starting antimicrobial treatments. Likewise, since weaning is the swine production phase with the highest antibiotic consumption [41], it should be convenient to overcome the antibiotic mental mark and start to fight PWD with alternatives aiming at reducing the stress derived from weaning [3], focusing on animal welfare, optimizing nutrition [42], enhancing preventive measures via cleaning and disinfection [43], employing proper vaccination protocols [44], probiotic complements [45], or other alternatives such as bacteriophages [46]. Moreover, since other pathogens, such as rotaviruses or coronaviruses, have been proven to play a role in the presentation of the PWD disease [47,48], the control of concomitant infectious diseases should be strongly emphasized along with the previously mentioned measures of biosecurity and immunological prophylaxis.

As mentioned above, the levels of resistance of *E. coli* isolates to class D antimicrobials (those recommended to use as first choice) were high in this study. Especially remarkable was the resistance to tetracycline (88.8%), which is the most used antibiotic in pig production in Spain [49]. The overuse of tetracycline could explain this high level of resistance and should make veterinarians rethink its use to deal with PWD, given its lack of efficacy. Other class D antimicrobials, such as amoxicillin (95.2%) or streptomycin (91.6%), were practically ineffective for treating these *E. coli* PWD-related strains. This finding is not surprising since *bla*<sub>EC</sub> and *bla*<sub>TEM-1B</sub> (which confer resistance to amoxicillin) and *strA* and *strB* (which make isolates resistant to streptomycin) were the most common AMR genes found in porcine *E. coli* strains [50,51].

The isolates in this study also showed relatively high resistance to class C antimicrobials. It was expected for macrolides, such as erythromycin, because the *mdf(A)* gene, which confers resistance to macrolides, is fixed on the *E. coli* chromosome [52]. However, the levels of resistance to florfenicol (45%) are worrying since it is the only phenicol licensed for the treatment of bacterial infections in food-producing animals. In contrast, other options in this category, such as amoxicillin clavulanic acid (30.7%), cephalexin (35.1%),

or gentamicin (33.5%), could be better options because the levels of AMR are below 40%. However, the resistance rates are not negligible, and, again, we need to consider different options to preserve their effectiveness.

In the situation within category B, particularly concerning were the quinolones, where over half of the isolates (56.7%) exhibited resistance to enrofloxacin. This high level of resistance to quinolones raises significant concerns due to the importance of these antimicrobials in veterinary medicine. A recently published metanalysis [53] revealed Spain to have the highest recorded resistance rates, ranging between 9% and 14%. These numbers, although significant, were notably lower compared to the resistance rates uncovered in our study. This discrepancy highlights the heightened levels of resistance observed in our specific research context, underscoring the urgency for further investigation and strategic measures to address and manage antimicrobial resistance in this setting.

Resistance to other class B antimicrobials, such as third-generation cephalosporins (26.7%) and colistin (15%), was present. The dynamics of human–livestock transmission have been explored, revealing two different paradigms. In the case of ESBL bacteria (those that are resistant to third-generation cephalosporins), differences between lower- and middle-income countries (LMICs) and developed countries have been detected. While in LMICs, the bacterial interchange between human and livestock isolates is common [47], in developed countries, the transmission of these bacteria between pig farm environments and the general human population is less frequent [16,17]. However, the scenario shifts when considering colistin. The emergence of *mcr-1* in humans was notably associated with livestock, particularly swine, and aquaculture [54]. For this reason, we decided to analyze thoroughly the colistin resistance levels and calculate the minimum inhibitory concentration (MIC), revealing a concerning MIC<sub>90</sub> of 4 µg/mL, with some isolates demonstrating even higher MIC values of 12 µg/mL. Despite the implementation of the REDUCE program, which significantly curbed colistin usage in Spain [55], our observations revealed that colistin resistance had not been eradicated. This fact could agree with Ogunlana et al. [56], who found that certain mutations in the promotor region of the *mcr-1* gene could reduce its fitness cost, showing that antibiotic reduction could not be enough by itself to eliminate this specific resistance. Thus, the persistence of colistin resistance poses a challenge, indicating that despite efforts to reduce its use, resistance to this critical antibiotic remains an ongoing concern.

Finally, none of the tested *E. coli* isolates in this study displayed AMR to carbapenems, a class A antibiotic. This situation was expected because carbapenems are not used in swine production. However, despite their non-use in this context, reports of both phenotypical [57] and genotypical [58,59] resistance to these compounds in other regions worldwide require ongoing surveillance. Maintaining vigilant monitoring is crucial to track any potential emergence or spread of carbapenem resistance, despite their absence from swine production practices, and to proactively address any future challenges related to these critically important antimicrobials.

Overall, the levels of AMR were high in both pig groups, diseased and apparently healthy, suggesting that years of exposure to high antimicrobial pressure in pig farms might have contributed to this scenario. However, in our analysis of the comparison between levels of resistance among diarrheic and healthy animals, the ratio of multidrug-resistant (MDR) strains was notably higher in diseased piglets compared to their apparently healthy pen-mates. Specifically, significant differences were observed concerning cephalixin resistance, mirroring trends observed in human studies [60]. In the specific case of swine, cephalixin is commercialized via injectable solution, which ensures that only animals showing clinical symptoms are treated. In a related study focused on neonatal diarrhea within the same area [30], *E. coli* strains isolated from diarrheic animals also exhibited significantly higher resistance levels. However, the specific antimicrobials displaying resistance differed (such as quinolones and gentamicin) from our findings. Once again, these antimicrobials were predominantly available as injectable solutions. This parallel suggests a potential association warranting further investigation. However, the evidence linking the mode of

antibiotic availability and resistance is not definitive and demands in-depth scrutiny for conclusive insights.

The analysis of the minimum inhibitory concentration for colistin revealed a higher MIC<sub>90</sub> in diarrheic animals, and it is possible that this situation could be the same for other antimicrobials. It is important to note that when antimicrobials are administered through water or feed, sick animals typically reduce their consumption. Consequently, this reduction might result in lower antibiotic concentrations, leading to treatment failure as the MIC required for efficacy is not reached. This situation raises significant concerns as it suggests that the strains causing health issues might be more resilient to treatment, posing challenges to effectively addressing diseases. This discovery necessitates a comprehensive investigation, since, to our current knowledge, differences between healthy and diseased pigs during the weaning phase have not been extensively explored. Understanding these nuances in antibiotic administration and their correlation with resistance among healthy and diseased animals is pivotal for designing effective treatment strategies in pig farming contexts.

Despite this study providing a better understanding of AMR at the weaning phase, it also presents some limitations. First, this study was based on the samples submitted for diagnosis, and no representative sampling was performed, so the results are not fully extrapolated to all the territories. Second, despite the phenotype being what matters clinically, to characterize the public health risk, it is important to know the genotype, and it would be important to use other techniques such as WGS to identify the AMR responsible for the lack of effectiveness of the antibiotics. Finally, regarding the comparison between apparently healthy and diarrheic piglets, it is important to note that this condition was from a specific moment and could have changed a posteriori, but no longitudinal study was performed, so apparently healthy animals could have become diseased in the following days.

This study revealed a concerning prevalence of AMR in *E. coli* isolates, particularly in pigs suffering from diarrhea. This emphasizes that conventional antimicrobial therapy might not be as effective, highlighting the necessity of exploring alternative strategies. Implementing comprehensive measures such as stringent hygiene practices, optimizing nutritional regimens, managing stress levels, and deploying appropriate vaccination protocols becomes imperative in addressing this issue. This holistic approach aims to mitigate the reliance on antimicrobials alone, fostering a multi-faceted strategy to combat bacterial infections and AMR in pig populations.

## 5. Conclusions

This study identified high levels of AMR in PWD *E. coli* strains, with 41.4% notably being classified as multidrug-resistant strains. Moreover, it was evident that diarrheic animals harbored a greater prevalence of resistant *E. coli* strains compared to their healthy pen mates. Antimicrobials categorized under classes D and C displayed diminished effectiveness, indicating that relying solely on antibiotic treatment for PWD is inadequate. Additionally, resistance to other class B antimicrobials, such as third-generation cephalosporins and colistin, was observed, emphasizing that efforts solely focused on reducing antibiotic use may not suffice. The findings underscore the urgent need to explore new strategies and alternatives to effectively mitigate antimicrobial resistance.

**Author Contributions:** Conceptualization, B.G., M.M. and L.D.; methodology, B.G., M.M. and L.D.; formal analysis, B.G.; investigation, B.G.; resources, M.M. and L.D.; data curation, B.G.; writing—original draft preparation, B.G.; writing—review and editing, M.M. and L.D.; supervision, M.M. and L.D.; project administration, L.D.; funding acquisition, L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** BG was supported by the Departament de Recerca i Universitats de la Generalitat de Catalunya (FI-SDUR 2020). This study was funded by the I+D+I National Program RTI2018-095586-B-C22 for the



project ‘Optimization of diagnosis and treatment of post-weaning diarrhea in pigs: towards a rational use of antibiotics’.

**Institutional Review Board Statement:** The samples were provided by field veterinarians, who took them for diagnostic purposes and did not cause any harm or suffering to any animals.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data will be made available upon reasonable request to the corresponding author.

**Acknowledgments:** We kindly acknowledge all the field veterinarians that sent samples to our laboratory for diagnosis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

1. Moeser, A.J.; Pohl, C.S.; Rajput, M. Weaning Stress and Gastrointestinal Barrier Development: Implications for Lifelong Gut Health in Pigs. *Anim. Nutr.* **2017**, *3*, 313–321. [[CrossRef](#)]
2. Thomson, J.R.; Friendship, R.M. Digestive System. In *Diseases of Swine*; Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W., Zhang, J., Eds.; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 2019; pp. 234–263.
3. Moeser, A.J.; Klok, C.V.; Ryan, K.A.; Wooten, J.G.; Little, D.; Cook, V.L.; Blikslager, A.T. Stress Signaling Pathways Activated by Weaning Mediate Intestinal Dysfunction in the Pig. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2007**, *292*, 173–181. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Gresse, R.; Chaucheyras-Durand, F.; Fleury, M.A.; Van de Wiele, T.; Forano, E.; Blanquet-Diot, S. Gut Microbiota Dysbiosis in Postweaning Piglets: Understanding the Keys to Health. *Trends Microbiol.* **2017**, *25*, 851–873. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Dubreuil, J.D.; Isaacson, R.E.; Schifferli, D.M. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus* **2016**, *7*, 10–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Vidal, A.; Martín-Valls, G.E.; Tello, M.; Mateu, E.; Martín, M.; Darwich, L. Prevalence of Enteric Pathogens in Diarrheic and Non-Diarrheic Samples from Pig Farms with Neonatal Diarrhea in the North East of Spain. *Vet. Microbiol.* **2019**, *237*, 108419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Molinari, B.L.D.; Possatti, F.; Lorenzetti, E.; Alfieri, A.F.; Alfieri, A.A. Unusual Outbreak of Post-Weaning Porcine Diarrhea Caused by Single and Mixed Infections of Rotavirus Groups A, B, C, and H. *Vet. Microbiol.* **2016**, *193*, 125–132. [[CrossRef](#)]
8. Antas, M.; Woźniakowski, G. Current Status of Porcine Epidemic Diarrhoea (PED) in European Pigs. *J. Vet. Res.* **2019**, *63*, 465–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Valkó, A.; Bálint, Á.; Bozsa, Á.; Cságola, A. Prevalence of Antibodies against Transmissible Gastroenteritis Virus (TGEV) in Hungary. *Vet. Anim. Sci.* **2019**, *7*, 100042. [[CrossRef](#)]
10. Rhouma, M.; Fairbrother, J.M.; Beaudry, F.; Letellier, A. Post Weaning Diarrhea in Pigs: Risk Factors and Non-Colistin-Based Control Strategies. *Acta Vet. Scand.* **2017**, *59*, 31. [[CrossRef](#)]
11. Cameron-Veas, K.; Solà-Ginés, M.; Moreno, M.A.; Fraile, L.; Migura-Garcia, L. Impact of the Use of  $\beta$ -Lactam Antimicrobials on the Emergence of *Escherichia coli* Isolates Resistant to Cephalosporins under Standard Pig-Rearing Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **2015**, *81*, 1782–1787. [[CrossRef](#)]
12. Miguela-Villoldo, P.; Hernández, M.; Moreno, M.A.; Rodríguez-Lázaro, D.; Quesada, A.; Domínguez, L.; Ugarte-Ruiz, M. National Colistin Sales versus Colistin Resistance in Spanish Pig Production. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *123*, 141–143. [[CrossRef](#)]
13. Kyung-hyo, D.; Jae-won, B.; Wan-kyu, L. Antimicrobial Resistance Profiles of *Escherichia coli* from Diarrheic Weaned Piglets after the Ban on Antibiotic Growth Promoters in Feed. *Antibiotics* **2020**, *9*, 755. [[CrossRef](#)]
14. Ikuta, K.S.; Swetschinski, L.R.; Robles Aguilar, G.; Sharara, F.; Mestrovic, T.; Gray, A.P.; Davis Weaver, N.; Wool, E.E.; Han, C.; Gershberg Hayoon, A.; et al. Global Mortality Associated with 33 Bacterial Pathogens in 2019: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* **2022**, *400*, 2221–2248. [[CrossRef](#)]
15. Allel, K.; Day, L.; Hamilton, A.; Lin, L.; Furuya-Kanamori, L.; Moore, C.E.; Van Boeckel, T.; Laxminarayan, R.; Jakob, L. Global Antimicrobial-Resistance Drivers: An Ecological Country-Level Study at the Human–Animal Interface. *Lancet Planet. Health* **2023**, *7*, e291–e303. [[CrossRef](#)]
16. Ludden, C.; Raven, K.E.; Jamrozny, D.; Gouliouris, T.; Blane, B.; Coll, F.; de Goffau, M.; Naydenova, P.; Horner, C.; Hernandez-Garcia, J.; et al. One Health Genomic Surveillance of *Escherichia coli* Demonstrates Distinct Lineages and Mobile Genetic Elements in Isolates from Humans versus Livestock. *mBio* **2019**, *10*, 10–128. [[CrossRef](#)]
17. Thorpe, H.A.; Booton, R.; Kallonen, T.; Gibbon, M.J.; Couto, N.; Passet, V.; López-Fernández, S.; Rodrigues, C.; Matthews, L.; Mitchell, S.; et al. A Large-Scale Genomic Snapshot of *Klebsiella* Spp. Isolates in Northern Italy Reveals Limited Transmission between Clinical and Non-Clinical Settings. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7*, 2054–2067. [[CrossRef](#)]
18. Viñes, J.; Cuscó, A.; Napp, S.; Alvarez, J.; Saez-Llorente, J.L.; Rosàs-Rodoreda, M.; Francino, O.; Migura-Garcia, L. Transmission of Similar Mcr-1 Carrying Plasmids among Different *Escherichia coli* Lineages Isolated from Livestock and the Farmer. *Antibiotics* **2021**, *10*, 313. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

19. Dorado-García, A.; Bos, M.E.H.; Graveland, H.; Van Cleef, B.A.G.L.; Verstappen, K.M.; Kluytmans, J.A.J.W.; Wagenaar, J.A.; Heederik, D.J.J. Risk Factors for Persistence of Livestock-Associated MRSA and Environmental Exposure in Veal Calf Farmers and Their Family Members: An Observational Longitudinal Study. *BMJ Open* **2013**, *3*, e003272. [[CrossRef](#)]
20. Reynaga, E.; Torres, C.; Garcia-Nuñez, M.; Navarro, M.; Vilamala, A.; Puigoriol, E.; Enrico Lucchetti, G.; Nunes, D.; Silva, A.; Sabrià, M. Prevalence of MRSA ST398 Carriage in Nursing Home Residents in an Area of Spain with a High Density of Pig Farming. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **2018**, *39*, 90–93. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Van Gompel, L.; Luiken, R.E.C.; Sarrazin, S.; Munk, P.; Knudsen, B.E.; Hansen, R.B.; Bossers, A.; Aarestrup, F.M.; Dewulf, J.; Wagenaar, J.A.; et al. The Antimicrobial Resistome in Relation to Antimicrobial Use and Biosecurity in Pig Farming, a Metagenome-Wide Association Study in Nine European Countries. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 865–876. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. European Medicine Agency. *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*; European Medicine Agency: London, UK, 2016.
23. García, V.; Gambino, M.; Pedersen, K.; Haugegaard, S.; Olsen, J.E.; Herrero-Fresno, A. F4- and F18-Positive Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Diarrhea of Postweaning Pigs: Genomic Characterization. *Appl. Environ. Microbiol.* **2020**, *86*, e01913-20. [[CrossRef](#)]
24. Munk, P.; Knudsen, B.E.; Lukjancenko, O.; Duarte, A.S.R.; Van Gompel, L.; Luiken, R.E.C.; Smit, L.A.M.; Schmitt, H.; Garcia, A.D.; Hansen, R.B.; et al. Abundance and Diversity of the Faecal Resistome in Slaughter Pigs and Broilers in Nine European Countries. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 898–908. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *Am. J. Clin. Pathol.* **1966**, *45*, 493–496. [[CrossRef](#)]
26. EUCAST MIC and Zone Diameter Distributions and ECOFFs. Available online: [https://www.eucast.org/mic\\_and\\_zone\\_distributions\\_and\\_ecoffs](https://www.eucast.org/mic_and_zone_distributions_and_ecoffs) (accessed on 29 January 2024).
27. CASFM Comité de l’Antibiogramme de La Société Française de Microbiologie Recommendations 2020. *Com. L’Antibiogramme Société Française Microbiol.* **2020**, *86*. Available online: [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020\\_Avril2020\\_V1.1.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2020/04/CASFM2020_Avril2020_V1.1.pdf) (accessed on 29 January 2024).
28. CLSI. *Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals*, 4th ed.; CLSI Supplement VET08; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2018.
29. Abmm, D.; Tamma, D.; Kirn, J.; Cullen, S.K. *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 30th ed.; CLSI supplement M100; Clinical and Laboratory Standards Institute: Wayne, PA, USA, 2020.
30. Vidal, A.; Aguirre, L.; Seminati, C.; Tello, M.; Redondo, N.; Martín, M.; Darwich, L. Antimicrobial Resistance Profiles and Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Neonatal Diarrhea in Spanish Pig Farms. *Vet. Sci.* **2020**, *7*, 48. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [[CrossRef](#)]
32. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020.
33. Wickham, H. ggplot2. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2011**, *3*, 180–185. [[CrossRef](#)]
34. Jansen, W.; van Hout, J.; Wiegel, J.; Iatridou, D.; Chantziaras, I.; De Briyne, N. Colistin Use in European Livestock: Veterinary Field Data on Trends and Perspectives for Further Reduction. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 650. [[CrossRef](#)]
35. Renzhammer, R.; Loncaric, I.; Roch, F.-F.; Pinior, B.; Käsbohrer, A.; Spargser, J.; Ladinig, A.; Unterweger, C. Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistances in *E. coli* Associated with Neonatal Diarrhea, Postweaning Diarrhea, and Edema Disease in Pigs from Austria. *Antibiotics* **2020**, *9*, 208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Aguirre, L.; Vidal, A.; Seminati, C.; Tello, M.; Redondo, N.; Darwich, L.; Martín, M. Antimicrobial Resistance Profile and Prevalence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL), AmpC Beta-Lactamases and Colistin Resistance (Mcr) Genes in *Escherichia coli* from Swine between 1999 and 2018. *Porcine Health Manag.* **2020**, *6*, 4–9. [[CrossRef](#)]
37. Peng, Z.; Hu, Z.; Li, Z.; Zhang, X.; Jia, C.; Li, T.; Dai, M.; Tan, C.; Xu, Z.; Wu, B.; et al. Antimicrobial Resistance and Population Genomics of Multidrug-Resistant *Escherichia coli* in Pig Farms in Mainland China. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 1116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Jiang, F.; Wu, Z.; Zheng, Y.; Frana, T.S.; Sahin, O.; Zhang, Q.; Li, G. Genotypes and Antimicrobial Susceptibility Profiles of Hemolytic *Escherichia coli* from Diarrheic Piglets. *Foodborne Pathog. Dis.* **2019**, *16*, 94–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Yun, J.; Muurinen, J.; Nykäsenoja, S.; Seppä-Lassila, L.; Sali, V.; Suomi, J.; Tuominen, P.; Joutsen, S.; Hämäläinen, M.; Olkkola, S.; et al. Antimicrobial Use, Biosecurity, Herd Characteristics, and Antimicrobial Resistance in Indicator *Escherichia coli* in Ten Finnish Pig Farms. *Prev. Vet. Med.* **2021**, *193*, 105408. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Smith, M.G.; Jordan, D.; Chapman, T.A.; Chin, J.J.C.; Barton, M.D.; Do, T.N.; Fahy, V.A.; Fairbrother, J.M.; Trott, D.J. Antimicrobial Resistance and Virulence Gene Profiles in Multi-Drug Resistant Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolated from Pigs with Post-Weaning Diarrhoea. *Vet. Microbiol.* **2010**, *145*, 299–307. [[CrossRef](#)]
41. Dewulf, J.; Joosten, P.; Chantziaras, I.; Bernaerdt, E.; Vanderhaeghen, W.; Postma, M.; Maes, D. Antibiotic Use in European Pig Production: Less Is More. *Antibiotics* **2022**, *11*, 1493. [[CrossRef](#)]

42. Gao, J.; Yin, J.; Xu, K.; Li, T.; Yin, Y. What Is the Impact of Diet on Nutritional Diarrhea Associated with Gut Microbiota in Weaning Piglets: A System Review. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*, 6916189. [[CrossRef](#)]
43. Dorado-García, A.; Graveland, H.; Bos, M.E.H.; Verstappen, K.M.; Van Cleef, B.A.G.L.; Kluytmans, J.A.J.W.; Wagenaar, J.A.; Heederik, D.J.J. Effects of Reducing Antimicrobial Use and Applying a Cleaning and Disinfection Program in Veal Calf Farming: Experiences from an Intervention Study to Control Livestock-Associated MRSA. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0139536. [[CrossRef](#)]
44. Correa, F.; Luise, D.; Amatucci, L.; Palumbo, F.; Viridis, S.; Negrini, C.; Clavenzani, P.; Vecchi, M.; Mazzoni, M.; Bosi, P.; et al. Effect of an *Escherichia coli* F4/F18 Bivalent Oral Live Vaccine on Gut Health and Performance of Healthy Weaned Pigs. *Animal* **2022**, *16*, 654. [[CrossRef](#)]
45. Luise, D.; Bertocchi, M.; Motta, V.; Salvarani, C.; Bosi, P.; Luppi, A.; Fanelli, F.; Mazzoni, M.; Archetti, I.; Maiorano, G.; et al. Bacillus Sp. Probiotic Supplementation Diminish the *Escherichia coli* F4ac Infection in Susceptible Weaned Pigs by Influencing the Intestinal Immune Response, Intestinal Microbiota and Blood Metabolomics. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* **2019**, *10*, 74. [[CrossRef](#)]
46. Lee, C.Y.; Kim, S.J.; Park, B.C.; Han, J.H. Effects of Dietary Supplementation of Bacteriophages against Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 on Clinical Symptoms of Post-Weaning Pigs Challenged with the ETEC Pathogen. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **2017**, *101*, 88–95. [[CrossRef](#)]
47. Lecce, J.G.; Balsbaugh, R.K.; Clare, D.A.; King, M.W. Rotavirus and Hemolytic Enteropathogenic *Escherichia coli* in Weanling Diarrhea of Pigs. *J. Clin. Microbiol.* **1982**, *16*, 715–723. [[CrossRef](#)]
48. Vlasova, A.N.; Wang, Q.; Jung, K.; Langel, S.N.; Malik, Y.S.; Saif, L.J. Porcine Coronaviruses. In *Emerging and Transboundary Animal Viruses*; Springer: Singapore, 2020; pp. 79–110; ISBN 978-981-15-0401-3.
49. Mulchandani, R.; Wang, Y.; Gilbert, M.; Van Boeckel, T.P. Global Trends in Antimicrobial Use in Food-Producing Animals: 2020 to 2030. *PLoS Glob. Public Health* **2023**, *3*, e0001305. [[CrossRef](#)]
50. Byarugaba, D.K.; Wokorach, G.; Alafi, S.; Erima, B.; Najjuka, F.; Mworozzi, E.A.; Kibuuka, H.; Wabwire-Mangen, F. Whole Genome Sequencing Reveals High Genetic Diversity, Diverse Repertoire of Virulence-Associated Genes and Limited Antibiotic Resistance Genes among Commensal *Escherichia coli* from Food Animals in Uganda. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1868. [[CrossRef](#)]
51. Zingali, T.; Reid, C.J.; Chapman, T.A.; Gaio, D.; Liu, M.; Darling, A.E.; Djordjevic, S.P. Whole Genome Sequencing Analysis of Porcine Faecal Commensal *Escherichia coli* Carrying Class 1 Integrons from Sows and Their Offspring. *Microorganisms* **2020**, *8*, 843. [[CrossRef](#)]
52. Edgar, R.; Bibi, E. MdfA, an *Escherichia coli* Multidrug Resistance Protein with an Extraordinarily Broad Spectrum of Drug Recognition. *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 2274–2280. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Hayer, S.S.; Casanova-Higes, A.; Paladino, E.; Elnekave, E.; Nault, A.; Johnson, T.; Bender, J.; Perez, A.; Alvarez, J. Global Distribution of Fluoroquinolone and Colistin Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 834793. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Shen, Y.; Zhou, H.; Xu, J.; Wang, Y.; Zhang, Q.; Walsh, T.R.; Shao, B.; Wu, C.; Hu, Y.; Yang, L.; et al. Anthropogenic and Environmental Factors Associated with High Incidence of Mcr-1 Carriage in Humans across China. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 1054–1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. ESVAC. *Spain—Sales and Trends (Mg/PCU) of Antibiotic VMPs for Food-Producing Animals*; European Medicine Agency: London, UK, 2023.
56. Ogunlana, L.; Kaur, D.; Shaw, L.P.; Jangir, P.; Walsh, T.; Uphoff, S.; MacLean, R.C. Regulatory Fine-Tuning of Mcr-1 Increases Bacterial Fitness and Stabilises Antibiotic Resistance in Agricultural Settings. *ISME J.* **2023**, *17*, 2058–2069. [[CrossRef](#)]
57. Tsekouras, N.; Athanasakopoulou, Z.; Diezel, C.; Kostoulas, P.; Braun, S.D.; Sofia, M.; Monecke, S.; Ehrlich, R.; Chatzopoulos, D.C.; Gary, D.; et al. Cross-Sectional Survey of Antibiotic Resistance in Extended Spectrum B-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Isolated from Pigs in Greece. *Animals* **2022**, *12*, 1560. [[CrossRef](#)]
58. Diaconu, E.L.; Carfora, V.; Alba, P.; Di Matteo, P.; Stravino, F.; Buccella, C.; Dell’Aira, E.; Onorati, R.; Sorbara, L.; Battisti, A.; et al. Novel IncFII Plasmid Harboring Bla<sub>NDM-4</sub> in a Carbapenem-Resistant *Escherichia coli* of Pig Origin, Italy. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3475–3479. [[CrossRef](#)]
59. Nirupama, K.R.; Vinodh, V.K.; Pruthivishree, B.S.; Sinha, D.K.; Murugan, M.S.; Krishnaswamy, N.; Singh, B.R. Molecular Characterisation of Bla<sub>OXA-48</sub> Carbapenemase-, Extended-Spectrum β-Lactamase- and Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolated from Farm Piglets in India. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2018**, *13*, 201–205. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Garcia, P.G.; Silva, V.L.; Diniz, C.G. Occurrence and Antimicrobial Drug Susceptibility Patterns of Commensal and Diarrheagenic *Escherichia coli* in Fecal Microbiota from Children with and without Acute Diarrhea. *J. Microbiol.* **2011**, *49*, 46–52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**Estudi 3: Characterisation of Antibiotic Determinants and Heavy Metal Resistance Genes in Escherichia coli from Pigs in Catalonia**

Aquest article es troba en procés de revisió a la revista *Microbial genomics*.

Aquest treball disposa de material suplementari que pot ser descarregat, juntament amb els ensemblatges d'E. coli generats a l'estudi, al següent enllaç

([https://figshare.com/articles/online\\_resource/112\\_E\\_coli\\_from\\_porcine\\_stools\\_from\\_Catalonia/24541513](https://figshare.com/articles/online_resource/112_E_coli_from_porcine_stools_from_Catalonia/24541513))

## Abstract

More antibiotics are administered to livestock animals than to treat human infections. Industrialisation, large animal densities and early weaning mean pigs are exposed to more antibiotics than any other livestock animal. Consequently, antimicrobial resistance (AMR) is common among commensal and pathogenic bacteria. Heavy metals (HM) are also often used as feed additives for growth promotion and infection prevention alongside antimicrobials, and increased exposure to copper, zinc and cadmium can further encourage AMR through co-selection. In this study, we sequenced an archived collection of 112 *Escherichia coli* isolates from pigs in Catalonia using short- and long-read sequencing methods to detect AMR and HM tolerance genes. The most common AMR genes were *mdfA* (84.8%), *aph(3'')-Ib* (52.7%), *bla<sub>TEM-1B</sub>* (45.6%) and *aph(6)-Id* (45.6%). Genes relevant to public health, such as the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) (15.4%), *bla<sub>CTX-M</sub>*-type or *bla<sub>SHV</sub>*, or mobile colistin resistance (*mcr*) genes (13.4%), such as *mcr-1*, were also found. HM tolerance genes were present in almost every genome, but in most cases, AMR and HM tolerance genes were not located on plasmids. Of the genes predicted to increase tolerance to HMs, only those with activity to mercury were co-located on plasmids alongside other AMR determinants. However, mercury is rarely used in pig farming and does not support a scenario where AMR and HM genes are co-selected. Finally, we identified the exclusive association between *mcr-4* and ColE10 plasmid, which may help target interventions to curtail its spread among pig *E. coli*.

## Data summary

Assembled genomes and supplementary material are available from FigShare (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.24541513.v2>). Short and long raw reads were deposited in GenBank database in NCBI (National Center for Biotechnology Information) under the bioproject PRJNA1040819.

## Impact statement

The global use of antimicrobials and heavy metals in farmed livestock as feed additives to promote growth and prevent infections has contributed to the spread of resistance among commensal and pathogenic bacteria of these animals. We investigated antimicrobial resistance (AMR) and heavy metal (HM) tolerance in 112 *Escherichia coli* isolates from pigs in Catalonia using short- and long-read sequencing techniques to identify AMR and HM tolerance genes. While HM tolerance genes were widespread, they rarely co-located with AMR genes on the same genetic elements. AMR genes were mainly found in plasmids, while HM tolerance genes were principally located in chromosomes. The *mcr-4* gene was exclusively associated with the ColE10 plasmid, suggesting the possibility of targeted interventions to curb its spread in pig *E. coli* populations.

## Introduction

Since penicillin was first discovered in 1928, antimicrobials have transformed our society and economy, saving countless human and animal lives. Antibiotics have been used routinely in farm animal production since the 1950s to treat, control and prevent infectious diseases and to increase productivity. However, the incongruous use of antimicrobials in human and animal medicine over the last few decades has promoted the emergence and spread of antimicrobial resistance (AMR), which has since become one of the greatest global health challenges of our time [1]. Due to recent industrialisation, high-density packing numbers and earlier weaning, swine are exposed to more antibiotics than any other livestock animal [2] and consequently, AMR is widespread in the industry [3–6]. Many antibiotics categorised as Critically Important Antimicrobials (CIA) for human medicine according to the WHO (WHO CIA list), such as enrofloxacin or ceftriaxone, are commonly used in animals [7], and subsequent resistance can directly affect human wellbeing. Several AMR genes that provide resistance to last-resort antibiotics reserved for the most severe infections in humans have been detected in swine [8, 9].

Plasmid-mediated genes that confer colistin resistance in commensal *Escherichia coli* have been isolated from pigs, pork products and humans in China [10]. Deemed too toxic for human use, colistin is reemerging as a last line antibiotic in clinical medicine for use against multidrug-resistant (MDR) bacteria that are resistant to conventional antimicrobial therapies [11][12]. Colistin use has previously been widespread in agriculture and the swine production industry, including for treating *E. coli* infections in postweaning cases of diarrhoea. This has promoted the emergence of colistin resistant clones, either through point mutations in the chromosome [13], or plasmid-mediated colistin resistance genes. Mobile colistin resistance (*mcr*) genes, such as *mcr-1*, pose a significant public health risk as they can be easily transferred between bacteria, leading to onward transmission from livestock to humans [10]. Livestock swine are a key reservoir of *mcr* genes [14, 15], among other AMR genes of public health relevance, including extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) and plasmid-mediated quinolone resistance (PQMR) genes[16–19].

An epidemiological link has been shown between antimicrobial consumption in animals and increased AMR in humans [16]. However, identifying a direct link between AMR resistance isolates found in livestock and those that affect humans is not always easy as there are often limitations in sampling and timeframes [17]. Studies of *Klebsiella pneumoniae* [18], *E. coli* [19] and *Enterococcus faecium* [20] from both livestock and human sources have had limited success demonstrating a clear One Health transmission network [20]. Furthermore, bacteria associated with pig farm and slaughterhouse workers carry a greater number of AMR genes than the general population [21], in particular for livestock-associated lineages of MRSA [22, 23]. Commensal bacteria can act as a genetic reservoir from which disease-associated clones emerge, as evidenced by the emergence of pathogenic lineages of *Streptococcus suis* in European and Asian pig stocks [24, 25]. This can extend to AMR genes, where the greater diversity in commensal strains can be accessed by pathogenic lineages [26, 27]. Many AMR genes have evolved from these environments and novel resistance genes such as *mcr-1* are often first identified in isolates from livestock (mainly swine) or aquaculture industries [28], emphasising the requirement for a One Health approach to AMR surveillance [29].

In addition to antimicrobial, heavy metals (HM) such as zinc oxide or copper sulphate are used extensively in the swine industry, due to their great benefits for piglets after weaning such as increased growth rate, immunostimulation, antioxidant and anti-inflammatory

effect and the improvement of the intestinal integrity [30, 31]. However, their environmental pollutant effects have been demonstrated [32, 33]. Researchers have previously demonstrated a co-occurrence of genes responsible for AMR and HM resistance in bacterial genomes across different genera [34], and metagenome studies have shown evidence of AMR and HM co-selection in swine [35], but no study has focused on the role of *E. coli* in the evolution of these genes in swine production, where these compounds are most used.

*E. coli* is commonly used as a sentinel species to assess AMR [36, 37], and whole genome sequencing (WGS) of *E. coli* strains provides an effective surveillance tool to monitor AMR in swine [3, 38–40]. Alongside clonal transmission of resistance determinants [41], plasmids are expected to play a pivotal role in AMR dissemination. In this study, we characterise the genomes of 112 *E. coli* isolates from farmed pigs in Spain, particularly in Catalonia a region known for its prominent role in Spanish pig production. Our objective was to identify known determinants of AMR and genes involved in HM tolerance to pinpoint patterns of co-selection and assess their extra-chromosomal mobility.

## **Materials and methods**

### **Bacterial genome collection**

The Veterinary Laboratory for the Diagnosis of Infectious Diseases (VLDID) of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain) has a biobank of frozen bacterial strains isolated from porcine clinical cases, sampled between 1999 and 2020. A representative subset of *E. coli* isolates was selected from different studies conducted in pig farms with a record of neonatal or post-weaning diarrhoea [15, 42]. In total, 112 isolates (96 from diarrheic piglets and 16 from healthy pen mates) were sampled from swine farms, and pure isolate cultures were stored at -80°C in Microbank® beads (Pro-Lab Diagnostics, Cheshire, UK). The selected isolates were thawed and cultured on McConkey agar under aerobic conditions for 24h at 37°C as previously described [42].



### **DNA extraction, short-read sequencing and archiving**

DNA was extracted using the QIAMP DNA Mini Kit (QIAGEN, Crawley, UK), as per the manufacturer's instructions. Nucleic acid content was quantified using a Nanodrop spectrophotometer before normalization and sequencing. Libraries were prepared using the Nextera XT Library Preparation Kit and high-throughput sequencing was performed using an Illumina MiSeq sequencer (Illumina, Cambridge, UK). Libraries were sequenced using a 2x300 bp paired-end v3 reagent kit (Illumina). Short-read paired-end data were filtered and trimmed using Trimmomatic [43] and assembled using SPAdes (version 3.7) [44]. All assembled genomes with greater than 25X coverage were uploaded to the Public Databases for Molecular Typing and Microbial Genome Diversity (pubMLST) (<https://pubmlst.org/>) [45] and given a unique identification number (pubMLSTid; Supplementary table 1).

### **Phylogenetic analysis and phylogroup and sequence type identification**

Multiple sequence alignments were made from concatenated sequences using the BLAST algorithm to identify orthologs of genes present in the reference genome following a gene-by-gene alignment [46], with *E. coli* K12 strain (Accession number: NZ\_CP010444.1) as a reference, using MAFFT [47]. The core genome was defined as genes shared by 90% or more of the isolates and the subsequent alignment was used to construct a maximum likelihood phylogeny using RAXML version 8 [48] with GTR-GAMMA substitution model, which was used as input in ClonalFrameML [49] to generate a recombination-free phylogeny. Interactive phylogenies were visualised using Microreact (<https://microreact.org/project/eaf2gvwJrsy2hNZ5StEXbe-amrgenepigsfinal>) [50]. *E. coli* isolates were assigned to phylogroups using ClermonTyping [51] and Sequence Types (ST) with PubMLST (<https://pubmlst.org/>) [45], using the seven gene Achtman MLST scheme [52].

### **Screening for AMR and HM tolerance genetic determinants**

All *E. coli* genomes were screened for the presence of AMR genes against the ResFinder database (version 4.4.3) [53] and were grouped into families according to the provided classification. All genomes were further screened for the presence of plasmid replicons using PlasmidFinder (version 2.1.1) [54]. In addition, we used the MetalResistance database from ARGprofiler [55] to identify determinants contributing to HM tolerance. A

positive hit was defined for all the software tools when a gene had >80% nucleotide identity over >80% of the sequence length.

### **Assignment of AMR and HM tolerance genes to plasmids**

We used a combinational method to estimate the location of the AMR determinants and HM tolerance genes to either a plasmid or chromosomal location in the genome. First, genomes were scanned against a binary plasmid tool plasmidEC [56], which is an ensemble classifier that combines results from Platon [57], RFPlasmid [58] and Centrifuge [59] to classify contigs into those that form part of the chromosome or plasmids. Those contigs putatively identified to form plasmids were used as input for MOB-Suite software [60] using the MOB-Recon option to reconstruct putative plasmid sequences. Briefly, MOB-Suite identifies and assembles plasmid contigs from Mash and BLAST databases [61]. This combinational method helps overcome some of the limitations of using a single platform to distinguish contigs from the chromosome and plasmids, for example, there is evidence to suggest that using MOB-Suite alone overestimates the presence of AMR genes in the chromosome. Incorporation of plasmidEC specifically helps reduce incorrect attribution of plasmid contigs to the chromosome [62]. Once contigs had been attributed to either the chromosome or a putative plasmid, they were screened against the Resfinder [53] and MetalResistance [55] databases and typed using the PlasmidFinder database ([54]).

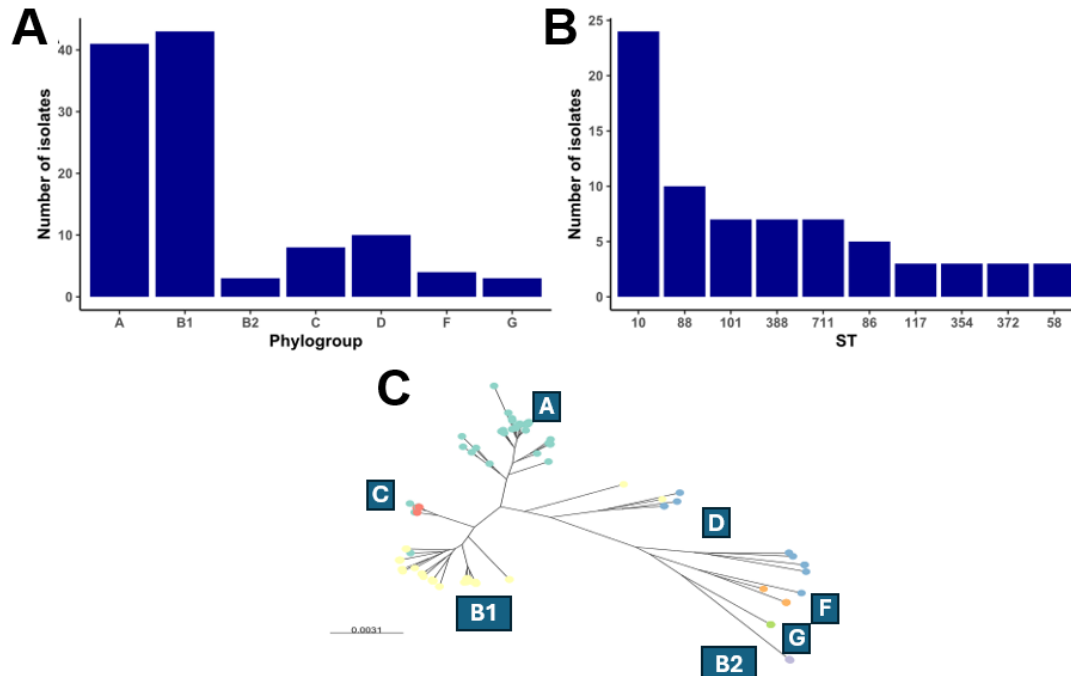
### **Long-read sequencing**

Hybrid genome assemblies constructed from short- and long-read sequencing data provide confidence when screening large datasets for plasmid-specific sequences. Therefore, a subset of isolates representing all phylogroups (n=18) were sequenced using long-read methods. DNA was extracted using the Wizard® HMW DNA Extraction Kit (Promega, Wisconsin, USA), following the manufacturer's instructions and ensuring the DNA was not sheared. DNA concentration was quantified using the QuantiFluor® ONE dsDNA System (Promega, Wisconsin, USA). Sequencing libraries were prepared using the Rapid Barcoding Kit V14 and pooled libraries were sequenced on an Oxford Nanopore Technologies PromethION P2 Solo using an R10.4.1 flow cell. Refined genome assemblies were constructed employing a hybrid approach with the use of Unicycler, using default settings [63].

## Results

### *E. coli* isolates from pigs predominantly clustered in phylogroups B1 and A

The main objective of this study was to characterise the genomes of 112 porcine *E. coli* isolates from pig farms with a history of diarrhoea. Isolates were principally collected from farms in Catalonia, the leading region in Spain for pig production, AMR determinant and HM tolerance genes were identified and assessed for their potential to pose a public health risk via mobilisation and dissemination within the farm environment. There was evidence for variation in the distribution of the pig isolates among six phylogroups. Isolates were assigned to phylogroups with three quarters of *E. coli* isolates in our dataset (75%) distributed among phylogroups B1 (n=43; 38.4%) and A (n=41; 36.6) (Figure 1A,C). Isolates assigned to the remaining phylogroups were less common and included phylogroups D (n=10), C (n=8), F (n=5), B2 (n=4) and G (n=3). Isolates were also typed according to the Achtman seven gene MLST scheme and clustered in 33 unique sequence types (STs), including ST10 (n= 24, 21.4%), ST88 (n=10, 8.9%), ST711 (n=7, 6.3 %), ST388 (n=7, 6.3 %) and ST101 (n=7, 6.3 %) (Supplementary Table 2, Figure 1B).

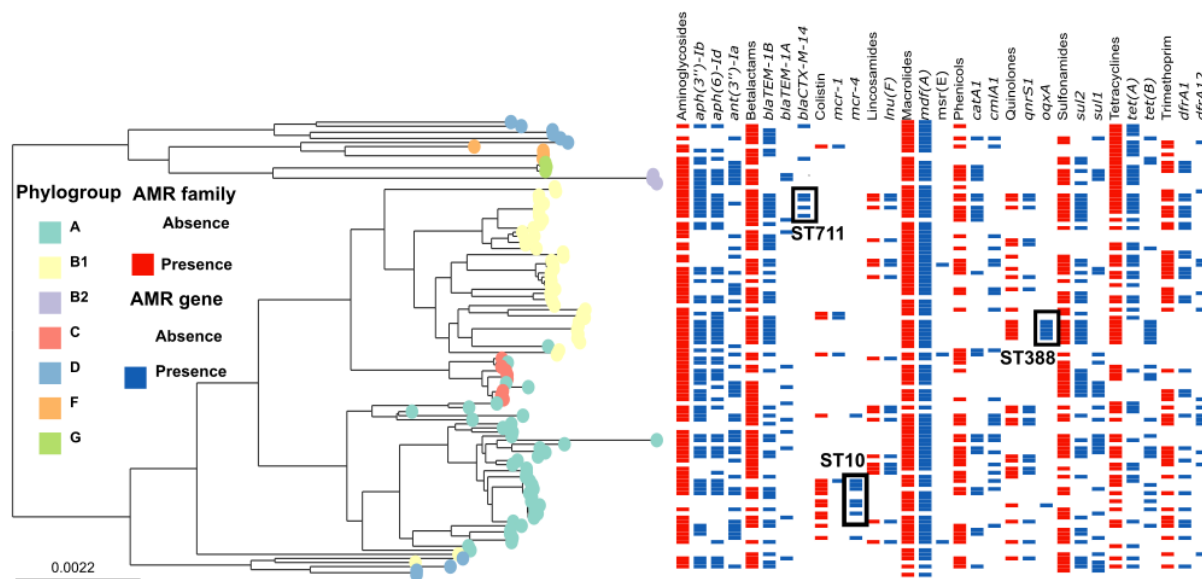


**Figure 1. Population structure of *E. coli* porcine strains.** A: Barplot displaying the isolate number of each phylogroup. B Barplot showing the isolate number of the ten most common ST. C: Recombination maximum-likelihood phylogenetic tree based on *E. coli* K12-MG1655 showing the phylogenetic relationships between the distinct phylogroups.

## Genes encoding AMR and HM tolerance determinants are distributed across the population

We compared nucleotide sequences of all 112 porcine *E. coli* genomes against a curated reference database to identify known determinants of AMR. In total we identified 59 different AMR determinants and each *E. coli* isolate contained an average of 7.8 AMR genes (range: 1-16), conferring resistance to an average of 5.03 different families of antibiotics (range: 1-8) (Figure 2; Supplementary Table 3). We identified AMR determinants from the macrolides (present in 85.7 % of the isolates), aminoglycosides (79.4 %), beta-lactams (74.1 %), sulfonamides (61.6%) and tetracyclines (61.6%) families of antibiotics (Supplementary Table 3). Our most frequently identified AMR determinants were *mdf(A)* (84.8%), *aph(3'')-Ib* (52.7%), *bla<sub>TEM-1b</sub>* (45.6%) and *aph(6)-Id* (45.6%). Notably, we also detected the presence of ESBL genes (*bla<sub>CTX-M</sub>* type and *bla<sub>SHV</sub>* type) in 15.2 % of isolates, colistin-resistance genes (*mcr-1*, *mcr-4*, *mcr-5*) in 13.4%, and quinolone resistance genes (*oqxA*, *oqxB*, *qnrB19*, *qnrD1* and *qnrS1*) in 25% of the isolates. Carbapenem-resistance OXA-type and *tetX* genes were not detected. Some AMR determinants were found in clusters of isolates, such as *bla<sub>CTX-M-14</sub>* or *oqxAB* which were found exclusively in phylogroup B1 clusters, specifically in isolates from ST711 and ST388, respectively. Six out of eight isolates carrying the *mcr-4* gene clustered in ST10 (phylogroup A) (Figure 2).

While there have been calls to improve reference databases to better predict the relationship between gene presence and the phenotype [64], using current methods we identified a high frequency of HM tolerance genes (Supplementary Table 4), with strains possessing an average of 65.5 genes (range 9-90). We detected at least one HM tolerance gene used against a metal used by the agricultural industry in all isolates. For example, every strain contained a gene that is predicted to raise tolerance to either arsenic or cadmium. In addition, putative HM tolerance genes were present in 99% of the isolates against zinc and copper, two metals commonly used in swine production. The least common HM tolerance genes we identified were those conferring resistance to antimony, which were still present in a high number of isolates (91.1%). Metal resistance genes appear to be part of the core genome of *E. coli*, reflecting their essential roles in metabolism

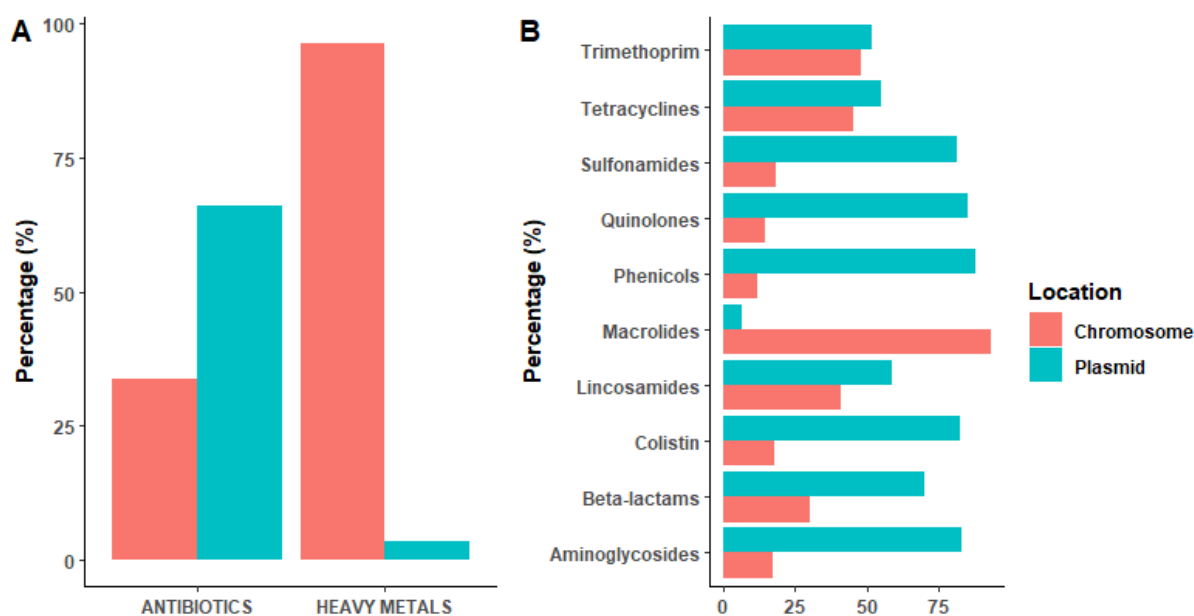


**Figure 2:** Distribution of AMR genes across population structure. A recombination-free maximum-likelihood mid-point rooted phylogenetic tree based on *E. coli* K12-MG1655 reference genome is shown. The presence/absence of the most common AMR genes grouped by their respective families against which they confer resistance are mapped against the phylogeny. AMR genes clustered specific ST clusters are highlighted. Phylogroup was assigned according Clermont scheme [51]. Antimicrobial resistance determinants were detected according Resfinder [53].

### AMR determinants are mostly carried by plasmids, while HM and biocide tolerance genes are chromosomal

We detected 733 plasmid clusters using a combined bioinformatics approach using MOB-SUITE and plasmidEC software that predict plasmid contig sequences in alternative, but complimentary methods. Where possible, putative plasmids were also typed according to their replicon type (592 of 733 putative plasmids; 80.8 %). The mean size of the identified plasmids was 23,466 bp and each strain carried an average of 6.5 plasmids. In total, 193 (26.3%) plasmids included at least one AMR resistance determinant. We compared the distribution of AMR determinants and HM genes between plasmid and chromosomal locations (Figure 3A). AMR determinants were most frequently found on putative plasmids (66.1%), except for the *mdfA* gene (which was exclusively located in the chromosome). Conversely, HM tolerance genes were almost exclusively found in the chromosome (96.4%), except for a minority of genes contributing to tolerance of copper (*pcoA/B/C/D/E/R/S*), arsenium (*silA/B/C/E/F/P/R/S*) mercury (*merB/C/D/E/P/R/T*) and tellurium (*terW/Z*) found in plasmids. In addition, we observed differences in the distribution of AMR determinants between different antibiotic families (Figure 3B). While most of the macrolides (95.3%) resistance genes were found in chromosomes,

determinants for other antibiotic families were more prevalent in plasmids, particularly those with roles in phenicol (87.9%), quinolone (85.3%), aminoglycoside (82.8%), colistin (82.4%), and sulfonamide (81.5 %) resistance.



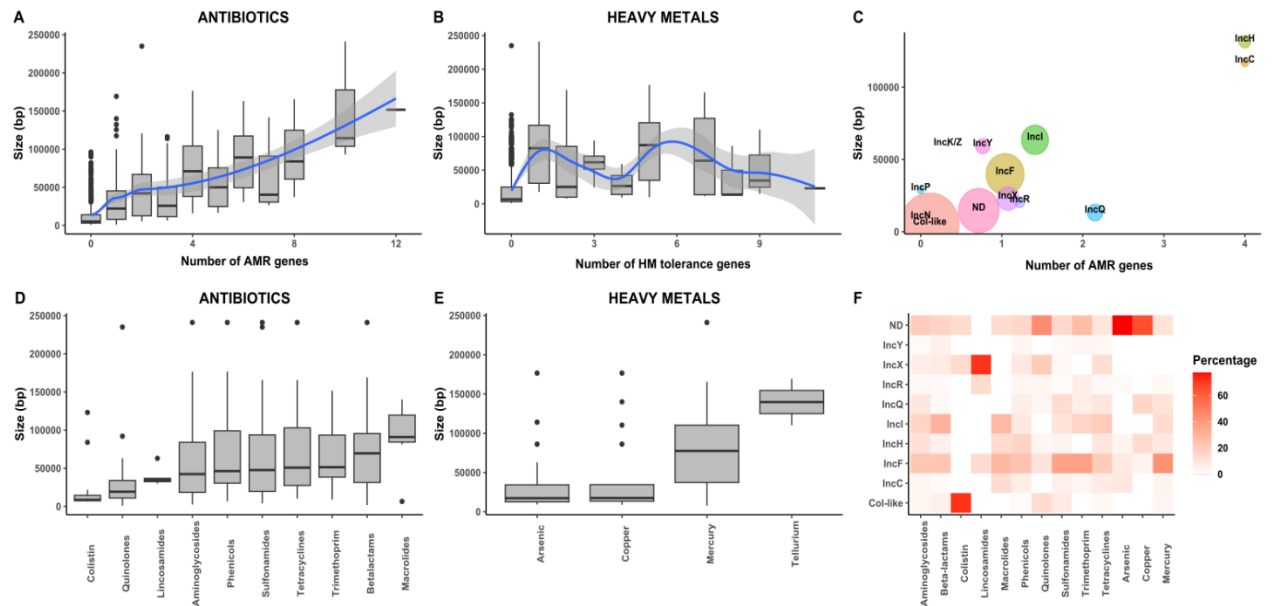
**Figure 3:** Putative assignment of AMR determinants and HM genes to either the chromosome or plasmids. A: Bar plot showing the distribution of AMR determinants and HM tolerance genes into chromosomes or plasmids. B: Bar plot comparing the genome location into chromosome or plasmid for each antibiotic family. Red: chromosome location. Blue: plasmid location.

### Large plasmids tend to carry more AMR genes

Plasmid size correlated with the number of AMR determinants (Figure 4A). However, this relationship was not observed for HM tolerance genes, where most genes were assigned to the chromosome (Figure 4B). The frequency of at which we identified AMR determinants also varied by plasmid replicon type (Figure 4C, Supplementary Table 5). Col-like (n=295) and IncF (n=120) plasmids were the most frequently predicted plasmid types, but included a relatively low number of AMR determinants (averages of 0.1 and 1.04, respectively). On the other hand, IncH (n=12) and IncC (n=6) plasmid groups contained the greatest number of AMR determinants on average (4).

However, plasmid size is a better predictor of AMR determinant carriage, rather than replicon type, with the only exception to this, the IncQ plasmids (n=20). The importance of plasmid size was further investigated for each antibiotic and HM family (Figure 4D-

E). Most AMR determinants are located on medium sized plasmids (~50,000 bp in length).



**Figure 4** Characteristics of plasmids carrying AMR and HM genes. A, B: Boxplots showing the distinct plasmid size (bp) according to the number of AMR (A) and HM tolerance genes (B) that contained each plasmid. C: Size of the plasmids and number of AMR genes contained by each plasmid replicon type. The bigger the circle, more frequent was the plasmid group. D, E: Boxplots showing the size of the plasmids for each antibiotic (D) and heavy metal (E) family. F: Heatmap showing the association between the plasmid replicon types and AMR genes grouped into antibiotic/metal families. Only those antibiotic/HM families and plasmids with  $n > 5$  are visualized.

AMR determinants from certain antibiotic families were accumulated more frequently on larger plasmids; for example, plasmids containing genes that encode macrolide or beta-lactam resistance determinants were mostly found on large plasmids, with a median size of 90,986 bp and 69,550 bp, respectively. AMR determinants conferring putative resistance to lincosamides and quinolones are found on smaller plasmids, with median sizes of 34,441 bp and 19,303 bp, respectively. Plasmids predicted to carry determinants for colistin resistance are the smallest on average, with a median size of 8,631 bp (Figure 4D). Tellurium and mercury tolerance were present in larger plasmids and copper and mercury genes in smaller ones (Figure 4E). This reflects a general trend for heavy metal tolerance genes to be found on either small or large plasmids, while AMR determinants were more commonly found on medium size plasmids.

Finally, we also investigated the relationship between plasmid types and the AMR gene families (Figure 4F). Most of the AMR gene families were present on IncF plasmid, as

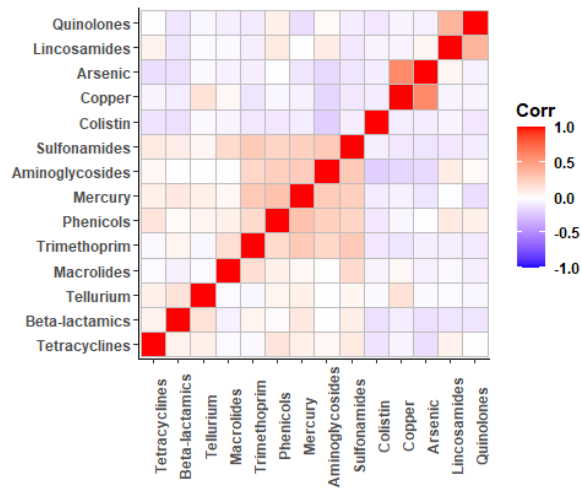
one of the most common replicon types. Beta-lactams and macrolides were more commonly found on the larger IncI plasmids, and colistin was highly associated with the smaller Col-like plasmids, lincosamides with IncX plasmids, and quinolones, arsenic and copper genes with plasmids that could not be typed.

### **HM and AMR genes are rarely found on the same plasmid**

Despite HM tolerance genes generally being located on the chromosome, mercury, copper, arsenic and tellurium genes were also found on plasmids. Thus, we sought to determine whether AMR and HM tolerance genes were co-located in the same plasmid sequences. A total of 45 plasmids contained both compound types. These plasmids have a higher mean size (84262 bp) than those which only contain AMR (40721 bp) or HM genes (21350 bp). A possible explanation for this is that the most common plasmid replicons were larger in size compared to other less common plasmids, such is the case for IncF (n=15), IncH (n=7), and IncI (n=6) (Figure S1A). The only exceptions were IncQ plasmids, that were relatively common, carried several AMR and HM determinants, but are quite small plasmids. The most common resistance families are shown in Figure S1B. These results reveal the most common HM tolerance genes to be located on the same plasmid as AMR genes to confer mercury tolerance, which is not used in swine production, despite being present in the 80% of plasmids. This contrasts with the prevalence of more commonly used metals, such as copper, which was present in 15.6% of plasmids.

We constructed a matrix to identify the co-occurrence of each resistance group on the same plasmid sequences (Figure 5). The presence of colistin genes was always negatively associated with the presence of any other family, highlighting that these genes tended to be separate from any other resistance groups. Quinolones and lincosamides were often discovered on the same plasmids, which tended to occur on IncX type plasmids (Figure 4F). With regards to HM tolerance genes, arsenic and copper genes tended to be located on the same plasmids, and negatively correlated with the antibiotic families. Finally, plasmids containing mercury and antibiotic families such as sulfonamides, aminoglycosides, phenicols and trimethoprim are the most frequently found together, showing the most common route for potential HM-AMR co-selection.

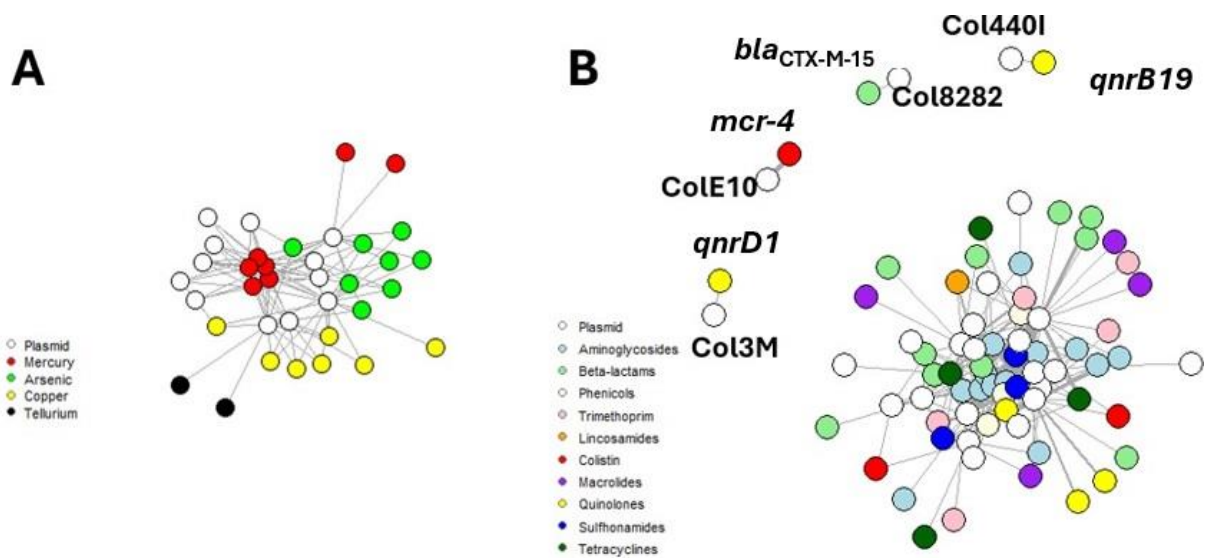




**Figure 5:** Plasmid co-occurrence matrix showing the colocation of the distinct antibiotic and HM families. Axes are ordered according to hierarchical clustering by group.

**The *mcr-4* colistin and *qnrD1* quinolone resistance genes were associated with ColE10 and Col3M plasmids, respectively.**

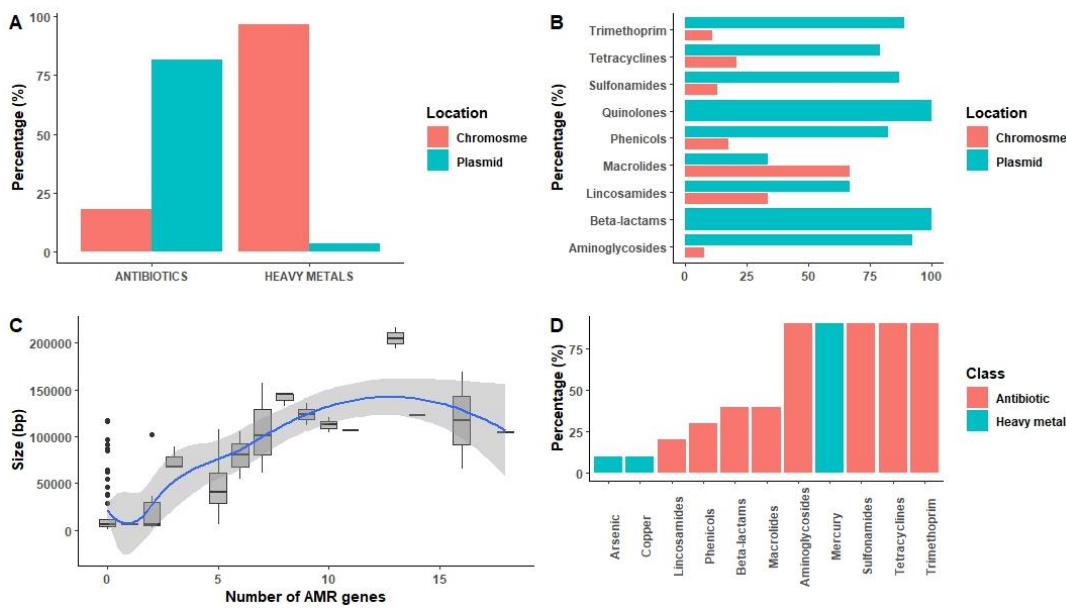
HM tolerance genes, most were typically chromosomally encoded (96.4%), with only a few located on plasmids (3.6%). By clustering genes according to how often they were found on specific plasmids (Figure 6A) most HM genes were present uniformly across different plasmid types. Similarly, most AMR genes did not cluster together, however four genes demonstrated some clustering by plasmid type (Figure 6B). The quinolone resistance gene *qnrB19* (n=1) clustered other genes from the Col440I plasmid, and the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla<sub>CTX-M-15</sub>* (n=1) was associated with the Col8282 plasmid. These plasmids did not carry any other genes, and due to the low prevalence, few conclusions can be drawn; more significantly, the quinolone resistance gene *qnr1* (n=3) was consistently identified within the Col3M plasmid. The colistin resistance gene *mcr-4*, which appeared with relatively high frequency (n=8) and was consistently found in the ColE10 plasmid. Notably, these plasmids did not carry any other AMR or HM tolerance genes.



**Figure 6.** Network analysis of HM tolerance (A) and AMR (B) genes and each location. The edge line's width increases proportionally according to the number of genes that were found in the specific plasmid. Node placement is determined using the Fruchterman-Reingold algorithm.

### Validation of plasmid identification through long read sequencing

To support our combinational approach to plasmid identification, we sequenced a subset of isolates representing all phylogroups with long read sequencing methods and constructed hybrid assemblies (n=18). This approach also placed most AMR determinants in plasmids, while HM tolerance genes were chromosomally encoded (Figure 7A). Antibiotic families follow a similar pattern to the short reads, even the location in plasmids was higher (Figure 7B). Moreover, plasmid length positively correlated with the number of AMR genes present (Figure 7C) and the possible co-selection of HM and AMR genes was mainly mediated by an environmental pollutant not used in swine production such mercury (Figure 7D), validating the main findings with the hybrid assemblies.



**Figure 7:** Result validation using hybrid assemblies. A, B: Barplots comparing the location into chromosome or plasmid for AMR and HM tolerance genes (A) and specifically for each antibiotic family (B). C: Boxplots showing the distinct plasmid size (bp) according to the number of AMR genes that contained the plasmid. D: Barplot showing the most common antibiotic/HM families in plasmids containing both compounds.

## Discussion

As the earliest identified microorganism, *E. coli* is the most well studied and characterised bacteria [65]. With a broad host range and widespread distribution, *E. coli* has often been used as a sentinel species to study the dissemination and AMR [3, 66]. In this study, we sequenced and screened 112 *E. coli* isolates from a region in Spain with one of the highest densities of pig farms. Previously studies identified phylogroup A as the most common in pigs, followed by B1 [67–69]. Our results are consistent with this, with other phylogroups represented by less than 10% of isolates. Several plasmids were identified in each strain (average: 6.5), which is higher than observed in many other studies bacterial species, such as *Salmonella* [70], but in consonance with other studies of livestock *E. coli* genomes [71, 72].

We identified multiple AMR determinants per isolate, conferring predicted resistance to an average of 4.5 antibiotic classes. MDR isolates were widespread in our collection, conferring resistance to three or more antibiotic families [73]. Of particular public health concern, genes that can confer resistance to last resort antibiotics used in human medicine were found in multiple isolates. For instance, ESBL genes were present in 17% of our isolates, including *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-32</sub> genes, which are commonly reported in

swine [38, 74–77]. In contrast, *bla*<sub>CTX-M-1</sub>, which is prevalent in Europe [78] was absent. Additionally, low numbers of ESBL genes related with human clinical isolates were detected [79], such as *bla*<sub>CTX-M-15</sub> and *bla*<sub>CTX-M-27</sub>, associated with pandemic clone ST131 in hospital settings.

Resistance determinants with activity to last resort antibiotics, such as carbapenem or tigecycline, which have previously been reported in pigs from different countries, mainly in Asia, such as *bla*<sub>OXA-48</sub> [80], *bla*<sub>NDM</sub> [81, 82] or *tetX* [83], were not detected. Given that carbapenems are not licensed for use in food-producing animals in the EU and other parts of the world, the absence of carbapenem-resistant genes supports the continued restriction of their use in veterinary medicine to prevent the emergence and spread of resistant strains through the food production chain. Colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-4*, and *mcr-5*) were found in 13% of isolates, with *mcr-4* being the most frequent, aligning with other studies conducted in Southern Europe, including Spain [38], Portugal [84] and Italy [85]. Given that *mcr-1* is the most frequently occurring in pigs globally [14], the results presented here suggest that the frequency of *mcr* genes may vary depending on the geographical region studied.

Plasmids were the primary vehicle for transmission and dissemination of AMR genes [86]. This mirrors findings in avian pathogenic *E. coli*, where isolates primarily acquire virulence genes through the acquisition of plasmids [87]. However, the carriage of HM tolerance genes was not often observed in our collection. This likely reflects the essential role metal ions in core metabolism, for example many enzymes require metal ions as co factors, such as RNA polymerase that requires magnesium ions for active function. However, high concentrations of HM ions are toxic to the cell, and metal ion homeostasis is therefore carefully regulated. Bacteria possess a suite of genes to aid metal ion uptake, storage and efflux, all under the tight control of regulators [88].

Some studies have found a correlation between HM use/exposure (especially zinc) and AMR levels in pig faeces [89–91] and it has been suggested that these genes are carried together on the same MGEs [92]. However, we observed limited co-carriage of AMR determinants and HM tolerance genes on the same plasmid. Another explanation is that metal exposure alters the swine microbiota [93–95], selecting for isolates with chromosomally encoded AMR genes [96, 97]. Alternatively, oxidative stress might increase AMR gene expression and conjugation [98], with copper specifically raising minimum inhibitory concentration in *E. coli* [99]. Further research is needed to explore

these hypotheses and understand how metals exacerbate problems associated with AMR. Nevertheless, co-selection, although rare, was observed, with mercury -an environmental pollutant not used in swine production- being the most implicated metal, as previously demonstrated in swine [100] and human isolates [34, 101]. This suggests an environmental origin for these plasmids, underscoring the importance of the One Health approach.

Transmission of AMR *Enterobacteriaceae* between human clinical samples and livestock, at least in developed countries, is unclear [19, 102], although plasmid sharing is possible [103, 104]. We analysed plasmid epidemiology by replicon type and size, finding IncF and Col-like plasmids to be the most common, consistent with previous studies [3, 38, 69]. Only 26.3 % of plasmids contained AMR genes, indicating most plasmids are not involved in AMR transmission. Generally, plasmid size correlated with the number of AMR genes [105, 106], with colistin resistance genes typically found on smaller Col-like plasmids, often without other genes. These results contradict findings in China [107], where most studies have focused on the *mcr-1* gene. The most common *mcr* gene in our dataset was *mcr-4*, suggesting a difference in the epidemiology between the *mcr-1* genes and the frequency of co-selection with other AMR determinants. Sulfonamides, aminoglycosides, phenicols, trimethoprim, and mercury resistance genes tended to co-occur on the same plasmid, which is consistent with other class 1 integrons [67, 68] and pose a public health concern since these classes are commonly used to treat porcine bacterial infections.

We also studied the genetic context of AMR genes on specific plasmids. For specific examples such colistin, stopping antibiotic use might not be enough to eliminate resistance genes if they are co-located with other beneficial genes [108]. Targeting specific plasmid types could help reduce AMR transmission [109]. Findings from our study support previous work reporting *qnrD* on Col3M plasmids [110] and *mcr-4* as the exclusive resistance gene on ColE10 plasmids [38]. While the *mcr-4* gene has not been widely reported, this gene appears to be relatively frequent in the Iberian Peninsula [38, 84, 111], and consequently, targeting ColE10 plasmids could represent an alternative way to control the dissemination of colistin resistance in the farm environment. Identification of *mcr-4* genes in samples from wildlife in other areas of Catalonia [112] suggests environmental contamination and the need for improved control strategies.

We used a combinational approach to assign contigs to either the chromosome or plasmids from short read sequencing data. The efficacy of MOB-Suite [60] to reconstruct plasmids sequences from short-read data has been shown [26, 70, 113], albeit conservatively, with ambiguous contigs assigned to the chromosome, which would underestimate the number of AMR genes found on plasmids in our collection. This was partially overcome by using a combinatorial approach with supporting data from plasmidEC. Although challenges remain in reliably identifying plasmids from genomic data using short reads alone, we also verified our assignment of contigs using long read methods, which broadly agreed with our categorisations [114].

In summary, this study genomically characterises 112 *E. coli* isolates from a high-density pig population in Catalonia. We found a high frequency of AMR genes, including those conferring resistance to critical antibiotics. Plasmid size correlated with AMR gene quantity, and colistin resistance genes were often alone on small plasmids. HM tolerance genes were common but rarely co-carried with AMR genes on the same plasmid. Further research on oxidative stress and other hypotheses is needed to understand how metals contribute to AMR. Finally, specific plasmids, such as ColE10 carrying *mcr-4*, may provide new targets for controlling AMR in this region.

### **Conflict of interests**

The authors declare that there are no conflicts of financial, general or institutional competing interests.

### **Funding information**

Biel Garcias was supported by Departament de Recerca i Universitats de la Generalitat de Catalunya (FI-SDUR 2020).

### **Bibliography**

1. **Murray CJ, Ikuta KS, Sharara F, Swetschinski L, Robles Aguilar G, et al.** Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet*;399. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)02724-0.
2. **Dewulf J, Joosten P, Chantziaras I, Bernaerdts E, Vanderhaeghen W, et al.** Antibiotic Use in European Pig Production: Less Is More. *Antibiotics*;11. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11111493.
3. **Peng Z, Hu Z, Li Z, Zhang X, Jia C, et al.** Antimicrobial resistance and population genomics of multidrug-resistant *Escherichia coli* in pig farms in mainland China. *Nat Commun*;13. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1038/s41467-022-28750-6.

4. **Garcias B, Martin M, Darwich L.** Characterization of Antimicrobial Resistance in Escherichia coli Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia. *Animals*;14. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.3390/ani14030487.
5. **Scicchitano D, Leuzzi D, Babbi G, Palladino G, Turrone S, et al.** Dispersion of antimicrobial resistant bacteria in pig farms and in the surrounding environment. *Anim Microbiome* 2024;6:17.
6. **Moennighoff C, Thomas N, Nienhaus F, Hartmann M, Menrath A, et al.** Phenotypic antimicrobial resistance in Escherichia coli strains isolated from swine husbandries in North Western Germany - Temporal patterns in samples from laboratory practice from 2006 to 2017. *BMC Vet Res*;16. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1186/s12917-020-2268-z.
7. **World Health Organization.** List of Critically Important Antimicrobials for Human Medicine (WHO CIA List) 6th Rev. Epub ahead of print 2018. DOI: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>.
8. **Burow E, Rostalski A, Harlizius J, Gangl A, Simoneit C, et al.** Antibiotic resistance in Escherichia coli from pigs from birth to slaughter and its association with antibiotic treatment. *Prev Vet Med*;165. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2019.02.008.
9. **Nhung NT, Cuong N V., Thwaites G, Carrique-Mas J.** Antimicrobial usage and antimicrobial resistance in animal production in Southeast Asia: A review. *Antibiotics*;5. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.3390/antibiotics5040037.
10. **Liu YY, Wang Y, Walsh TR, Yi LX, Zhang R, et al.** Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis* 2016;16:161–168.
11. **Spapen H, Jacobs R, Van Gorp V, Troubleyn J, Honoré PM.** Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. *Ann Intensive Care* 2011;1:14.
12. **Dhariwal AK, Tullu MS.** Colistin: Re-emergence of the ‘forgotten’ antimicrobial agent. *J Postgrad Med* 2013;59:208–215.
13. **Gogry FA, Siddiqui MT, Sultan I, Haq QMR.** Current Update on Intrinsic and Acquired Colistin Resistance Mechanisms in Bacteria. *Frontiers in Medicine*;8. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3389/fmed.2021.677720.
14. **Rhouma M, Beaudry F, Letellier A.** Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *Int J Antimicrob Agents* 2016;48:119–126.
15. **Aguirre L, Vidal A, Seminati C, Tello M, Redondo N, et al.** Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (mcr) genes in Escherichia coli from swine between 1999 and 2018. *Porcine Health Manag* 2020;6:4–9.
16. **Allel K, Day L, Hamilton A, Lin L, Furuya-Kanamori L, et al.** Global antimicrobial-resistance drivers: an ecological country-level study at the human–animal interface. *Lancet Planet Health* 2023;7:e291–e303.

17. **Robinson TP, Bu DP, Carrique-Mas J, Fèvre EM, Gilbert M, et al.** Antibiotic resistance is the quintessential One Health issue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*;110. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1093/trstmh/trw048.
18. **Thorpe HA, Booton R, Kallonen T, Gibbon MJ, Couto N, et al.** A large-scale genomic snapshot of *Klebsiella* spp. isolates in Northern Italy reveals limited transmission between clinical and non-clinical settings. *Nat Microbiol*. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.1038/s41564-022-01263-0.
19. **Ludden C, Raven KE, Jamroz D, Gouliouris T, Blane B, et al.** One health genomic surveillance of *Escherichia coli* demonstrates distinct lineages and mobile genetic elements in isolates from humans versus livestock. *mBio*;10. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1128/mBio.02693-18.
20. **Gouliouris T, Raven KE, Ludden C, Blane B, Corander J, et al.** Genomic surveillance of *Enterococcus faecium* reveals limited sharing of strains and resistance genes between livestock and humans in the United Kingdom. *mBio*;9. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1128/mBio.01780-18.
21. **Van Gompel L, Luiken REC, Hansen RB, Munk P, Bouwknecht M, et al.** Description and determinants of the faecal resistome and microbiome of farmers and slaughterhouse workers: A metagenome-wide cross-sectional study. *Environ Int*;143. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1016/j.envint.2020.105939.
22. **Dorado-García A, Bos MEH, Graveland H, Van Cleef BAGL, Verstappen KM, et al.** Risk factors for persistence of livestock-associated MRSA and environmental exposure in veal calf farmers and their family members: An observational longitudinal study. *BMJ Open*;3. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1136/bmjopen-2013-003272.
23. **Reynaga E, Torres C, Garcia-Nuñez M, Navarro M, Vilamala A, et al.** Prevalence of MRSA ST398 carriage in nursing home residents in an area of Spain with a high density of pig farming. *Infect Control Hosp Epidemiol*;39. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1017/ice.2017.244.
24. **Murray GGR, Hossain ASMM, Miller EL, Bruchmann S, Balmer AJ, et al.** The emergence and diversification of a zoonotic pathogen from within the microbiota of intensively farmed pigs. *Proc Natl Acad Sci U S A*;120. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1073/pnas.2307773120.
25. **Weinert LA, Chaudhuri RR, Wang J, Peters SE, Corander J, et al.** Genomic signatures of human and animal disease in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *Nat Commun*;6. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1038/ncomms7740.
26. **Kittiwan N, Calland JK, Mourkas E, Hitchings MD, Murray S, et al.** Genetic diversity and variation in antimicrobial-resistance determinants of non-serotype 2 *Streptococcus suis* isolates from healthy pigs. *Microb Genom*;8. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1099/mgen.0.000882.
27. **Hadjirin NF, Miller EL, Murray GGR, Yen PLK, Phuc HD, et al.** Large-scale genomic analysis of antimicrobial resistance in the zoonotic pathogen *Streptococcus suis*. *BMC Biol*;19. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1186/s12915-021-01094-1.



28. **Shen Y, Zhou H, Xu J, Wang Y, Zhang Q, et al.** Anthropogenic and environmental factors associated with high incidence of mcr-1 carriage in humans across China. *Nat Microbiol*;3. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1038/s41564-018-0205-8.
29. **Perry JA, Wright GD.** The antibiotic resistance ‘mobilome’: Searching for the link between environment and clinic. *Front Microbiol*;4. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.3389/fmicb.2013.00138.
30. **Forouzandeh A, Blavi L, Pérez JF, D’Angelo M, González-Solé F, et al.** How copper can impact pig growth: comparing the effect of copper sulfate and monovalent copper oxide on oxidative status, inflammation, gene abundance, and microbial modulation as potential mechanisms of action. *J Anim Sci*;100. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1093/jas/skac224.
31. **Bonetti A, Tugnoli B, Piva A, Grilli E.** Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets. *Animals*;11. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3390/ani11030642.
32. **Jensen J, Kyvsgaard NC, Battisti A, Baptiste KE.** Environmental and public health related risk of veterinary zinc in pig production - Using Denmark as an example. *Environment International*;114. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/j.envint.2018.02.007.
33. **Zhao X, Sun Y, Huang J, Wang H, Tang D.** Effects of soil heavy metal pollution on microbial activities and community diversity in different land use types in mining areas. *Environmental Science and Pollution Research*;27. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1007/s11356-020-08538-1.
34. **Pal C, Bengtsson-Palme J, Kristiansson E, Larsson DGJ.** Co-occurrence of resistance genes to antibiotics, biocides and metals reveals novel insights into their co-selection potential. *BMC Genomics* 2015;16:1–14.
35. **Li X, Rensing C, Vestergaard G, Arumugam M, Nesme J, et al.** Metagenomic evidence for co-occurrence of antibiotic, biocide and metal resistance genes in pigs. *Environ Int*;158. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1016/j.envint.2021.106899.
36. **Lv C, Shang J, Zhang W, Sun B, Li M, et al.** Dynamic antimicrobial resistant patterns of Escherichia coli from healthy poultry and swine over 10 years in Chongming Island, Shanghai. *Infect Dis Poverty*;11. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1186/s40249-022-01025-4.
37. **Brisola MC, Crecencio RB, Bitner DS, Frigo A, Rampazzo L, et al.** Escherichia coli used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil. *Science of the Total Environment*;647. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.07.438.
38. **García-Meniño I, Díaz-Jiménez D, García V, de Toro M, Flament-Simon SC, et al.** Genomic Characterization of Prevalent mcr-1, mcr-4, and mcr-5 Escherichia coli Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Front Microbiol*;10. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.3389/fmicb.2019.02469.
39. **Bonvegna M, Tomassone L, Christensen H, Olsen JE.** Whole Genome Sequencing (WGS) Analysis of Virulence and AMR Genes in Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)-Producing Escherichia coli from Animal and Environmental Samples in Four Italian Swine

- Farms. *Antibiotics*;11. Epub ahead of print 1 December 2022. DOI: 10.3390/antibiotics11121774.
40. **Pulss S, Semmler T, Prenger-Berninghoff E, Bauerfeind R, Ewers C.** First report of an *Escherichia coli* strain from swine carrying an OXA-181 carbapenemase and the colistin resistance determinant MCR-1. *Int J Antimicrob Agents* 2017;50:232–236.
  41. **Leekitcharoenphon P, Johansson MHK, Munk P, Malorny B, Skarżyńska M, et al.** Genomic evolution of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Sci Rep*;11. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-93970-7.
  42. **Vidal A, Aguirre L, Seminati C, Tello M, Redondo N, et al.** Antimicrobial Resistance Profiles and Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Neonatal Diarrhea in Spanish Pig Farms. *Vet Sci* 2020;7:48.
  43. **Bolger AM, Lohse M, Usadel B.** Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*;30. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu170.
  44. **Prijbelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A.** Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinformatics*;70. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1002/cpbi.102.
  45. **Jolley KA, Bray JE, Maiden MCJ.** Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications [version 1; referees: 2 approved]. *Wellcome Open Res*;3. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1.
  46. **Sheppard SK, Jolley KA, Maiden MCJ.** A gene-by-gene approach to bacterial population genomics: Whole genome MLST of *Campylobacter*. *Genes (Basel)*;3. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.3390/genes3020261.
  47. **Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD.** MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform*;20. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1093/bib/bbx108.
  48. **Stamatakis A.** RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*;30. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu033.
  49. **Didelot X, Wilson DJ.** ClonalFrameML: Efficient Inference of Recombination in Whole Bacterial Genomes. *PLoS Comput Biol*;11. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004041.
  50. **Argimón S, Abudahab K, Goater RJE, Fedosejev A, Bhai J, et al.** Microreact: visualizing and sharing data for genomic epidemiology and phylogeography. *Microb Genom*;2. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1099/mgen.0.000093.
  51. **Beghain J, Bridier-Nahmias A, Nagard H Le, Denamur E, Clermont O.** ClermonTyping: An easy-to-use and accurate in silico method for *Escherichia coli* strain phylotyping. *Microb Genom*;4. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1099/mgen.0.000192.
  52. **Wirth T, Falush D, Lan R, Colles F, Mensa P, et al.** Sex and virulence in *Escherichia coli*: An evolutionary perspective. *Mol Microbiol*;60. Epub ahead of print 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x.

53. **Bortolaia V, Kaas RS, Ruppe E, Roberts MC, Schwarz S, et al.** ResFinder 4.0 for predictions of phenotypes from genotypes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*;75. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1093/jac/dkaa345.
54. **Carattoli A, Hasman H.** PlasmidFinder and In Silico pMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). In: *Methods in Molecular Biology*. 2020. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1007/978-1-4939-9877-7\_20.
55. **Martiny HM, Pyrounakis N, Petersen TN, Lukjančenko O, Aarestrup FM, et al.** ARGprofiler—a pipeline for large-scale analysis of antimicrobial resistance genes and their flanking regions in metagenomic datasets. *Bioinformatics*;40. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.1093/bioinformatics/btae086.
56. **Paganini JA, Kerkvliet JJ, Vader L, Plantinga NL, Meneses R, et al.** PlasmidEC and gplas2: an optimized short-read approach to predict and reconstruct antibiotic resistance plasmids in *Escherichia coli*. *Microb Genom*;10. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.1099/mgen.0.001193.
57. **Schwengers O, Barth P, Falgenhauer L, Hain T, Chakraborty T, et al.** Platon: Identification and characterization of bacterial plasmid contigs in short-read draft assemblies exploiting protein sequence-based replicon distribution scores. *Microb Genom*;6. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1099/mgen.0.000398.
58. **van der Graaf-Van Bloois L, Wagenaar JA, Zomer AL.** RFPlasmid: predicting plasmid sequences from short-read assembly data using machine learning. *Microb Genom*;7. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1099/mgen.0.000683.
59. **Kim D, Song L, Breitwieser FP, Salzberg SL.** Centrifuge: Rapid and sensitive classification of metagenomic sequences. *Genome Res*;26. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1101/gr.210641.116.
60. **Robertson J, Nash JHE.** MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microb Genom*;4. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1099/mgen.0.000206.
61. **Robertson J, Bessonov K, Schonfeld J, Nash JHE.** Universal whole-sequence-based plasmid typing and its utility to prediction of host range and epidemiological surveillance. *Microb Genom*;6. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1099/mgen.0.000435.
62. **Paganini JA, Plantinga NL, Arredondo-alonso S, Willems RJL, Schürch AC.** Recovering *Escherichia coli* plasmids in the absence of long-read sequencing data. *Microorganisms*;9. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3390/microorganisms9081613.
63. **Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE.** Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol*;13. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005595.
64. **Gillieatt BF, Coleman N V.** Unravelling the mechanisms of antibiotic and heavy metal resistance co-selection in environmental bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 2024;fuae017.
65. **Méric G, Hitchings MD, Pascoe B, Sheppard SK.** From *Escherich* to the *Escherichia coli* genome. *The Lancet Infectious Diseases*;16. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1016/S1473-3099(16)30066-4.

66. **Jiang J, Ma S, Chen S, Schwarz S, Cao Y, et al.** Low prevalence of colistin-resistant *Escherichia coli* from companion animals, China, 2018–2021. *One Health Advances*;1. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1186/s44280-023-00015-x.
67. **Reid CJ, Wyrsh ER, Chowdhury PR, Zingali T, Liu M, et al.** Porcine commensal *Escherichia coli*: A reservoir for class 1 integrons associated with IS26. *Microb Genom*;3. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1099/mgen.0.000143.
68. **Zingali T, Reid CJ, Chapman TA, Gaio D, Liu M, et al.** Whole genome sequencing analysis of porcine faecal commensal *Escherichia coli* carrying class 1 integrons from sows and their offspring. *Microorganisms*;8. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3390/microorganisms8060843.
69. **García V, Gambino M, Pedersen K, Haugegaard S, Olsen JE, et al.** F4- and F18-Positive Enterotoxigenic *Escherichia coli* Isolates from Diarrhea of Postweaning Pigs: Genomic Characterization. *Appl Environ Microbiol*;86. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1128/AEM.01913-20.
70. **Robertson J, Schonfeld J, Bessonov K, Bastedo P, Nash JHE.** A global survey of *Salmonella* plasmids and their associations with antimicrobial resistance. *Microb Genom*;9. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1099/mgen.0.001002.
71. **Lay KK, Chansong N, Chuanchuen R.** Plasmid profiles of multidrug-resistant *Escherichia coli* from clinically healthy swine. *Thai Journal of Veterinary Medicine*;42. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.56808/2985-1130.2388.
72. **Sanderson H, McCarthy MC, Nnajide CR, Sparrow J, Rubin JE, et al.** Identification of plasmids in avian-associated *Escherichia coli* using nanopore and illumina sequencing. *BMC Genomics*;24. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1186/s12864-023-09784-6.
73. **Magiorakos A-P, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, et al.** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012;18:268–281.
74. **Trongjit S, Chuanchuen R.** Whole genome sequencing and characteristics of *Escherichia coli* with coexistence of ESBL and *mcr* genes from pigs. *PLoS One*;16. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1371/journal.pone.0260011.
75. **Hu YY, Cai JC, Zhou HW, Chi D, Zhang XF, et al.** Molecular typing of CTX-M-Producing *Escherichia coli* isolates from environmental water, swine feces, specimens from healthy humans, and human patients. *Appl Environ Microbiol*;79. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1128/AEM.01740-13.
76. **Liao XP, Xia J, Yang L, Li L, Sun J, et al.** Characterization of CTX-M-14-producing *Escherichia coli* from food-producing animals. *Front Microbiol*;6. Epub ahead of print 2015. DOI: 10.3389/fmicb.2015.01136.
77. **Rodrigues C, Machado E, Peixe L, Novais Â.** IncI1/ST3 and IncN/ST1 plasmids drive the spread of blaTEM-52 and blaCTX-M-1/-32 in diverse *Escherichia coli* clones from different piggeries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*;68. Epub ahead of print 2013. DOI: 10.1093/jac/dkt187.

78. **Hayer SS, Casanova-Higes A, Paladino E, Elnekave E, Nault A, et al.** Global Distribution of Extended Spectrum Cephalosporin and Carbapenem Resistance and Associated Resistance Markers in Escherichia coli of Swine Origin – A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Microbiol*;13. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.853810.
79. **Ghosh H, Doijad S, Falgenhauer L, Fritzenwanker M, Imirzalioglu C, et al.** BlaCTX-M-27– Encoding escherichia coli sequence type 131 lineage c1-m27 clone in clinical Isolates, Germany. *Emerging Infectious Diseases*;23. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.3201/eid2310.170938.
80. **Nirupama KR, Vinodh VK, Pruthvishree BS, Sinha DK, Murugan MS, et al.** Molecular characterisation of blaOXA-48 carbapenemase-, extended-spectrum  $\beta$ -lactamase- and Shiga toxin-producing Escherichia coli isolated from farm piglets in India. *J Glob Antimicrob Resist*;13. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.01.007.
81. **Diaconu EL, Carfora V, Alba P, Di Matteo P, Stravino F, et al.** Novel IncFII plasmid harbouring blaNDM-4 in a carbapenem-resistant Escherichia coli of pig origin, Italy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*;75. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1093/jac/dkaa374.
82. **Zhao Z, Liao C, Chang S, Ding K, Liu Z, et al.** NDM-1-producing Escherichia coli isolated from pigs induces persistent infection with limited pathogenicity. *Microb Pathog* 2019;135:103620.
83. **Lu X, Du Y, Peng K, Zhang W, Li J, et al.** Coexistence of tet(X4),mcr-1, and blaNDM-5 in ST6775Escherichia coli Isolates of Animal Origin in China. *Microbiol Spectr* 2022;10:e00196-22.
84. **Lima T, Fernandes L, Matias M, Mateus A, Silveira E, et al.** Longitudinal Study Detects the Co-Carriage of ESBL and mcr-1 and -4 Genes in Escherichia coli Strains in a Portuguese Farrow-to-Finish Swine Herd. *Animals*;12. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/ani12172209.
85. **Carretto E, Brovarone F, Nardini P, Russello G, Barbarini D, et al.** Detection of mcr-4 positive Salmonella enterica serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, october to November 2016. *Eurosurveillance*;23. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821.
86. **Carattoli A.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*;53. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.1128/AAC.01707-08.
87. **Magieros L, Méric G, Bayliss SC, Pensar J, Pascoe B, et al.** Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian Escherichia coli. *Nat Commun*;12. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1038/s41467-021-20988-w.
88. **Chandrangsu P, Rensing C, Helmann JD.** Metal homeostasis and resistance in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*;15. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2017.15.
89. **Peng S, Zheng H, Herrero-Fresno A, Olsen JE, Dalsgaard A, et al.** Co-occurrence of antimicrobial and metal resistance genes in pig feces and agricultural fields fertilized with slurry. *Science of the Total Environment*;792. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2021.148259.

90. **Liu C, Li G, Qin X, Xu Y, Wang J, et al.** Profiles of antibiotic- and heavy metal-related resistance genes in animal manure revealed using a metagenomic analysis. *Ecotoxicol Environ Saf* 2022;239:113655.
91. **Peng S, Zhang H, Song D, Chen H, Lin X, et al.** Distribution of antibiotic, heavy metals and antibiotic resistance genes in livestock and poultry feces from different scale of farms in Ningxia, China. *J Hazard Mater* 2022;440:129719.
92. **Li LG, Xia Y, Zhang T.** Co-occurrence of antibiotic and metal resistance genes revealed in complete genome collection. *ISME Journal*;11. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.1038/ismej.2016.155.
93. **Pajarillo EAB, Lee E, Kang DK.** Trace metals and animal health: Interplay of the gut microbiota with iron, manganese, zinc, and copper. *Animal Nutrition*;7. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1016/j.aninu.2021.03.005.
94. **Kim M, Cho JH, Seong PN, Jung H, Jeong JY, et al.** Fecal microbiome shifts by different forms of copper supplementations in growing pigs. *J Anim Sci Technol*;63. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.5187/jast.2021.e118.
95. **Sanjuán JMO, Manzanilla EG, Cabrera-Rubio R, Crispie F, Cotter PD, et al.** Using Shotgun Sequencing to Describe the Changes Induced by In-Feed Zinc Oxide and Apramycin in the Microbiomes of Pigs One Week Postweaning. *Microbiol Spectr* 2022;10:e01597-22.
96. **Holman DB, Gzyl KE, Mou KT, Allen HK.** Weaning Age and Its Effect on the Development of the Swine Gut Microbiome and Resistome. *mSystems*;6. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1128/msystems.00682-21.
97. **Ekhlas D, Argüello H, Leonard FC, Manzanilla EG, Burgess CM.** Insights on the effects of antimicrobial and heavy metal usage on the antimicrobial resistance profiles of pigs based on culture-independent studies. *Vet Res* 2023;54:14.
98. **Chen X, Yin H, Li G, Wang W, Wong PK, et al.** Antibiotic-resistance gene transfer in antibiotic-resistance bacteria under different light irradiation: Implications from oxidative stress and gene expression. *Water Res*;149. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.watres.2018.11.019.
99. **Liu W, Xu Y, Slaveykova VI.** Oxidative stress induced by sub-lethal exposure to copper as a mediator in development of bacterial resistance to antibiotics. *Science of The Total Environment* 2023;860:160516.
100. **Ekhlas D, Sanjuán JMO, Manzanilla EG, Leonard FC, Argüello H, et al.** Comparison of antimicrobial resistant Escherichia coli isolated from Irish commercial pig farms with and without zinc oxide and antimicrobial usage. *Gut Pathog* 2023;15:8.
101. **Souza SSR, Turcotte MR, Li J, Zhang X, Wolfe KL, et al.** Population analysis of heavy metal and biocide resistance genes in Salmonella enterica from human clinical cases in New Hampshire, United States. *Front Microbiol*;13. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3389/fmicb.2022.983083.
102. **Miltgen G, Martak D, Valot B, Kamus L, Garrigos T, et al.** One Health compartmental analysis of ESBL-producing Escherichia coli on Reunion Island reveals partitioning between

- humans and livestock. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*;77. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1093/jac/dkac054.
103. **Matlock W, Lipworth S, Chau KK, Oun MA, Barker L, et al.** Enterobacterales plasmid sharing amongst human bloodstream infections, livestock, wastewater, and waterway niches in Oxfordshire, UK. *Elife*;12. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.7554/elife.85302.
  104. **Shaw LP, Chau KK, Kavanagh J, AbuOun M, Stubberfield E, et al.** Niche and local geography shape the pangenome of wastewater-and livestock-associated Enterobacteriaceae. *Sci Adv*;7. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1126/SCIADV.ABE3868.
  105. **Mahmud B, Wallace MA, Reske KA, Alvarado K, Muenks CE, et al.** Epidemiology of Plasmid Lineages Mediating the Spread of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among Clinical *Escherichia coli*. *mSystems*;7. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1128/msystems.00519-22.
  106. **Lipworth S, Matlock W, Shaw L, Vihta KD, Rodger G, et al.** The plasmidome associated with Gram-negative bloodstream infections: A large-scale observational study using complete plasmid assemblies. *Nat Commun*;15. Epub ahead of print 2024. DOI: 10.1038/s41467-024-45761-7.
  107. **Cao YP, Lin QQ, He WY, Wang J, Yi MY, et al.** Co-selection may explain the unexpectedly high prevalence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a Chinese broiler farm. *Zoological Research*;41. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.24272/J.ISSN.2095-8137.2020.131.
  108. **Ogunlana L, Shaw L, Kaur D, Jangir P, Walsh T, et al.** Regulatory fine-tuning and horizontal gene transfer stabilize mobile colistin resistance. *bioRxiv*. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1101/2022.11.04.515217.
  109. **Vrancianu CO, Popa LI, Bleotu C, Chifiriuc MC.** Targeting Plasmids to Limit Acquisition and Transmission of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in Microbiology*;11. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00761.
  110. **Rahman A, Rahman A, Bhuiyan OF, Bhuiyan OF, Sadique A, et al.** Whole genome sequencing provides genomic insights into three *Morganella morganii* strains isolated from bovine rectal swabs in Dhaka, Bangladesh. *FEMS Microbiol Lett*;367. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1093/femsle/fnaa043.
  111. **Carattoli A, Villa L, Feudi C, Curcio L, Orsini S, et al.** Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*;22. Epub ahead of print 2017. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589.
  112. **Mengistu TS, Garcias B, Castellanos G, Seminati C, Molina-López RA, et al.** Occurrence of multidrug resistant Gram-negative bacteria and resistance genes in semi-aquatic wildlife - *Trachemys scripta*, *Neovison vison* and *Lutra lutra* - as sentinels of environmental health. *Science of the Total Environment*;830. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2022.154814.
  113. **Walas N, Slown S, Amato HK, Lloyd T, Bender M, et al.** The role of plasmids in carbapenem resistant *E. coli* in Alameda County, California. *BMC Microbiol*;23. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1186/s12866-023-02900-2.

114. **Chen Z, Erickson DL, Meng J.** Benchmarking hybrid assembly approaches for genomic analyses of bacterial pathogens using Illumina and Oxford Nanopore sequencing. *BMC Genomics*;21. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.1186/s12864-020-07041-8.





**Estudi 4: Global Variation in *Escherichia coli mcr-1* Genes and Plasmids from Animal and Human Genomes Following Colistin Usage Restrictions in Livestock**

*Antibiotics* **2024**, *13*(8), 759; <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080759>

Aquest article disposa de material suplementari que pot ser descarregat a <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics13080759/s1>.



## Article

# Global Variation in *Escherichia coli* *mcr-1* Genes and Plasmids from Animal and Human Genomes Following Colistin Usage Restrictions in Livestock

Biel Garcias <sup>1,\*</sup>, Mayra Alejandra Flores <sup>1</sup>, Mercedes Fernández <sup>1</sup>, William Monteith <sup>2</sup> , Ben Pascoe <sup>2</sup> , Samuel K. Sheppard <sup>2</sup> , Marga Martín <sup>1</sup> , Martí Cortey <sup>1</sup>  and Laila Darwich <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> Department Sanitat i Anatomia Animals, Veterinary Faculty, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>2</sup> Department of Biology, University of Oxford, South Parks Road, Oxford OX1 3RE, UK

\* Correspondence: biel.garcias@uab.cat (B.G.); laila.darwich@uab.cat (L.D.)

**Abstract:** Antimicrobial resistance (AMR) is a significant global health threat, with multidrug-resistant (MDR) bacterial clones becoming a major concern. Polymyxins, especially colistin, have reemerged as last-resort treatments for MDR Gram-negative infections. However, colistin use in livestock has spread mobile colistin resistance (*mcr*) genes, notably *mcr-1*, impacting human health. In consequence, its livestock use was banned in 2017, originating a natural experiment to study bacterial adaptation. The aim of this work was to analyse the changes in the *mcr-1* genetic background after colistin restriction across the world. This study analyses 3163 *Escherichia coli* genomes with the *mcr-1* gene from human and livestock hosts, mainly from Asia ( $n = 2621$ ) and Europe ( $n = 359$ ). Genetic characterisation identifies IncI2 (40.4%), IncX4 (26.7%), and multidrug-resistant IncHI2 (18.8%) as the most common plasmids carrying *mcr-1*. There were differences in plasmids between continents, with IncX4 (56.6%) being the most common in Europe, while IncI2 (44.8%) was predominant in Asia. Promoter variants related to reduced fitness costs and IS*Apl1* showed a distinct pattern of association that appears to be associated with adaptation to colistin restriction, which differed between continents. Thus, after the colistin ban, Europe saw a shift to specialised *mcr-1* plasmids as IncX4, while IS*Apl1* decreased in Asia due to changes in the prevalence of the distinct promoter variants. These analyses illustrate the evolution of *mcr-1* adaptation following colistin use restrictions and the need for region-specific strategies against AMR following colistin restrictions.

**Keywords:** antimicrobial resistance; colistin; *mcr-1*; IS*Apl1*; promoter variants; fitness cost; *Escherichia coli*



**Citation:** Garcias, B.; Flores, M.A.; Fernández, M.; Monteith, W.; Pascoe, B.; Sheppard, S.K.; Martín, M.; Cortey, M.; Darwich, L. Global Variation in *Escherichia coli* *mcr-1* Genes and Plasmids from Animal and Human Genomes Following Colistin Usage Restrictions in Livestock. *Antibiotics* **2024**, *13*, 759. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080759>

Academic Editor: Juhee Ahn

Received: 24 July 2024

Revised: 9 August 2024

Accepted: 10 August 2024

Published: 12 August 2024



**Copyright:** © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) has become one of the greatest threats to global public health, responsible for an estimated 1.27 million annual deaths [1]. Emerging multidrug-resistant (MDR) bacterial clones are becoming more frequent, and the treatment options available for this type of infection are limited. This has resulted in the use of some antibiotics, such as polymyxins, that were previously excluded due to side effects [2].

Polymyxins, including colistin (polymyxin E), are antibiotics that disrupt bacterial membranes, causing cellular death [3]. Initially discovered in 1947 as a byproduct of *Paenibacillus polymyxa* subsp. *colistinus*, colistin's use in human medicine was limited due to renal and neurological side effects [4,5]. It was primarily restricted to ophthalmic and topical applications [6]. However, the rise of MDR Gram-negative bacterial infections has revived colistin's use as a last-resort treatment [2]. Colistin is also extensively used in livestock for therapeutic and prophylactic purposes [7]. Initially, the threat to human health from livestock use was underestimated, as resistance was believed to arise from chromosomal mutations [8], and transmission from livestock was considered rare. However,

the discovery of mobile colistin resistance (*mcr*) genes in 2015 revealed the potential for gene transmission from livestock to humans [9].

Consequently, the agricultural use of colistin was heavily restricted in China and Europe in 2016 [10,11], and this has led to a decline in the use of colistin in livestock farming. Spain is a great example of this since colistin sales passed from 51.09 mg/PCU (livestock Population Correction Unit) in 2015 to 9 mg/PCU in 2017 and to the current 0.4 mg/PCU [12]. This has mitigated the spread of isolates carrying the *mcr-1* gene [13,14], which is expected given the high fitness costs associated with the carriage of the gene in *Enterobacteriaceae* [15]. However, recent evidence [16] points to the emergence of variants with reduced fitness costs while maintaining resistance rates, achieved by lowering gene expression. These findings suggest that restricting the use of colistin alone will not be sufficient to eliminate resistant strains, and additional control methods are needed.

Therefore, exploring alternative ways to mitigate the impact of the spread of *mcr-1* genes (and associated AMR) is necessary. Understanding the genetic background of *mcr-1* is important to identify different transmission routes. Initially mobilised from *Moraxella* spp. chromosomal sequences by the insertion sequence IS*Apl1* to *Enterobacteriaceae* strains [17,18], *mcr-1*-carrying isolates have lost the IS*Apl1* insertion sequence and relied on plasmids for transmission [19,20]. IncI2, IncX4, and IncHI2 plasmids most often carry *mcr-1* genes [19,21–23]. Furthermore, despite evidence of regional differences in *mcr-1* plasmid epidemiology [24], studies following recent restrictions on colistin use have been confined to isolates of Chinese origin [25]. However, these studies have typically only investigated isolates from human infections [19,21], and it is important to include isolates from agricultural livestock animals as a likely gene pool reservoir [26].

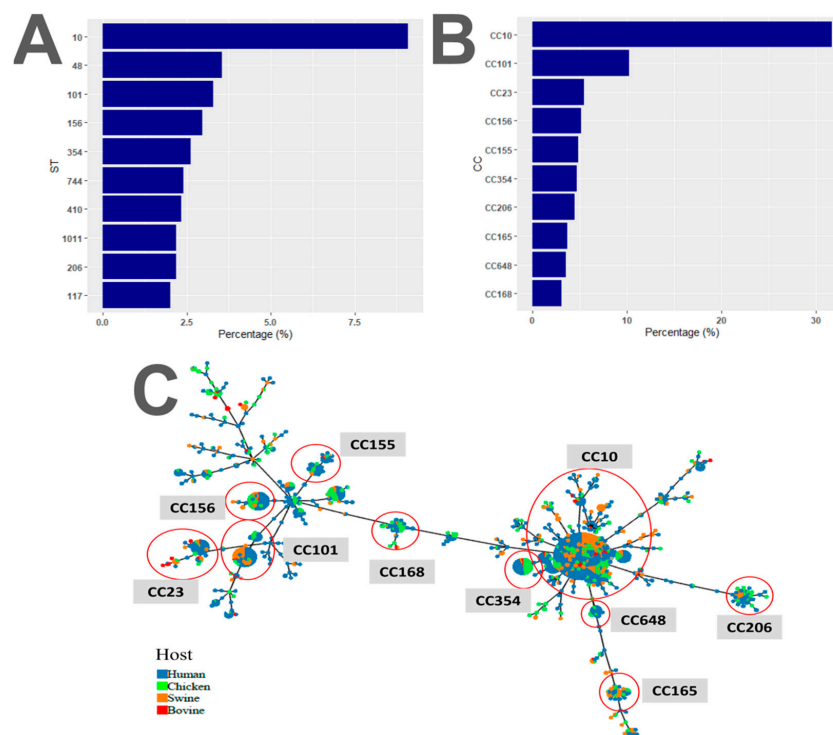
In this study, we compared plasmid epidemiology and the genetic background of *mcr-1* genes from different geographical locations and sources (humans and livestock), analysing the adaptations that followed colistin restriction. Using an archived public dataset of 3163 *mcr-1*-positive *E. coli* genomes from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) Pathogen Detection platform (accessed on 26 February 2023), we characterise the genomic context of *mcr-1* genes.

## 2. Results

### 2.1. *mcr-1*-Positive *E. coli* Are Globally Distributed in Humans and Livestock

We compiled a dataset of 3163 *E. coli* genomes containing *mcr-1* genes that were isolated from human infections and livestock hosts, with accompanying information on the country of origin and collection date. Most of the isolates were of human origin (58%,  $n = 1833$ ), followed by those from poultry (22.1%,  $n = 698$ ), swine (17.8%,  $n = 562$ ) and cattle (2.2%,  $n = 70$ ) (Figure S1A). Geographically, most of the genomes came from Asia (82.9%,  $n = 2621$ ), with most isolates collected in China (59.6%,  $n = 1885$ ). Europe also contributed 11.3% of the samples ( $n = 359$ ) (Figure S1B). The temporal distribution of the genomes spans the years 2015 to 2019 (Figure S1C), encompassing the period around the introduction of restrictions on colistin use.

The resistome of each isolate was characterised *in silico*, revealing an average of 13.6 AMR genes per isolate. The distribution of these genes displayed a bimodal pattern, with most genomes carrying around 14 AMR genes and isolates with just two AMR genes (Figure S1D). Most isolates were categorised as MDR, showing putative resistance to three or more antimicrobial classes [27]. *E. coli* isolates carrying the *mcr-1* gene were also typed according to their MLST genes and designated sequence types (STs) (Supplementary Table S3). The globally distributed ST10 was most frequently identified (9.1%,  $n = 295$ ), followed by ST48 (3.6%,  $n = 115$ ), ST101 (3.3%,  $n = 107$ ) and ST156 (3%,  $n = 96$ ) (Figure 1A). Isolates with similar STs can be grouped into clonal complexes (Supplementary Table S4), where CC10 was the most common one (31.6%,  $n = 591$ ), followed by CC101 (10.3%,  $n = 192$ ), CC23 (5.5%,  $n = 102$ ) and CC156 (5.1%,  $n = 96$ ) (Figure 1B). Finally, it was shown that STs were distributed among all the species, showing no host specialisation (Figure 1C).



**Figure 1.** Population structure of genomes inferred to contain the *mcr-1* gene shows no host specialisation. (A,B) Bar plots showing the ten most common sequence types (ST) (A) and clonal complexes (CC) (B). (C) Minimum spanning tree showing ST distribution between hosts. The ten most common CCs are highlighted with a red circle. Host origin: human (in blue), chicken (in green), swine (in orange) and bovine (in red).

## 2.2. *Incl2* and *IncX4* Are Specialized for *mcr-1* While *IncHI2* Is a MDR

In the majority of isolates, *mcr-1* genes were inferred to be located on plasmids (93.5%). This was similar for all studied hosts, with the greatest discrepancy in isolates sampled from swine, where 10% of *mcr-1* genes were identified on chromosomal contigs, compared to <5% in other hosts. Also, it is interesting to note that 10% of bovine isolates contained two plasmids carrying *mcr-1* (Figure S2).

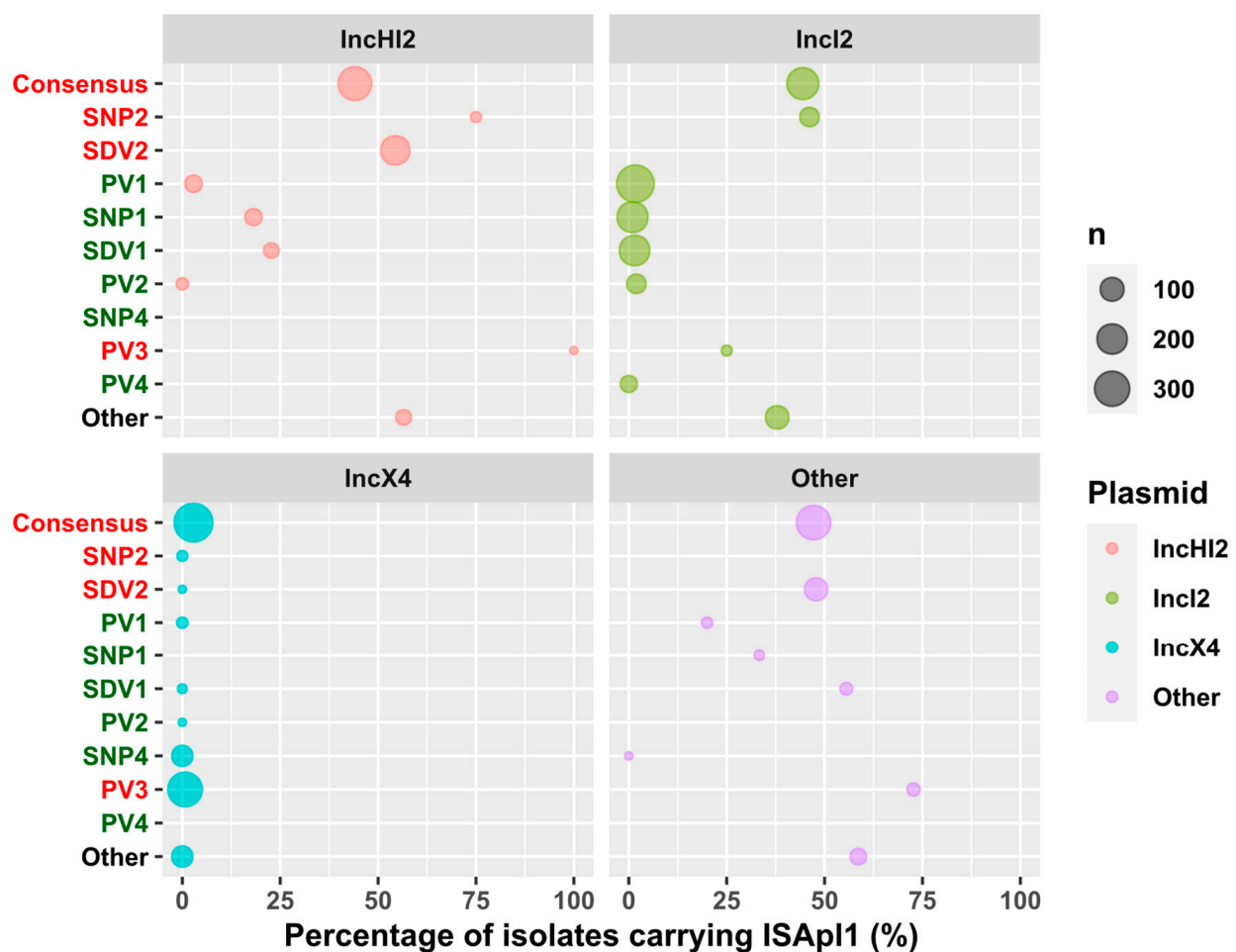
For a thorough understanding of genetic context, plasmids containing the *mcr-1* gene were typed (Table 1). *Incl2* (40.4%,  $n = 1231$ ), *IncX4* (26.7%,  $n = 813$ ) and *IncHI2* (18.8%,  $n = 574$ ) were the most common plasmids, and the rest of the replicon types were present in a frequency under 5%. Differences in AMR gene carriage were observed between the distinct plasmid incompatibility groups. Specifically, there were two *mcr-1* carriage types. First, *mcr-1* presence in a large plasmid, such as *IncHI2*, that contains multiple other AMR genes (an average of 15 AMR genes). Second, the presence in plasmids specialised for *mcr-1* carriage, such as *Incl2* or *IncX4*, which rarely contain other AMR genes.

**Table 1.** Frequency of the distinct plasmid types and the carriage of other antimicrobial resistance genes.

Incompatibility Group	Number of Plasmids (%)	Mean Number of AMR Genes in the Plasmid	Mean Number of AMR Genes in the Whole Genome
<i>Incl2</i>	1231 (40.4)	1.3	13.3
<i>IncX4</i>	813 (26.7)	1.5	11.4
<i>IncHI2</i>	574 (18.8)	14.6	18.1
p0111	151 (5)	4	14.3
<i>IncHI1</i>	69 (2.3)	7	12
<i>IncP1</i>	62 (2.0)	1.7	11.3
<i>IncB/O/K/Z</i>	9 (0.3)	3.4	9.7
<i>IncN</i>	8 (0.3)	10	15.5
<i>IncFIA(HII)</i>	8 (0.3)	7.4	15.2
<i>IncX3</i>	5 (0.2)	2.8	21.4
Not Determined	102 (3.34)	4.9	12.4

### 2.3. *mcr-1* Promoter Variants Are Associated with Specific Plasmids and Insertion Elements

We screened isolates for the presence of IS*Apl1* insertion sequences and catalogued their promoter and plasmid types (Figure 2). The presence of IS*Apl1* insertion sequences differed between plasmid types. Its presence statistically varied among the distinct plasmids ( $p < 0.001$ ), being relatively common in IncHI2 (248/574, 42.9%) and IncI2 plasmids (173/1231, 14.1%), and rare in IncX4 plasmids (13/800, 1.6%). Nearly half of the remaining plasmid types contained an IS*Apl1* insertion sequence (48.4%). Promoter variants also differed between each plasmid type ( $p < 0.001$ ). Wildtype ( $n = 383$ ) and PV3 ( $n = 280$ ) promoter variants were most common in IncX4 plasmids. Two subtypes of IncI2 plasmids were observed. The first was strongly associated with the presence of the IS*Apl1* insertion sequence and two different *mcr-1* promoter variants. The second IncI2 subtype included multiple other *mcr-1* promoter variants, including PV1 (1.7%,  $n = 353$ ), PV2 (2%,  $n = 51$ ), PV4 (0%,  $n = 32$ ), SDV1 (1.5%,  $n = 204$ ) or SNP1 (0.9%,  $n = 210$ ) and rarely contained IS*Apl1* insertion sequences. Plasmids containing IS*Apl1* insertion sequences often had the consensus (44.1%,  $n = 268$ ), SDV2 (54.4%,  $n = 182$ ) or SNP2 (75%,  $n = 4$ ) *mcr-1* promoter variant. However, regarding the variants not associated with IS*Apl1*, the trend was softer than for IncI2. While the loss was clear for PV1 (2.9%,  $n = 35$ ), the levels were intermediate for other variants stated to not be associated with IS*Apl1* in the case of IncI2 such as SDV1 (22.7%,  $n = 22$ ) and SNP1 (18.2%,  $n = 33$ ). Finally, the rest of the plasmids followed a similar path to IncHI2, showing that *mcr-1* specialisation could have an effect on the adaptation pathways.



**Figure 2.** Association of the distinct plasmid types with promoter variants and inferred IS*Apl1* carriage. Strongly IS*Apl1*-associated variants (more than 40%) are highlighted in red, while those low associated (less than 5%) are in green. The size of the circle is directly proportional to the number of isolates of each category.

#### 2.4. IncI2 and IncX4 Plasmids Predominate in Asia and Europe, Respectively

We compared isolate genomes from Asia and Europe and identified differences in the prevalence of plasmid incompatibility groups between continents (Figure 3). In Asia, the most common plasmid type was IncI2 (1130/2524, 44.8%), and IncX4 plasmids (196/346, 56.6%) were most common in Europe. However, there was some difference in plasmid prevalence between countries. In Asia, greater variation in plasmid types was observed in Thailand, Laos and Vietnam. There was greater consistency in plasmid types identified in European countries, although IncHI2 was the most common plasmid type in France (28/51, 54.9%) instead of IncX4.



**Figure 3.** Global map of frequency of plasmid incompatibility (Inc) groups. Bar plots show the frequency of plasmid Inc groups of the different continents split by the isolate host source. Pie chart diameter is proportional to genome number per country. Colours represent IncHI2 (blue), IncI2 (yellow), IncX4 (purple), and other plasmids (red).

Colistin is still used in livestock farming in Laos and Vietnam, and plasmid types identified in these countries differed compared to the rest of the world. IncHI1 (13/72, 18.1%) was detected in Laos and IncP1 (16/61, 26.2%) and p0111 (11/61, 18.03%) in Vietnam. Thailand, and with a smaller sample Lebanon (42/68, 61.8%), demonstrated similar plasmid profiles to Europe, with a preponderance of IncX4 type plasmids (129/246, 52.4%). Despite small sample sizes from other regions of the world, plasmid type prevalence resembled Asian isolates; for example, in South America, IncI2 was the most common plasmid type (49.6%), with Brazil being similar to Lebanon and Thailand, with a greater proportion of IncX4 plasmids (30/37, 81.1%). Finally, few isolates from North America and Oceania were available to include in the study and few conclusions can be drawn.

Plasmid promoter variants also differed in prevalence between continents and countries (Supplementary Figure S3). IncX4 plasmid types with the consensus variant were common in Europe (56.7%,  $n = 111$ ), while the PV3 promoter variant was most prevalent in Asia (especially in China) IncX4 plasmids (48.1%,  $n = 270$ ) (Supplementary Figure S4). A new promoter variant (SNP4) was dominant in Eastern Europe (Czech Republic and Poland). Finally, in Thailand, Lebanon and Brazil, where IncX4 plasmids were the most common, the same association with the consensus variant was found, which makes them very close to Europe despite the geographic separation.

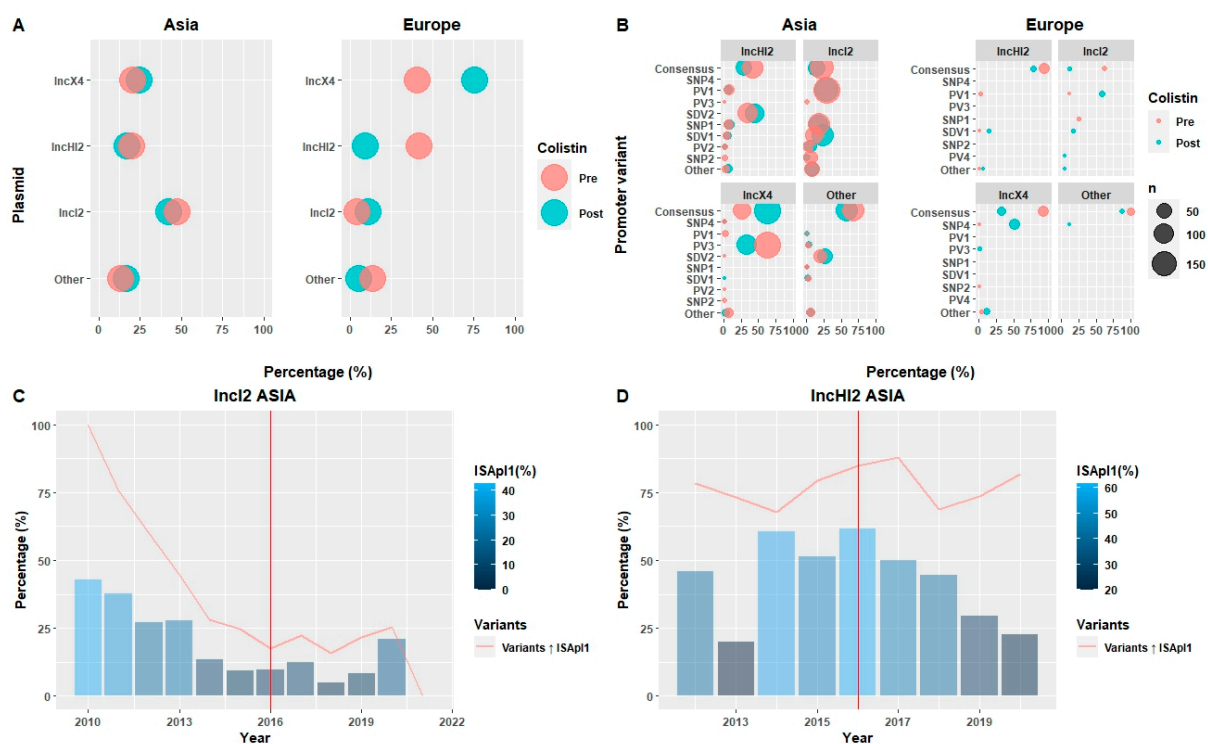
Greater heterogeneity was observed globally for IncI2 plasmids (Figure S5). The most common promoter variants were PV1 (28.7%,  $n = 327$ ), the consensus variant (18.9%,  $n = 215$ ), SNP1 (18.1%,  $n = 205$ ) and SDV1 (17.3%,  $n = 195$ ). The greatest heterogeneity was



observed among Chinese genomes, which also had the largest sample size with 898 isolates carrying *mcr-1* in an IncI2 plasmid. Some promoter variants were specifically associated with geographic regions, such as PV1 in Russia, SDV2 in Pakistan, PV4 in South America and PV2 in Lebanon. In IncHI2 plasmids, the consensus variant was the most common promoter variant worldwide (Supplementary Figure S6).

### 2.5. Different Genome Adaptations Occur Following Withdrawal of Colistin in Europe and Asia

Colistin was restricted for agricultural livestock prophylaxis by most countries in 2017. Comparing the frequency of plasmid types and promoter variants revealed different adaptations to colistin restriction between continents. In Europe, the adaptation was associated with a replacement of the MDR plasmid IncHI2 with the *mcr-1* specialised IncX4 and the consensus variant by SNP4 (Figure 4A,B). In contrast, for most plasmid types identified in Asia, promoter variants remained stable, with the exception being IncX4 plasmids, where the PV3 promoter variant has been replaced by the consensus variant, in contrast with a previous study focused on China [16]. Thus, Chinese isolates ( $n = 1885$ ) were further studied, promoter stability was found (Figure S7), and it was concluded that the variability was due to the overrepresentation of Thai isolates after colistin withdrawal.



**Figure 4.** Distinct adaptation of *mcr-1* genomic context following colistin restriction in Asia and Europe. (A,B) promoter variant frequency comparison before and after the colistin ban in Asia and Europe. The size of the circle is proportional to the number of isolates of each category. (C) The percentage of IncI2 Asian isolates from 2010 to 2021 in which *ISApI1* is conserved compared to the frequency of variants associated with *ISApI1* (red line). (D) The percentage of IncHI2 isolates in Asia in which *ISApI1* is conserved from 2012 to 2020 compared to the frequency of variants associated with *ISApI1* (red line). The vertical red line marks the colistin restriction.

Among the most common adaptations among isolates from Asia, consistent with other reports [28], was the loss of *ISApI1* insertion sequences in IncI2 and IncHI2 plasmids (Figure S8). This potentially leads to reduced bacterial fitness costs for plasmid carriage, facilitating the spread of *mcr-1*. While many IncI2 plasmids retained their *ISApI1* sequences before and after control measures, IncHI2 plasmid architecture changed, equalising all promoter variant levels. The *ISApI1* loss strategy differed; in IncI2, *ISApI1* loss was related

to the replacement of associated variants (described above) around 2014, before the colistin ban. For IncHI2, IS*Apl1* loss began after the colistin restriction but was not tied to a decline in associated variants, remaining stable over the years (Figures 4C,D and S9).

### 3. Discussion

The colistin resistance gene *mcr-1* was discovered in China in 2015 [9], and most research on its genomic epidemiology has been conducted there [19,21,25]. However, *mcr-1* has since been detected worldwide [20,29–31]. Using the growing number of genomes available in the NCBI Pathogen Detection platform, this study aimed to analyse the genomic context of *mcr-1* across different hosts and regions globally following the restriction of colistin use.

Most sequences in our study came from Asia, but we also had a significant sample from Europe, allowing for meaningful comparisons and insights into the European situation. However, samples from North America and Oceania were scarce despite the availability of numerous *E. coli* genomes in the NCBI. This scarcity may be attributed to colistin never being registered for animal use in these regions [32], and metagenomic analyses indicate that the *mcr* gene present in these areas is *mcr-9*, which is not associated with colistin resistance [33]. Similarly, sample sizes from South America and Africa were insufficient to draw robust conclusions.

There was no evidence of host segregation in the distribution of clones. The niche overlap of *mcr-1* clones is consistent with a shared gene pool for AMR genes and emphasises the importance of including livestock in surveillance efforts. Although we had substantial samples from humans, swine, and chickens, fewer genomes were available from bovines, likely due to a lower prevalence of the *mcr-1* gene in these animals [34–36].

The *mcr-1* gene was predominantly found on plasmids. Chromosomal *mcr-1* is linked with higher resistance and fitness [16], but its frequency suggests either recent emergence or other limitations on proliferation. Globally, the most common plasmids were IncI2, IncX4, and IncHI2, consistent with previous studies [24,37]. In countries like Laos and Vietnam, where colistin use in livestock remains widespread [38,39], other plasmids such as IncP1, p0111, and IncHI1 were more predominant, indicating lower specialisation in the three main plasmids under colistin selection pressure.

The colistin ban has led to a decrease in IS*Apl1* [21,25] and the emergence of mutations in the *mcr-1* promoter region [16], reducing its fitness cost. We observed a relationship between both phenomena. IS*Apl1* presence was rare in IncX4 plasmids, as previously described [19,40]. For IncI2, two trends were observed: promoter variants associated with the presence of IS*Apl1* and those without it. The most common variant, PV1, does not confer a fitness advantage on its own, explaining its low association with IS*Apl1*, which could otherwise lead to plasmid destruction [28]. SDV1, another common variant, is linked to the loss of IS*Apl1* in IncI2 plasmids and provides a fitness benefit. This is in contrast to its increased presence of IS*Apl1* in IncHI2 plasmids. Further studies are needed to fully understand the relationship between plasmid type, promoter variants, and IS*Apl1* presence to comprehend *mcr-1* adaptations after the colistin ban since it seems that this relationship could vary according to the distinct plasmids.

Although the colistin ban has significantly reduced *mcr-1* prevalence, it has not been eliminated [25,41–44]. Antimicrobial resistance (AMR) genes typically confer a fitness cost [45], and this is true for *mcr-1* [15]. Our findings reveal differing adaptation strategies in Asia and Europe post-ban. In Europe, adaptation appears straightforward, with a shift from MDR plasmids IncHI2 to more specialised plasmids like IncX4 [24] (Figure 4A), which confer a fitness advantage [46]. The consensus variant was dominant before the colistin ban, but SNP4 became predominant post-ban, being the only variant present in 2020 and 2021. In Asia, the predominant plasmid was IncI2, a specialised *mcr-1* carrier that differs from IncX4 in its association with IS*Apl1*, as was already stated by a previous study [19]. IS*Apl1*'s loss over time was linked to a replacement of promoter variants, suggesting a summation effort to reduce fitness cost. This relationship is difficult to understand since

it is not clear how a single nucleotide mutation could be associated with the loss of an insertion sequence and requires further investigation since other factors, such as an increase in plasmid transmission, could be implicated [47]. Nevertheless, it seems that the *mcr-1* adaptation strategy to cessation of colistin use was quite different in Asia and Europe.

Despite being the largest dataset used to study global *mcr-1* genomic context and evolution, this study has limitations. It is based on genomes from a public database (NCBI), which is not a stratified sampling, and conclusions cannot be drawn from the absence of *mcr-1*-positive samples in some regions due to unequal sampling. Nonetheless, it is important to make global comparisons, given the lack of comparative studies outside of China. Furthermore, the colistin ‘ban’ has not been applied evenly between countries, from complete prohibition to cessation of prophylactic and growth-promoting but continued therapeutic use under strict conditions. By highlighting region-specific *mcr-1* adaptations, our study provides a basis for future surveillance and informed interventions.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Isolate Genomes

The Microbial Browser for Identification of Genetic and Genomic Elements (MicroBIGG-E) provides a platform to search for genomes containing specific AMR genetic determinants present within the NCBI Pathogen Detection Database (26 February 2023). We conducted a search of all *E. coli* assemblies from human, swine, chicken and bovine sources that contained the *mcr-1* gene. Genome assemblies with available information regarding the country of origin and the year of collection were downloaded, resulting in a subset of 3185 *E. coli* assemblies. Genomes uploaded to the NCBI database theoretically have already passed a quality control (QC) process. However, to ensure the quality of our assemblies, we applied an additional QC step and discarded those assemblies with N90 < 1000 and those with lengths greater or less than 3 standard deviations from the mean size, resulting in a final dataset of 3163 assemblies. This information, together with the results of the analysis and the available metadata, is presented in Supplementary Table S1.

### 4.2. Multilocus Sequence Typing and AMR Genes General Detection

*E. coli* genomes were assigned to Sequence Types (ST) with PubMLST (<https://pubmlst.org/>) (accessed on 23 November 2023) [48], using the Achtman scheme [49]. eBurst [50] was used to assign ST to Clonal Complexes and to generate a minimum spanning tree. The presence of AMR genes across the whole genome was determined using the Resfinder database [51]. A positive hit was considered when a gene had >80% nucleotide identity over >80% of the sequence length. This allowed us to assess the general AMR levels, not limited to the *mcr-1* gene.

### 4.3. Genomic Context of *mcr-1* Gene

To determine the genomic localisation of the *mcr-1* gene, genome contigs were classified as either plasmid or chromosomal using the MOB-Recon tool from MOB-Suite [52], which employs a BLAST and bash approach to reconstruct plasmid sequences. Chromosomal contigs were scanned against the Resfinder database, and if *mcr-1* was detected, it was classified as chromosomal. For contigs of plasmid origin, initial screening was conducted with the PlasmidFinder database [53], which identifies distinct plasmid incompatibility groups (Inc groups). These contigs were subsequently rescanned against the Resfinder database. If *mcr-1* was detected within a plasmid, it was classified as plasmid-borne. To understand the plasmid’s role in AMR transmission, other AMR genes present on the same plasmid were identified. If *mcr-1* was found in two plasmids, both plasmid types were recorded to reflect their presence in the dataset. Finally, if the gene was encountered in the same isolate into the chromosome and a plasmid, the location was recorded as “Plasmid/chromosome”.

ISEScan [54] was used to detect insertion sequences. The number of IS*Ap11* (IS30 family) copies was also identified, although, for clarity of the study, only the presence or absence of IS*Ap11* was reported.

Promoter variants, as identified by a previous study [16], were detected using blastn. These promoter variants are based on a *mcr-1* genomic comprehensive study [20], which identified polymorphism hotspots upstream of the *mcr-1* gene. Briefly, Ogunalana and colleagues tested the fitness cost of the wildtype promoter variant (that is, consensus variants), and we compared it with eight other different variants that were located in regions predicted to have a translation or expression effect. These zones were the Shine–Dalgarno (SD) sequence (the ribosomal binding site) and regions predicted to encode the RNA polymerase binding site (−10 and −35 boxes). Thus, nine variants were tested: consensus, four mutations in the RNA polymerase binding site (PV1, PV2, PV3 and PV4) and four mutations in the SD site (SDV1, SDV2, SDV3 and SDV4). Apart from this, eight more variants less frequent were detected in the Ogunalana’s dataset that were located in regions, theoretically, not implicated in the expression nor the fitness cost of *mcr-1* and were named SNP1, SNP2, SNP3, SNP4, SNP5, SNP6, SNP7 and SNP8. A positive hit was considered when identity and coverage were 100%. Sequences without a positive hit were manually inspected, and any new variants found were documented. We detected 21 promoter variants in addition to 16 previously identified variants (frequencies summarised in Supplementary Table S2). However, none of the newly described variants had a prevalence higher than 0.5%. To facilitate the visualisation of findings, the ten most common variants were considered, and those remaining were considered as “Others”.

#### 4.4. Data Analysis and Visualization

Data analysis was performed with R software (version 4.2) [55], and graphs were built with ggplot2 (version 3.5.1) [56]. Statistics were used to detect differences between groups using the chi-square test. Maps were created using Microreact (<https://microreact.org/>) [57]. Data and maps can be consulted here: (<https://microreact.org/project/eDrcgffHvuxVSRkbBK1Qx1b-mapamcr1>).

## 5. Conclusions

In conclusion, our study highlights the need for region-specific analyses of *mcr-1* adaptations and underscores that findings from Asia should not be generalised globally. We mapped promoter variants associated with reduced fitness costs worldwide and identified trends like the potential SNP4 emergence in Europe and the IS*Ap11* loss in Asia due to the replacement of the promoter variants. These findings warrant further investigation to fully understand *mcr-1*'s adaptation mechanisms.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/antibiotics13080759/s1>, Figure S1: Description of the general characteristics of the dataset. A: Count of isolates for each host. B: Distribution of the isolates in each continent. OC: Oceania. AF: Africa. NA: North America. SA: South America. EU: Europe. AS: Asia. C: Count of isolates for each year. D: Histogram of carrying of AMR genes. Figure S2: Comparison of the genome location of *mcr-1* gene between the different species. Figure S3: Bar plots comparing the frequency of each promoter for the three most common plasmids in each continent. Figure S4: Global map showing the frequency of promoter variant in each country for IncX4 plasmid. Figure S5: Global map showing the frequency of promoter variant in each country for IncI2 plasmid. Figure S6: Global map showing the frequency of promoter variant in each country for IncHI2 plasmid. Figure S7: Promotor variant frequency comparison between before and after colistin ban in China split by plasmid type. Figure S8: IS*Ap11* presence in Asia and Europe in the distinct plasmids. Bar plot graph showing the percentage of isolates carrying IS*Ap11* before and after colistin ban stratified by the three most common plasmids (IncHI2, IncI2 and IncX4). Figure S9: Comparison of the percentage of isolates conserving IS*Ap11* before and after colistin restriction for each promoter variant in Asia and Europe. Table S1: Raw data with all the results of the analyses and associated metadata. Table

S2: Frequency of each promoter variant. Table S3 Frequency of *E. coli* Sequence Types (ST). Table S4: Frequency of *E. coli* Clonal Complexes (CC).

**Author Contributions:** Conceptualisation, B.G., M.M. and L.D.; methodology, B.G., M.C., M.M. and L.D.; software, B.G.; validation, B.G., M.M., M.C. and L.D.; formal analysis, B.G.; investigation, B.G.; data curation, B.G., M.A.F. and M.F.; writing—original draft preparation, B.G., W.M., B.P., S.K.S., M.M. and L.D.; writing—review and editing, W.M., B.P., S.K.S., M.M. and L.D.; visualisation, B.G., W.M. and B.P.; supervision, S.K.S., M.M. and L.D.; project administration, L.D.; funding acquisition, L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** Biel Garcias was supported by the Departament de Recerca i Universitats de la Generalitat de Catalunya (FI-SDUR 2020). Mayra Alejandra Flores was a student of the Master in Zoonoses and One Health at the UAB.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are summarised in Table S1. All assemblies are available in NCBI Pathogen Detection (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>), and raw data can be consulted in Table S1.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflicts of interest.

## References

- Murray, C.J.; Ikuta, K.S.; Sharara, F.; Swetschinski, L.; Robles Aguilar, G.; Gray, A.; Han, C.; Bisignano, C.; Rao, P.; Wool, E.; et al. Global Burden of Bacterial Antimicrobial Resistance in 2019: A Systematic Analysis. *Lancet* **2022**, *399*, 629–655. [CrossRef] [PubMed]
- Dhariwal, A.K.; Tullu, M.S. Colistin: Re-Emergence of the “forgotten” Antimicrobial Agent. *J. Postgrad. Med.* **2013**, *59*, 208–215. [CrossRef] [PubMed]
- Bialvaei, A.Z.; Samadi Kafil, H. Colistin, Mechanisms and Prevalence of Resistance. *Curr. Med. Res. Opin.* **2015**, *31*, 707–721. [CrossRef] [PubMed]
- Spapen, H.; Jacobs, R.; Van Gorp, V.; Troubleyn, J.; Honoré, P.M. Renal and Neurological Side Effects of Colistin in Critically Ill Patients. *Ann. Intensive Care* **2011**, *1*, 14. [CrossRef] [PubMed]
- Kawahara, S.; Utsunomiya, C.; Ishikawa, S.; Sekiguchi, J. A New Antibiotic “colistin” Produced by Spore-Forming Soil Bacteria. *J. Antibiot.* **1950**, *3*, 457–458.
- Koch-Weser, J.; Sidel, V.W.; Federman, E.B.; Kanarek, P.; Finer, D.C.; Eaton, A.E. Adverse Effects of Sodium Colistimethate. Manifestations and Specific Reaction Rates during 317 Courses of Therapy. *Ann. Intern. Med.* **1970**, *72*, 857–868. [CrossRef] [PubMed]
- Catry, B.; Cavaleri, M.; Baptiste, K.; Grave, K.; Grein, K.; Holm, A.; Jukes, H.; Liebana, E.; Navas, A.L.; Mackay, D.; et al. Use of Colistin-Containing Products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): Development of Resistance in Animals and Possible Impact on Human and Animal Health. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 297–306. [CrossRef] [PubMed]
- Lee, J.Y.; Ko, K.S. Mutations and Expression of PmrAB and PhoPQ Related with Colistin Resistance in *Pseudomonas Aeruginosa* Clinical Isolates. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *78*, 271–276. [CrossRef] [PubMed]
- Liu, Y.Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Mechanism *mcr-1* in Animals and Human Beings in China: A Microbiological and Molecular Biological Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 161–168. [CrossRef]
- Zhao, Q.; Li, Y.; Tian, Y.; Shen, Y.; Wang, S.; Zhang, Y. Clinical Impact of Colistin Banning in Food Animal on *mcr-1*-Positive *Enterobacteriaceae* in Patients From Beijing, China, 2009–2019: A Long-Term Longitudinal Observational Study. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 826624. [CrossRef]
- Jansen, W.; van Hout, J.; Wiegel, J.; Iatridou, D.; Chantziaras, I.; De Briyne, N. Colistin Use in European Livestock: Veterinary Field Data on Trends and Perspectives for Further Reduction. *Vet. Sci.* **2022**, *9*, 650. [CrossRef]
- European Medicines Agency. *Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2022*; Thirteenth ESVAC report; Publications Office of the European Union: Luxembourg, 2023. [CrossRef]
- Miguela-Villoldo, P.; Moreno, M.A.; Rodríguez-Lázaro, D.; Gallardo, A.; Hernández, M.; Serrano, T.; Sáez, J.L.; de Frutos, C.; Agüero, M.; Quesada, A.; et al. Longitudinal Study of the *mcr-1* Gene Prevalence in Spanish Food-Producing Pigs from 1998 to 2021 and Its Relationship with the Use of Polymyxins. *Porc. Health Manag.* **2022**, *8*, 12. [CrossRef] [PubMed]
- Wang, Y.; Xu, C.; Zhang, R.; Chen, Y.; Shen, Y.; Hu, F.; Liu, D.; Lu, J.; Guo, Y.; Xia, X.; et al. Changes in Colistin Resistance and *mcr-1* Abundance in *Escherichia coli* of Animal and Human Origins Following the Ban of Colistin-Positive Additives in China: An Epidemiological Comparative Study. *Lancet Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1161–1171. [CrossRef] [PubMed]
- Yang, Q.; Li, M.; Spiller, O.B.; Andrey, D.O.; Hinchliffe, P.; Li, H.; MacLean, C.; Niumsup, P.; Powell, L.; Pritchard, M.; et al. Balancing *mcr-1* Expression and Bacterial Survival Is a Delicate Equilibrium between Essential Cellular Defence Mechanisms. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 2054. [CrossRef] [PubMed]

16. Ogunlana, L.; Kaur, D.; Shaw, L.P.; Jangir, P.; Walsh, T.; Uphoff, S.; MacLean, R.C. Regulatory Fine-Tuning of *mcr-1* Increases Bacterial Fitness and Stabilises Antibiotic Resistance in Agricultural Settings. *ISME J.* **2023**, *17*, 2058–2069. [[CrossRef](#)]
17. Li, R.; Xie, M.; Zhang, J.; Yang, Z.; Liu, L.; Liu, X.; Zheng, Z.; Chan, E.W.C.; Chen, S. Genetic Characterization of *mcr-1*-Bearing Plasmids to Depict Molecular Mechanisms Underlying Dissemination of the Colistin Resistance Determinant. *J. Antimicrob. Chemother.* **2017**, *72*, 393–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Snesrud, E.; He, S.; Chandler, M.; Dekker, J.P.; Hickman, A.B.; McGann, P.; Dyda, F. A Model for Transposition of the Colistin Resistance Gene *mcr-1* by IS*Apl1*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2016**, *60*, 6973–6976. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Jiang, Y.; Zhang, Y.; Lu, J.; Wang, Q.; Cui, Y.; Wang, Y.; Quan, J.; Zhao, D.; Du, X.; Liu, H.; et al. Clinical Relevance and Plasmid Dynamics of *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* in China: A Multicentre Case-Control and Molecular Epidemiological Study. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, e24–e33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Wang, R.; Van Dorp, L.; Shaw, L.P.; Bradley, P.; Wang, Q.; Wang, X.; Jin, L.; Zhang, Q.; Liu, Y.; Rieux, A.; et al. The Global Distribution and Spread of the Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-1*. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1179. [[CrossRef](#)]
21. Shen, Y.; Zhang, R.; Shao, D.; Yang, L.; Lu, J.; Liu, C.; Wang, X.; Jiang, J.; Wang, B.; Wu, C.; et al. Genomic Shift in Population Dynamics of *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* in Human Carriage. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2022**, *20*, 1168–1179. [[CrossRef](#)]
22. Zhong, L.L.; Phan, H.T.T.; Shen, C.; Vihta, K.D.; Sheppard, A.E.; Huang, X.; Zeng, K.J.; Li, H.Y.; Zhang, X.F.; Patil, S.; et al. High Rates of Human Fecal Carriage of *mcr-1*-Positive Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae* Emerge in China in Association with Successful Plasmid Families. *Clin. Infect. Dis.* **2018**, *66*, 676–685. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Treilles, M.; Châte, P.; Drapeau, A.; Madec, J.Y.; Haenni, M. Spread of the *mcr-1* Colistin-Resistance Gene in *Escherichia coli* through Plasmid Transmission and Chromosomal Transposition in French Goats. *Front. Microbiol.* **2023**, *13*, 1023403. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Matamoros, S.; Van Hattem, J.M.; Arcilla, M.S.; Willemsse, N.; Melles, D.C.; Penders, J.; Vinh, T.N.; Thi Hoa, N.; Bootsma, M.C.J.; Van Genderen, P.J.; et al. Global Phylogenetic Analysis of *Escherichia coli* and Plasmids Carrying the *mcr-1* Gene Indicates Bacterial Diversity but Plasmid Restriction. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 15364. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Shen, C.; Zhong, L.L.; Yang, Y.; Doi, Y.; Paterson, D.L.; Stoesser, N.; Ma, F.; El-Sayed Ahmed, M.A.E.G.; Feng, S.; Huang, S.; et al. Dynamics of *mcr-1* Prevalence and *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* after the Cessation of Colistin Use as a Feed Additive for Animals in China: A Prospective Cross-Sectional and Whole Genome Sequencing-Based Molecular Epidemiological Study. *Lancet Microbe* **2020**, *1*, E34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Shen, Y.; Zhou, H.; Xu, J.; Wang, Y.; Zhang, Q.; Walsh, T.R.; Shao, B.; Wu, C.; Hu, Y.; Yang, L.; et al. Anthropogenic and Environmental Factors Associated with High Incidence of *mcr-1* Carriage in Humans across China. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 1054–1062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Magiorakos, A.-P.; Srinivasan, A.; Carey, R.B.; Carmeli, Y.; Falagas, M.E.; Giske, C.G.; Harbarth, S.; Hindler, J.F.; Kahlmeter, G.; Olsson-Liljequist, B.; et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-Resistant and Pandrug-Resistant Bacteria: An International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 268–281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Snesrud, E.; McGann, P.; Chandler, M. The Birth and Demise of the IS*Apl1*-*mcr-1*-IS*Apl1* Composite Transposon: The Vehicle for Transferable Colistin Resistance. *mBio* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Hayer, S.S.; Casanova-Higes, A.; Paladino, E.; Elnekave, E.; Nault, A.; Johnson, T.; Bender, J.; Perez, A.; Alvarez, J. Global Distribution of Extended Spectrum Cephalosporin and Carbapenem Resistance and Associated Resistance Markers in *Escherichia coli* of Swine Origin—A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 853810. [[CrossRef](#)]
30. Zhang, Z.; Tian, X.; Shi, C. Global Spread of *mcr*-Producing *Salmonella enterica* Isolates. *Antibiotics* **2022**, *11*, 998. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Liu, M.; Wu, J.; Zhao, J.; Xi, Y.; Jin, Y.; Yang, H.; Chen, S.; Long, J.; Duan, G. Global Epidemiology and Genetic Diversity of *mcr*-Positive *Klebsiella pneumoniae*: A Systematic Review and Genomic Analysis. *Environ. Res.* **2024**, *259*, 119516. [[CrossRef](#)]
32. European Medicines Agency. *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*; European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Veterinary Use (CVMP): London, UK, 2016.
33. Tyson, G.H.; Li, C.; Hsu, C.H.; Ayers, S.; Borenstein, S.; Mukherjee, S.; Tran, T.T.; McDermot, P.F.; Zhao, S. The *mcr-9* Gene of *Salmonella* and *Escherichia coli* Is Not Associated with Colistin Resistance in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Cheng, P.; Yang, Y.; Cao, S.; Liu, H.; Li, X.; Sun, J.; Li, F.; Ishfaq, M.; Zhang, X. Prevalence and Characteristic of Swine-Origin *mcr-1*-Positive *Escherichia coli* in Northeastern China. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Nagy, Á.; Székelyhidi, R.; Hanczné Lakatos, E.; Kapcsándi, V. Review on the Occurrence of the *mcr-1* Gene Causing Colistin Resistance in Cow's Milk and Dairy Products. *Heliyon* **2021**, *7*, e06800. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Nakano, A.; Nakano, R.; Nishisouzu, R.; Suzuki, Y.; Horiuchi, S.; Kikuchi-Ueda, T.; Ubagai, T.; Ono, Y.; Yano, H. Prevalence and Relatedness of *mcr-1*-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated From Livestock and Farmers in Japan. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 664931. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Shi, J.; Zhu, H.; Liu, C.; Xie, H.; Li, C.; Cao, X.; Shen, H. Epidemiological and Genomic Characteristics of Global *mcr*-Positive *Escherichia coli* Isolates. *Front. Microbiol.* **2023**, *13*, 1105401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

38. Chansamouth, V.; Mayxay, M.; Dance, D.A.B.; Roberts, T.; Phetsouvanh, R.; Vannachone, B.; Vongsouvath, M.; Davong, V.; Inthavong, P.; Khounsy, S.; et al. Antimicrobial Use and Resistance Data in Human and Animal Sectors in the Lao PDR: Evidence to Inform Policy. *BMJ Glob. Health* **2021**, *6*, e007009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Nakayama, T.; Jinnai, M.; Kawahara, R.; Diep, K.T.; Thang, N.N.; Hoa, T.T.; Hanh, L.K.; Khai, P.N.; Sumimura, Y.; Yamamoto, Y. Frequent Use of Colistin-Based Drug Treatment to Eliminate Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Backyard Chicken Farms in Thai Binh Province, Vietnam. *Trop. Anim. Health Prod.* **2017**, *49*, 31–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Sun, J.; Fang, L.X.; Wu, Z.; Deng, H.; Yang, R.S.; Li, X.P.; Li, S.M.; Liao, X.P.; Feng, Y.; Liu, Y.H. Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-1* Acquisition. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Jiang, J.; Ma, S.; Chen, S.; Schwarz, S.; Cao, Y.; Dang, X.; Zhai, W.; Zou, Z.; Shen, J.; Lyu, Y.; et al. Low Prevalence of Colistin-Resistant *Escherichia coli* from Companion Animals, China, 2018–2021. *One Health Adv.* **2023**, *1*, 14. [[CrossRef](#)]
42. Miguela-Villoldo, P.; Hernández, M.; Moreno, M.A.; Rodríguez-Lázaro, D.; Quesada, A.; Domínguez, L.; Ugarte-Ruiz, M. National Colistin Sales versus Colistin Resistance in Spanish Pig Production. *Res. Vet. Sci.* **2019**, *123*, 141–143. [[CrossRef](#)]
43. Yoshizawa, N.; Hikoda-Kogiku, Y.; Tamamura-Andoh, Y.; Kusumoto, M. *mcr-1* Remains Detectable in Various *Escherichia coli* Lineages Isolated from Healthy Swine after Withdrawal of Colistin Use on the Farm. *J. Vet. Med. Sci.* **2023**, *85*, 536–540. [[CrossRef](#)]
44. García, V.; García-Meniño, I.; Gómez, V.; Jiménez-Orellana, M.; Méndez, A.; Aguarón, A.; Roca, E.; Mora, A. Mobile Colistin Resistance (*mcr*), Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Multidrug Resistance Monitoring in *Escherichia coli* (Commensal and Pathogenic) in Pig Farming: Need of Harmonized Guidelines and Clinical Breakpoints. *Front. Microbiol.* **2022**, *13*, 1042612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Andersson, D.I.; Levin, B.R. The Biological Cost of Antibiotic Resistance. *Curr. Opin. Microbiol.* **1999**, *2*, 489–493. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Wu, R.; Yi, L.X.; Yu, L.F.; Wang, J.; Liu, Y.; Chen, X.; Lv, L.; Yang, J.; Liu, J.H. Fitness Advantage of *mcr-1*-Bearing IncI2 and IncX4 Plasmids in Vitro. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Yang, J.; Wu, R.; Xia, Q.; Yu, J.; Yi, L.X.; Huang, Y.; Deng, M.; He, W.Y.; Bai, Y.; Lv, L.; et al. The Evolution of Infectious Transmission Promotes the Persistence of *mcr-1* Plasmids. *mBio* **2023**, *14*, e0044223. [[CrossRef](#)]
48. Jolley, K.A.; Bray, J.E.; Maiden, M.C.J. Open-Access Bacterial Population Genomics: BIGSdb Software, the PubMLST.Org Website and Their Applications. *Wellcome Open Res.* **2018**, *3*, 124. [[CrossRef](#)]
49. Wirth, T.; Falush, D.; Lan, R.; Colles, F.; Mensa, P.; Wieler, L.H.; Karch, H.; Reeves, P.R.; Maiden, M.C.J.; Ochman, H.; et al. Sex and Virulence in *Escherichia coli*: An Evolutionary Perspective. *Mol. Microbiol.* **2006**, *60*, 1136–1151. [[CrossRef](#)]
50. Feil, E.J.; Li, B.C.; Aanensen, D.M.; Hanage, W.P.; Spratt, B.G. EBURST: Inferring Patterns of Evolutionary Descent among Clusters of Related Bacterial Genotypes from Multilocus Sequence Typing Data. *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 1518–1530. [[CrossRef](#)]
51. Bortolaia, V.; Kaas, R.S.; Ruppe, E.; Roberts, M.C.; Schwarz, S.; Cattoir, V.; Philippon, A.; Allesoe, R.L.; Rebelo, A.R.; Florensa, A.F.; et al. ResFinder 4.0 for Predictions of Phenotypes from Genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **2020**, *75*, 3491–3500. [[CrossRef](#)]
52. Robertson, J.; Nash, J.H.E. MOB-Suite: Software Tools for Clustering, Reconstruction and Typing of Plasmids from Draft Assemblies. *Microb. Genom.* **2018**, *4*, e000206. [[CrossRef](#)]
53. Carattoli, A.; Hasman, H. PlasmidFinder and In Silico PMLST: Identification and Typing of Plasmid Replicons in Whole-Genome Sequencing (WGS). *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2075*, 285–294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Xie, Z.; Tang, H. ISEScan: Automated Identification of Insertion Sequence Elements in Prokaryotic Genomes. *Bioinformatics* **2017**, *33*, 3340–3347. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2020.
56. Wickham, H. Ggplot2. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2011**, *3*, 180–185. [[CrossRef](#)]
57. Argimón, S.; Abudahab, K.; Goater, R.J.E.; Fedosejev, A.; Bhai, J.; Glasner, C.; Feil, E.J.; Holden, M.T.G.; Yeats, C.A.; Grundmann, H.; et al. Microreact: Visualizing and Sharing Data for Genomic Epidemiology and Phylogeography. *Microb. Genom.* **2016**, *2*, e000093. [[CrossRef](#)]

**Disclaimer/Publisher’s Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

**PART IV:  
DISCUSSIÓ  
GENERAL I  
CONCLUSIONS**





## DISCUSSIÓ GENERAL

La present tesi doctoral se centra en la diarrea a les transicions porcines, on s'estudia la significació dels diferents agents infecciosos i la microbiota intestinal. Un altre objectiu és l'estudi d'una problemàtica derivada dels tractaments de la diarrea, com és la presentació de les resistències antimicrobianes (RAM), tant fenotípicament com genotípicament, fent especial èmfasi en els gens de resistència de rellevància sanitària, en la seva localització en plasmidis i en la coselecció associada als metalls pesants, àmpliament utilitzats durant molt temps a la indústria porcina.

La problemàtica de la diarrea porcina s'ha intensificat durant les últimes dècades, lligat a que la producció porcina ha experimentat un gran canvi, intensificant molt la producció per tal de produir més quilograms de garrí per any (Lassaletta et al., 2019). Per tal de reduir la seva incidència i impacte, s'ha optat per diverses mesures de prevenció com ara la vacunació, l'ús d'antibiòtics i de metalls pesants com l'òxid de zinc.

La presentació de malaltia depèn de la interacció entre l'hoste, el patògen i l'ambient. Però en aquest punt ens trobem amb una incongruència, perquè, tot i els grans canvis experimentats en l'ambient (millora de les instal·lacions, dels protocols de neteja i desinfecció) o en l'hoste (millora genètica, millors coneixements de nutrició o noves vacunes contra els principals patògens), els panells de diagnòstic de la diarrea porcina segueixen incloent els mateixos agents infecciosos i factors de virulència que fa 70 anys. Tot i que aquests patògens poden continuar essent la causa principal de la diarrea, hi ha diversos estudis realitzats en maternitats que indiquen que la presència d'aquests potencials patògens també es detecten en freqüències similars en animals sans, amb l'excepció de Rotavirus A (RVA) (Kongsted et al., 2018; Vidal et al., 2019). Això posa en qüestió si cal modificar els protocols actuals de diagnòstic dels processos entèrics en el porcí, fent una revisió del panel de patògens que caldria incloure en el diferencial, a més del tipus de mostreig que caldria realitzar.

Arran dels resultats d'estudis previs realitzats en granges porcines de Catalunya amb problemes de diarrea neonatal (Vidal et al 2019), l'objectiu primari de l'estudi 1 d'aquesta tesi va ser esbrinar el rol dels principals patògens en la presentació de la diarrea a les transicions. Per això es van comparar animals malalts amb d'altres aparentment sans dins del mateix corral. Els resultats d'aquest estudi van associar únicament el

rotavirus A amb la presentació de la diarrea, mentre que altres patògens es poden trobar en la mateixa proporció en animals sans i en malalts.

Un fet innovador d'aquest estudi va ser incloure granges que no presentaven historial recent de diarrea al postdeslletament. En aquest cas, si només s'analitzen les granges amb brots de diarrea, trobaríem que els factors de virulència F4 i STb d'*E. coli* també estarien relacionats amb la diarrea. Ara bé, quan s'inclouen les granges sense problemes digestius, la seva significació estadística desapareix. Això, ens podria indicar que, o bé no són realment factors de virulència o bé que per produir la seva acció patògena tenen més pes l'ambient i les condicions de maneig.

Els resultats del primer estudi, veient que el patogen entèric més comú és el RVA i que els mateixos factors de virulència d'*E. coli* poden trobar-se en granges sense quadres clínics de diarrea, fan pensar que més que mesures farmacològiques, aquelles que esdevindrien claus per reduir la magnitud del problema serien les de neteja i desinfecció de les instal·lacions i el maneig dels animals. Tot i així, tampoc podem descartar que alguns animals patissin diarrea sense cap patogen implicat o, al revés, animals amb coinfeccions amb diferents patògens que no patien cap problema de salut. Això és degut a la naturalesa d'aquest tipus d'estudis que no deixen de ser una fotografia del moment i no es pot saber l'evolució que seguiran aquests animals a la hora de desenvolupar la malaltia (Kongsted et al., 2018; Mesonero-Escuredo et al., 2018). Ara bé, també poden haver-hi altres factors a tenir en compte, com la emergència i selecció de nous gens de virulència en soques d'*E. coli* o bé l'efecte que pot exercir la microbiota intestinal en l'aparició de la diarrea.

Per tal d'intentar aclarir l'emergència de nous factors de virulència d'*E. coli* es realitzen els estudis d'associació de genoma complet (GWAS, per les sigles de "Genome Wide Association Studies" en anglès), que permeten comparar tota la seqüència genètica amb un fenotip concret. Aquest mètode és altament efectiu en el cas de fenotips plenament binaris en casos com la capacitat d'un bacteri de ser extraintestinal o no, o l'associació amb un hoste determinat (Mageiros et al., 2021; Sheppard et al., 2013). No obstant, és complicat realitzar aquests tipus d'estudis amb problemàtiques com la diarrea porcina, donada la seva etiologia multifactorial i amb diferents graus d'afectació, que complica molt els models a utilitzar, i es necessitaria molta més informació del context de cada cas per tal de poder extreure conclusions robustes.

L'altra possibilitat que pot afectar a l'aparició de diarrea és l'efecte de la microbiota, la qual s'està estudiant àmpliament en medicina humana pel que fa a la seva relació amb diferents patologies tan diverses com l'obesitat (Vieira-Silva et al., 2020), la malaltia inflamatòria intestinal (Vieira-Silva et al., 2019) o la depressió (Valles-Colomer et al., 2019). Tota aquesta recerca té tot el sentit des del moment en què la microbiota és modulable. Emperò, tot i que s'estan fent estudis molt amplis en humana, només s'ha aconseguit explicar un percentatge molt baix de la variabilitat individual, trobant-se que el factor més important era compartir habitatge amb altres persones, fins i tot més important que la genètica, la dieta o els tractaments amb antibiòtics (Valles-Colomer et al., 2023).

En el cas dels porcs i la diarrea, s'han realitzat molts estudis per trobar marcadors de salut intestinal i desenvolupament de la diarrea. Però aquests treballs presenten una limitació molt gran, perquè s'han realitzat o bé en condicions experimentals (Dou et al., 2017; Gryaznova et al., 2022) o bé només en una sola granja comercial (Gryaznova et al., 2023; Karasova et al., 2021). Això deixa fora el principal factor que explica la variabilitat en els estudis d'humana: compartir habitatge. Així, s'ha observat una gran heterogeneïtat de resultats entre els diversos estudis, fent molt complicada, de moment, la seva extrapolació a la pràctica diària. Conseqüentment amb aquest buit de coneixement, un dels objectius de l'estudi va ser estudiar la relació microbiota-diarrea en condicions de camp.

A l'Estudi 1, tot i ser conscients de les seves limitacions i no poder-se comparar amb els estudis d'humana, realitzem una primera aproximació incloent 148 animals d'11 granges diferents per mirar de trobar marcadors de salut i malaltia. A nivell general, vam poder confirmar l'associació estadística del fílum Fusobacteriota amb la diarrea i de la família *Ruminococcaceae* amb la salut intestinal. Tanmateix, el fet d'incloure moltes granges ens va permetre anar un pas més enllà i comparar segons el temps que feia que els animals havien estat desmamats, i observar diferències significatives. Així, a la primera setmana postdeslletament, trobàvem l'efecte beneficiós de la família *Ruminococcaceae* (productora d'àcids grassos de cadena curta) en animals sans mentre que, en els malalts trobàvem incrementats els nivells de la família *Enterobacteriaceae*. Tot i les limitacions de resolució que la tècnica de seqüenciació del 16sRNA comporta, tot indicaria que durant la primera setmana les soques d'*E. coli* jugarien un paper important, tot i no presentar els factors de virulència clàssics, que s'haurien de tornar a determinar. En canvi, en els casos de diarrees que apareixen a la segona setmana postdeslletament, els taxons

implicats eren *Clostridia vadin BB60* group i *Sphaerochaeta*, dels quals no hi ha cap mena de descripció prèvia en la literatura, ni en animals sans ni en malalts. Durant aquesta segona setmana post-deslletament, a més, trobàvem prevalences molt més altes de RVA en els animals malalts que durant la primera setmana. Això dona lloc a dues situacions diferenciades. Durant la primera setmana o primers dies postdeslletament semblaria que l'origen seria majoritàriament bacterià i on els tractaments antibiòtics, en certa mesura, podrien estar justificats. En canvi, a partir de la segona setmana, l'etiologia seria principalment vírica i, conseqüentment, s'haurien d'evitar els antibiòtics.

No obstant això, la principal limitació de l'estudi 1 són els tempos en què es va realitzar per adequar-se al projecte. Les mostres es van recollir entre 2020 i 2021, abans de la prohibició de l'òxid de zinc. Així els resultats s'haurien de posar en quarantena, perquè l'ús del zinc podria emmascarar l'efecte patogènic de les soques d'*E. coli* enteroxigènic (ETEC). En aquesta línia, Eriksen et al. (2023) després de la seva prohibició, sí que van observar que, a Dinamarca, les soques ETEC es trobaven més freqüentment en animals diarreics, però caldria confirmar si era una diferència geogràfica o era degut a la supressió del zinc. També s'ha vist que la microbiota intestinal es pot veure modificada per l'ús de l'òxid de zinc (Ortiz Sanjuán et al., 2024), així que seria bo testar-ho una altra vegada post-prohibició.

Emperò hi ha un resultat que no es veu afectat per l'ús del zinc. A l'estudi 1, el RVA va ser el patogen més clarament associat a la diarrea al postdeslletament. Per això es va voler veure si es podia trobar algun efecte protector per part de la microbiota, que pogués proporcionar alguna estratègia alternativa a la vacunació de RVA. Així, es va observar que *Lactobacillus* spp es trobava estadísticament augmentat en aquells animals negatius a RVA o amb càrregues baixes, assenyalant un possible efecte protector. Curiosament, tractaments amb *Lactobacillus* spp en els humans, s'ha vist que provoquen una proliferació de limfòcits B i, fins i tot, evitar la proliferació de RVA (Park et al., 2017; Shin et al., 2020). Així, incrementar la proporció d'aquestes soques de lactobacillus seria molt interessant per fer front a les diarrees al deslletament. La qüestió seria el com. Utilitzant probiòtics? Amb prebiòtics i additius? La dieta pot modular la microbiota per aconseguir-ho? També l'ús de metagenòmica sobre mostres de femtes podria ajudar a veure si hi ha espècies i soques amb més efecte que altres i a perfilar més les intervencions a seguir. Així, queda molt camí fins que l'utilització de *Lactobacillus* spp sigui una

solució generalitzada, però sembla que podria ser una opció més que acceptable per fer front al RVA, el principal patogen de la diarrea al postdeslletament.

No obstant això, la solució més utilitzada per combatre les diarrees postdeslletament, tot i les restriccions que s'han anat implementant, segueix essent l'ús d'antibiòtics. Així és important monitoritzar la RAM i el primer pas és fer-ho a nivell fenotípic. L'estudi 2, tenia com objectiu determinar el perfil d'antibiorresistència de les soques d'*E. coli* aïllades en casos de diarrea al deslletament. A part de la informació que es pot extreure de cara a la salut pública, és molt interessant per proporcionar informació epidemiològica als veterinaris de campen aquesta etapa perquè, degut a l'estat immadur dels animals, es necessiten tractaments mèdics molt ràpids. En el cas de no poder esperar als resultats de les proves de sensibilitat antibacteriana les dades dels estudis epidemiològics poden orientar als veterinaris de camp sobre el tractament més òptim .

Del segon estudi, vam trobar nivells de resistència elevats a múltiples antibiòtics, especialment a aquells de categoria D segons l'Agència Europea del Medicament (AEM). Això no s'allunya del que s'ha descrit en altres estudis d'altres indrets del món (Kyung-hyo et al., 2020), però la troballa més preocupant del nostre estudi va ser els elevats nivells de resistència a antibiòtics de la categoria B com són les quinolones. En un estudi previ publicat en maternitats de granges de Catalunya, també es van trobar alts nivells de resistència a nivell fenotípic (Vidal et al., 2020). Així, és possible que sigui quelcom que trobem a la nostra zona geogràfica, possiblement degut a un major ús d'aquests antibiòtics, que seria convenient investigar. En aquesta línia, el Programa REDUCE, després de l'èxit que es va tenir amb la colistina, s'ha proposat ara reduir l'ús de les quinolones en la producció animal.

Fins aquí, l'estudi 2 confirma resultats prèviament publicats per altres autor (Huber et al., 2021; Spronk et al., 2023). Però allà on aporta valor afegit aquest estudi és en incloure mostres provinents també d'animals sans. La troballa més important va ser que els aïllats d'*E.coli* dels animals amb diarrea presentaven nivells més alts de resistència que els d'animals sans. Les raons d'aquest fet no estan clares, però sí que té una conclusió d'aplicació pràctica: quan tenim casos de diarrea, les opcions antimicrobianes es redueixen. Això seguiria reforçant la idea que la solució ha d'anar encarada a la prevenció i millorar l'estat del garrí que no pas al tractament antimicrobià.

El pas lògic per entendre la RAM, després de la caracterització fenotípica, és la genotípica. Ara les tècniques de WGS ens permeten tenir molta més informació, que ja no només es redueix a la presència o absència dels gens que confereixen resistència, sinó que aporten molta informació sobre el seu context epidemiològic. També permeten analitzar els plasmidis i elements genètics mòbils dels bacteris, cosa molt important en el context de la ramaderia, ja que l'evidència científica més recent suggereix que és on es troba el major risc per a la salut pública (C. M. Liu et al., 2023; Matlock et al., 2023).

Així, a l'estudi 3, es van seqüenciar 112 soques d'*E. coli* aïllades tant de les maternitats com de les transicions per tal de detectar els gens de RAM i analitzar si estaven localitzats en plasmidis o en cromosoma. També, es va caracteritzar la colocalització en el mateix plasmidi de gens de RAM i de tolerància als metalls pesants.

Com era d'esperar pels resultats obtinguts fenotípicament, la prevalença dels gens de resistència era alta i la majoria localitzats en plasmidis.

Diferent va ser el cas dels metalls pesants. Com ja s'ha comentat, metalls com l'òxid de zinc han estat utilitzats per a prevenir la diarrea. A part del seu impacte ambiental, entre els motius esgrimits per part de l'AEM per prohibir-lo, estava el risc d'augmentar la coselecció de RAM (AEM, 2017). En els estudis basats en metagenòmica sí que s'ha observat que la presència de gens de tolerància als metalls pesants es correlaciona amb la presència de gens de resistència als antibiòtics (Ortiz Sanjuán et al., 2024), així que una de les hipòtesis més plausibles seria la presència d'ambdós compostos en el mateix plasmidi.

Per analitzar-ho, vam reconstruir els plasmidis de les soques i vam analitzar la presència dels distints gens. Emperò, la hipòtesi va ser rebutjada, ja que, mentre la gran majoria de gens de resistència als antibiòtics es trobaven en plasmidis, els dels metalls pesants es trobaven en el cromosoma i l'única família que coincidia regularment en els plasmidis amb gens de resistència era el mercuri: un contaminant ambiental. Aquest resultat coincideix amb allò que descriuen Ekhlas et al., (2023) i reforçaria el rebuig de la hipòtesi inicial. Així, ara mateix, allò més plausible seria pensar que, en el cas d'*E. coli*, l'increment associat a l'exposició als metalls ve donat per l'estrès oxidatiu al qual sotmeten aquests metalls als bacteris (W. Liu et al., 2023), però caldria més recerca per acabar d'entendre-ho. Per altra banda, s'ha provat per *E. coli*, però no està confirmat per

altres patògens zoonòtics com *Staphylococcus aureus*, on la coselecció podria donar-se i també caldria estudiar-ho.

La limitació per no observar la co-selecció seria que a l'estudi 3 es van utilitzar mètodes de seqüenciació basats en lectures curtes i vam reconstruir els plasmidis mitjançant programaris basats en algorismes com MOB-Suite (Robertson i Nash, 2018). Per això, tot i no ser possible fer-ho amb totes les soques per raons econòmiques, vàrem ensamblar genomes híbrids per tal d'utilitzar el mètode de referència per treballar amb plasmidis. Allà vàrem confirmar la mateixa troballa: els gens de resistència als antibiòtics es trobaven en els plasmidis i els gens de tolerància als metalls pesants en el cromosoma.

La colistina, per la seva rellevància per a la medicina humana, va ser estudiada a part. Aquest antibiòtic s'ha utilitzat durant molt temps com a tractament (però també de manera metafilàctica) a la indústria porcina. En els últims anys, el seu ús s'ha recuperat per al tractament de gram-negatius multiresistents en medicina humana. En principi, no se li donava importància al fet de trobar soques resistents en animals de rent, perquè es pensava que els mecanismes de resistència es basaven en mutacions puntuals cromosòmiques i la transmissió clonal era complicada. Emperò, el 2016, es va reportar el gen *mcr-1*, que es podia transmetre horitzontalment via plasmidis (Y. Y. Liu et al., 2016) i amb el temps s'han descobert fins a 10 variants (*mcr1-10*). Això va fer saltar les alarmes i el seu ús en veterinària es va restringir a la majoria de països.

Així, després de diversos anys on pràcticament el seu ús ha estat nul, va ser una sorpresa trobar a l'estudi 2 un 15% de soques fenotípicament resistents a la colistina. Així, a l'estudi 3, vam intentar esbrinar quin era l'origen genètic d'aquest fenotip. Es va observar que, a diferència de la Xina o de països del nord d'Europa (Göpel et al., 2024; Wang et al., 2024), el gen més freqüent era *mcr-4*, de la mateixa manera que s'havia trobat en altres estudis del sud d'Europa (Aguirre et al., 2020; Carattoli et al., 2017; García-Meniño et al., 2019). Però, encara més interessant, aquest gen només estava associat amb un plasmidi en concret: ColE10. Això, donada la importància de preservar l'ús de la colistina, podria tenir repercussions pel seu control. S'estan desenvolupant mètodes basats en la CRISPR per eliminar plasmidis específics, essent candidats ideals aquells de mida petita i que només contenen un gen de resistència (Vrancianu et al., 2020), com seria el cas de *mcr-4* en el nostre estudi. Emperò, el nombre tan reduït de mostres analitzades (n=8) ens impossibilitava extreure conclusions.



Per això, de cara a veure la validesa de la troballa, vam analitzar totes les soques de la família *Enterobacteriaceae* portadores del gen *mcr-4* (n=49) presents a la plataforma NCBI Pathogen Detection. Un 90 % (n=44) es localitzaven en el plasmidi ColE10. així que es bastant plausible concloure que existeix evidència que és la seva localització predilecte. Tres de les cinc soques restants ho portaven en el plasmidi Col8282 que, donada la similitud que presenta amb ColE10, podria ser més un artefacte metodològic per haver utilitzat la seqüenciació basada en lectures curtes. Ara bé, abans de pensar estratègies per eliminar aquests plasmidis, caldria pensar en l'impacte que té aquest gen en la salut pública. En humans, el gen *mcr-4* sembla estar més distribuït en gram-negatius no fermentadors, on els plasmidis implicats són diferents i acostumen a ser no mobilitzables, i la relació epidemiològica amb els dels porcs no sembla molt clara (Lam i Hamidian, 2024). No obstant això, tot i no ser molt comú, s'han detectat plasmidis ColE10 portadors de *mcr-4* en soques de *Salmonella* provinents d'infeccions en humans (Carretto et al., 2018), així que no s'ha de menysvalorar aquesta troballa.

El segon gen més comú que conferia resistència a la colistina era *mcr-1*, del qual no existeix cap dubte sobre la seva importància en humana (Calero-Cáceres et al., 2023)-- Tot i haver-se reduït la seva prevalença, se segueix trobant en porcs malgrat la restricció de la colistina. Als resultats de l'estudi 3 no es menciona perquè una mostra de 5 soques és clarament insuficient, però va ser sorprenent que el 40 % (2 soques) dels nostres gens *mcr-1* es trobessin en el cromosoma, quan es tracta d'un gen que es transmet gairebé sempre via plasmidi. Així, va sorgir una nova hipòtesi: el gen *mcr-1* podria localitzar-se en el cromosoma.

Així, l'objectiu de l'estudi 4 va ser, analitzant 3162 genomes d'*E. coli* d'arreu del món aïllats d'humans, però també d'animals de renda com porcs, vedells i pollastres, presents a NCBI Pathogen Detection, esbrinar si existia una tendència global del gen *mcr-1* a localitzar-se en el cromosoma. A part, la gran mostra pre i post restricció de la colistina va permetre analitzar l'adaptació a la restricció de la colistina del gen arreu del món.

El primer resultat de l'estudi 4 va ser comprovar que el gen *mcr-1* estava localitzat majoritàriament en plasmidis (93.5%), pel que el resultat de l'estudi 3 sembla que seria un artefacte degut a la baixa mostra. El gen es trobava principalment en tres plasmidis diferents: dos d'especialitzats en el gen *mcr-1*, com IncI2 i IncX4, i un plasmidi multiresistent com IncHI2, com ja havien observat Matamoros et al, (2017).

La pèrdua de la seqüència d'inserció *ISAp11* també s'havia descrit com una mesura d'adaptació al nou context de manca d'ús de la colistina (Shen et al., 2020). En la mateixa línia, recentment, Ogunlana et al., (2023) van reportar unes mutacions en la regió promotora del gen, que en reduïen el cost adaptatiu. Per les dates de publicació, l'estudi 4 representava la primera oportunitat d'analitzar la relació entre les distintes mesures d'adaptació i es va estudiar l'associació plasmidi-*ISAp11*-variant del promotor. Mentre que els plasmidis IncX4 virtualment no contenien la seqüència d'inserció i pràcticament la meitat dels IncHI2 la mantenien, vam trobar dues tendències pel que feia IncI2. Existien una sèrie de variants de la regió promotora (incloent la variant original) que conservaven *ISAp11* a nivells similars d'IncHI2, i unes altres que es comportaven com IncX4 i no contenien *ISAp11*. És fa difícil explicar com una mutació d'un nucleòtid pot portar a la pèrdua d'una seqüència d'inserció, però seria interessant acabar d'aclarir-ho, perquè sembla que pot ser una de les explicacions que fan que el gen *mcr-1* no s'acabi d'eliminar en absència de l'ús de la colistina.

A nivell geogràfic, vàrem observar grans diferències entre Àsia i Europa. Per començar, els plasmidis implicats eren diferents: mentre que el més freqüent a Àsia era IncI2, a Europa predominava IncX4. Així, el desenvolupament de noves tecnologies per erradicar els plasmidis (Vrancianu et al., 2020), no només hauria de tenir en compte el gen en concret, sinó també el seu context epidemiològic, perquè sinó fracassaran. Hagués estat molt interessant veure els altres continents, però la mostra era petita i era difícil extreure conclusions. A part, veient les diferències entre Àsia i Europa, seria molt arriscat extrapolar els resultats a la resta de regions.

A nivell de les adaptacions a la restricció, les diferències entre Àsia i Europa també eren importants. El procés d'adaptació a Europa va ser relativament senzill, perquè simplement el gen va passar d'estar localitzat a un plasmidi multiresistent IncHI2 (com ja havia estat descrit (Matamoros et al., 2017) a un especialitzat per *mcr-1* com IncX4, que proporciona una reducció del cost adaptatiu (Wu et al., 2018). Ara bé, una nova troballa que no havien detectat Ogunlana et al (2023), perquè només s'havien centrat en aïllats de la Xina, va ser la substitució de la variable consens per la SNP4, que era residual allà i no s'havia testat. Seria interessant veure la significació d'això, perquè sense més context sembla una troballa casual, però també podria ser una de les adaptacions per reduir el cost adaptatiu.

En canvi, a Àsia el procés va ser més complicat. La freqüència dels plasmidis implicats es va mantenir estable i també vam detectar la pèrdua d'*ISApII* ja descrita (Jiang et al., 2020), que en si mateixa seria una adaptació. Però, tornant a fer l'associació plasmidi-*ISApII*-variant del promotor, veiem que, pel plasmidi més freqüent (IncI2) la freqüència de la seqüència d'inserció es mantenia estable pre i post prohibició per a cada variant. L'explicació de la pèrdua d'*ISApII* residia en la substitució d'aquelles variants que es comportaven IncHI2 per aquelles similars a IncX4. Tot i que amb la informació disponible actualment no és possible explicar com una simple mutació ocasiona una pèrdua de la seqüència d'inserció, aquí sembla estar la clau de l'adaptació del gen *mcr-1* a la res.

Així, de l'estudi 4, se'n poden extreure dues conclusions pràctiques principals. La primera és que extrapolar els resultats pel que fa a l'epidemiologia del gen *mcr-1* no és una bona idea i, de cara a les polítiques de vigilància dels països, no queda més remei que cada regió dediqui recursos a seqüenciació per conèixer l'estat propi. La segona és que, tot i la demostrada reducció de prevalença (Miguera-Villoldo et al., 2022; Shen et al., 2020), cessar l'ús dels antibiòtics durant un temps no eliminarà per complet el gen com es podria pensar, ja que els bacteris poden trobar mecanismes per compensar el cost adaptatiu que en principi generava. Així, una vegada el problema existeix, utilitzant una terminologia molt aplicada en sanitat animal, més que per l'erradicació de *mcr-1*, s'hauria d'optar pel control. A part, d'unes bones mesures de bioseguretat per evitar al màxim la sortida de bacteris de la granja, mesures generalistes com el compostatge dels purins poden ajudar a reduir l'excreció a l'ambient dels gens de resistència i reduir el risc que aquests puguin arribar a les soques patògenes clíniques (Zhou et al., 2019). L'altra opció, més de cara a una erradicació, seria desenvolupar opcions tecnològiques que ataquin els plasmidis (Vrancianu et al., 2020), però, de moment, no estan disponibles.

En conclusió, en aquesta tesi doctoral es fa palès que, tot i que un dels patògens principals relacionats amb l'aparició de la diarrea porcina és el RVA, l'elevat ús d'antibiòtics per tractar-la ha portat a tenir uns nivells alts de gens de resistència en les soques d'*E. coli*, incloent gens de declarada importància per a la salut pública, trobant-se especialment en plasmidis, la qual cosa genera un risc zoonòtic evident. Així les estratègies de control de la diarrea en porcí no s'haurien de basar en la utilització dels antibiòtics i seria millor pensar en el mig termini amb mesures destinades a la prevenció i la millora del benestar dels animals. A part, també s'emfatitza que el fet de deixar d'utilitzar un antibiòtic podrà

no fer desaparèixer completament el gen de resistència associat, basant-se el cas paradigmàtic de *mcr-1*.

## Bibliografia discussió general

- AEM (2017). *Zinc oxide Article-35 referral - Questions and answers on veterinary medicinal products containing zinc oxide to be administered orally to food-producing species*
- Aguirre, L., Vidal, A., Seminati, C., Tello, M., Redondo, N., Darwich, L., i Martín, M. (2020). Antimicrobial resistance profile and prevalence of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL), AmpC beta-lactamases and colistin resistance (mcr) genes in *Escherichia coli* from swine between 1999 and 2018. *Porcine Health Management*, 6(8), 4–9. <https://doi.org/10.1186/s40813-020-00146-2>
- Calero-Cáceres, W., Rodríguez, K., Medina, A., Medina, J., Ortuño-Gutiérrez, N., Sunyoto, T., Dias, C. A. G., Bastidas-Caldes, C., Ramírez, M. S., i Harries, A. D. (2023). Genomic insights of mcr-1 harboring *Escherichia coli* by geographical region and a One-Health perspective. *Frontiers in Microbiology*, 13, 1032753. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1032753>
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzotti, G., i Magistrali, C. F. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30589>
- Carretto, E., Brovarone, F., Nardini, P., Russello, G., Barbarini, D., Pongolini, S., Gagliotti, C., Carattoli, A., i Sarti, M. (2018). Detection of mcr-4 positive *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in clinical isolates of human origin, Italy, october to November 2016. *Eurosurveillance*, 23(2), 30589. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.2.17-00821>
- Dou, S., Gadonna-Widehem, P., Rome, V., Hamoudi, D., Rhazi, L., Lakhal, L., Larcher, T., Bahi-Jaber, N., Pinon-Quintana, A., Guyonvarch, A., Huërou-Luron, I. L. E., i Abdennebi-Najar, L. (2017). Characterisation of early-life fecal microbiota in susceptible and healthy pigs to post-weaning diarrhoea. *PLoS ONE*, 12(1), e0169851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169851>
- Ekhlas, D., Sanjuán, J. M. O., Manzanilla, E. G., Leonard, F. C., Argüello, H., i Burgess, C. M. (2023). Comparison of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from Irish commercial pig farms with and without zinc oxide and antimicrobial usage. *Gut Pathogens*, 15(1), 8. <https://doi.org/10.1186/s13099-023-00534-3>

- Eriksen, E. Ø., Kudirkiene, E., Barington, K., Goecke, N. B., Blirup-Plum, S. A., Nielsen, J. P., Olsen, J. E., Jensen, H. E., Pankoke, K., Larsen, L. E., Liu, G., i Pedersen, K. S. (2023). An observational field study of porcine post-weaning diarrhea: clinical and microbiological findings, and fecal pH-measurements as a potential diagnostic tool. *Porcine Health Management*, 9(1), 33. <https://doi.org/10.1186/s40813-023-00325-x>
- García-Meniño, I., Díaz-Jiménez, D., García, V., de Toro, M., Flament-Simon, S. C., Blanco, J., i Mora, A. (2019). Genomic Characterization of Prevalent mcr-1, mcr-4, and mcr-5 Escherichia coli Within Swine Enteric Colibacillosis in Spain. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2469. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02469>
- Göpel, L., Prenger-Berninghoff, E., Wolf, S. A., Semmler, T., Bauerfeind, R., i Ewers, C. (2024). Occurrence of Mobile Colistin Resistance Genes mcr-1–mcr-10 including Novel mcr Gene Variants in Different Pathotypes of Porcine Escherichia coli Isolates Collected in Germany from 2000 to 2021. *Applied Microbiology*, 4(1), 70-84. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4010005>
- Gryaznova, M., Smirnova, Y., Burakova, I., Morozova, P., Nesterova, E., Gladkikh, M., Mikhaylov, E., i Syromyatnikov, M. (2023). Characteristics of the Fecal Microbiome of Piglets with Diarrhea Identified Using Shotgun Metagenomics Sequencing. *Animals*, 13(14), 2303. <https://doi.org/10.3390/ani13142303>
- Gryaznova, M. v., Dvoretzkaya, Y. D., Syromyatnikov, M. Y., Shabunin, S. v., Parshin, P. A., Mikhaylov, E. v., Strelnikov, N. A., i Popov, V. N. (2022). Changes in the Microbiome Profile in Different Parts of the Intestine in Piglets with Diarrhea. *Animals*, 12(3), 320. <https://doi.org/10.3390/ani12030320>
- Huber, L., Hallenberg, G. S., Lunha, K., Leangapichart, T., Jiwakanon, J., Hickman, R. A., Magnusson, U., Sunde, M., Järhult, J. D., i Van Boeckel, T. P. (2021). Geographic Drivers of Antimicrobial Use and Resistance in Pigs in Khon Kaen Province, Thailand. *Frontiers in Veterinary Science*, 8, 659051. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.659051>
- Jiang, Y., Zhang, Y., Lu, J., Wang, Q., Cui, Y., Wang, Y., Quan, J., Zhao, D., Du, X., Liu, H., Li, X., Wu, X., Hua, X., Feng, Y., i Yu, Y. (2020). Clinical relevance and plasmid dynamics of mcr-1-positive Escherichia coli in China: a multicentre case-control and molecular epidemiological study. *The Lancet Microbe*, 1(1), e24–e33. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30001-X](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30001-X)

- Karasova, D., Crhanova, M., Babak, V., Jerabek, M., Brzobohaty, L., Matesova, Z., i Rychlik, I. (2021). Development of piglet gut microbiota at the time of weaning influences development of postweaning diarrhea – A field study. *Research in Veterinary Science*, 135, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.022>
- Kongsted, H., Pedersen, K., Hjulsager, C. K., Larsen, L. E., Pedersen, K. S., Jorsal, S. E., i Bækbo, P. (2018). Diarrhoea in neonatal piglets: A case control study on microbiological findings. *Porcine Health Management*, 4(1), 17. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0094-5>
- Kyung-hyo, D., Jae-won, B., i Wan-kyu, L. (2020). Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from diarrheic weaned piglets after the ban on antibiotic growth promoters in feed. *Antibiotics*, 9(11), 755. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9110755>
- Lam, M. M. C., i Hamidian, M. (2024). Examining the role of *Acinetobacter baumannii* plasmid types in disseminating antimicrobial resistance. *Npj Antimicrobials and Resistance*, 2(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s44259-023-00019-y>
- Lassaletta, L., Estellés, F., Beusen, A. H. W., Bouwman, L., Calvet, S., van Grinsven, H. J. M., Doelman, J. C., Stehfest, E., Uwizeye, A., i Westhoek, H. (2019). Future global pig production systems according to the Shared Socioeconomic Pathways. *Science of the Total Environment*, 665. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.079>
- Liu, C. M., Aziz, M., Park, D. E., Wu, Z., Stegger, M., Li, M., Wang, Y., Schmidlin, K., Johnson, T. J., Koch, B. J., Hungate, B. A., Nordstrom, L., Gauld, L., Weaver, B., Rolland, D., Statham, S., Hall, B., Sariya, S., Davis, G. S., ... Price, L. B. (2023). Using source-associated mobile genetic elements to identify zoonotic extraintestinal *E. coli* infections. *One Health*, 100518. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2023.100518>
- Liu, W., Xu, Y., i Slaveykova, V. I. (2023). Oxidative stress induced by sub-lethal exposure to copper as a mediator in development of bacterial resistance to antibiotics. *Science of The Total Environment*, 860, 160516. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.160516>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H., i Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance

mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)

Mageiros, L., Méric, G., Bayliss, S. C., Pensar, J., Pascoe, B., Mourkas, E., Calland, J. K., Yahara, K., Murray, S., Wilkinson, T. S., Williams, L. K., Hitchings, M. D., Porter, J., Kemmett, K., Feil, E. J., Jolley, K. A., Williams, N. J., Corander, J., i Sheppard, S. K. (2021). Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. *Nature Communications*, 12(1), 765. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20988-w>

Matamoros, S., Van Hattem, J. M., Arcilla, M. S., Willemsse, N., Melles, D. C., Penders, J., Vinh, T. N., Thi Hoa, N., Bootsma, M. C. J., Van Genderen, P. J., Goorhuis, A., Grobusch, M., Molhoek, N., Oude Lashof, A. M. L., Stobberingh, E. E., Verbrugh, H. A., De Jong, M. D., i Schultsz, C. (2017). Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr-1* gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction. *Scientific Reports*, 7(1), 15364. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15539-7>

Matlock, W., Lipworth, S., Chau, K. K., Oun, M. A., Barker, L., Kavanagh, J., Andersson, M., Oakley, S., Morgan, M., Crook, D. W., Read, D. S., Anjum, M., Shaw, L. P., i Stoesser, N. (2023). Enterobacterales plasmid sharing amongst human bloodstream infections, livestock, wastewater, and waterway niches in Oxfordshire, UK. *ELife*, 12, e85302. <https://doi.org/10.7554/elife.85302>

Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C., i Segalés, J. (2018). Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhoea cases in Spain. *Porcine Health Management*, 4, 5. <https://doi.org/10.1186/s40813-018-0083-8>

Miguela-Villoldo, P., Moreno, M. A., Rodríguez-Lázaro, D., Gallardo, A., Hernández, M., Serrano, T., Sáez, J. L., de Frutos, C., Agüero, M., Quesada, A., Domínguez, L., i Ugarte-Ruiz, M. (2022). Longitudinal study of the *mcr-1* gene prevalence in Spanish food-producing pigs from 1998 to 2021 and its relationship with the use of polymyxins. *Porcine Health Management*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40813-022-00255-0>

Ogunlana, L., Kaur, D., Shaw, L. P., Jangir, P., Walsh, T., Uphoff, S., i MacLean, R. C. (2023). Regulatory fine-tuning of *mcr-1* increases bacterial fitness and stabilises antibiotic resistance in agricultural settings. *The ISME Journal*, 17(11), 2058–2069. <https://doi.org/10.1038/s41396-023-01509-7>



- Ortiz Sanjuán, J. M., Manzanilla, E. G., Cabrera-Rubio, R., Crispie, F., Cotter, P. D., Garrido, J. J., Ekhlas, D., O'Neill, L., i Argüello, H. (2024). Fine-tuning of post-weaning pig microbiome structure and functionality by in-feed zinc oxide and antibiotics use. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *14*, 1354449. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1354449>
- Park, M. S., Kwon, B., Ku, S., i Ji, G. E. (2017). The efficacy of *Bifidobacterium longum* BORI and *Lactobacillus acidophilus* AD031 probiotic treatment in infants with rotavirus infection. *Nutrients*, *9*(8), 887. <https://doi.org/10.3390/nu9080887>
- Robertson, J., i Nash, J. H. E. (2018). MOB-suite: software tools for clustering, reconstruction and typing of plasmids from draft assemblies. *Microbial Genomics*, *4*(8), e000206. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000206>
- Shen, C., Zhong, L. L., Yang, Y., Doi, Y., Paterson, D. L., Stoesser, N., Ma, F., El-Sayed Ahmed, M. A. E. G., Feng, S., Huang, S., Li, H. Y., Huang, X., Wen, X., Zhao, Z., Lin, M., Chen, G., Liang, W., Liang, Y., Xia, Y., ... Tian, G. B. (2020). Dynamics of *mcr-1* prevalence and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* after the cessation of colistin use as a feed additive for animals in China: a prospective cross-sectional and whole genome sequencing-based molecular epidemiological study. *The Lancet Microbe*, *1*(1), e34–e43. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(20\)30005-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(20)30005-7)
- Sheppard, S. K., Didelot, X., Méric, G., Torralbo, A., Jolley, K. A., Kelly, D. J., Bentley, S. D., Maiden, M. C. J., Parkhill, J., i Falush, D. (2013). Genome-wide association study identifies vitamin B5 biosynthesis as a host specificity factor in *Campylobacter*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(29), 11923–11927. <https://doi.org/10.1073/pnas.1305559110>
- Shin, D. Y., Yi, D. Y., Jo, S., Lee, Y. M., Kim, J. H., Kim, W., Park, M. R., Yoon, S. M., Kim, Y., Yang, S., i Lim, I. S. (2020). Effect of a new *Lactobacillus plantarum* product, LRCC5310, on clinical symptoms and virus reduction in children with rotaviral enteritis. *Medicine*, *99*(38), e22192. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022192>
- Spronk, T., Green, A. L., Vuolo, M., Ruesch, L., Edler, R., Haley, C., Scaria, J., Hennings, J., Dee, S., i Shivley, C. B. (2023). Antimicrobial use and antimicrobial resistance monitoring in pig production in the United States of America. *Revue scientifique et*

technique (*International Office of Epizootics*), 42, 52–64.  
<https://doi.org/10.20506/RST.42.3348>

Sun, J., Fang, L. X., Wu, Z., Deng, H., Yang, R. S., Li, X. P., Li, S. M., Liao, X. P., Feng, Y., i Liu, Y. H. (2017). Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a Unique Pattern in the *mcr-1* Acquisition. *Scientific Reports*, 7(1), 424.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-00095-x>

Valles-Colomer, M., Blanco-Míguez, A., Manghi, P., Asnicar, F., Dubois, L., Golzato, D., Armanini, F., Cumbo, F., Huang, K. D., Manara, S., Masetti, G., Pinto, F., Piperni, E., Punčochář, M., Ricci, L., Zolfo, M., Farrant, O., Goncalves, A., Selma-Royo, M., ... Segata, N. (2023). The person-to-person transmission landscape of the gut and oral microbiomes. *Nature*, 614(7946), 125–135. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05620-1>

Valles-Colomer, M., Falony, G., Darzi, Y., Tigchelaar, E. F., Wang, J., Tito, R. Y., Schiweck, C., Kurilshikov, A., Joossens, M., Wijmenga, C., Claes, S., Van Oudenhove, L., Zhernakova, A., Vieira-Silva, S., i Raes, J. (2019). The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nature Microbiology*, 4(4), 623–632.  
<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0337-x>

Vidal, A., Aguirre, L., Seminati, C., Tello, M., Redondo, N., Martín, M., i Darwich, L. (2020). Antimicrobial Resistance Profiles and Characterization of *Escherichia coli* Strains from Cases of Neonatal Diarrhea in Spanish Pig Farms. *Veterinary Sciences*, 7(2), 48.  
<https://doi.org/10.3390/vetsci7020048>

Vidal, A., Martín-Valls, G. E., Tello, M., Mateu, E., Martín, M., i Darwich, L. (2019). Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain. *Veterinary Microbiology*, 237(9), 108419. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.108419>

Vieira-Silva, S., Falony, G., Belda, E., Nielsen, T., Aron-Wisnewsky, J., Chakaroun, R., Forslund, S. K., Assmann, K., Valles-Colomer, M., Nguyen, T. T. D., Proost, S., Prifti, E., Tremaroli, V., Pons, N., Le Chatelier, E., Andreelli, F., Bastard, J. P., Coelho, L. P., Galleron, N., ... Raes, J. (2020). Statin therapy is associated with lower prevalence of gut microbiota dysbiosis. *Nature*, 581(7808), 310–315. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2269-x>

- Vieira-Silva, S., Sabino, J., Valles-Colomer, M., Falony, G., Kathagen, G., Caenepeel, C., Cleynen, I., van der Merwe, S., Vermeire, S., i Raes, J. (2019). Quantitative microbiome profiling disentangles inflammation- and bile duct obstruction-associated microbiota alterations across PSC/IBD diagnoses. *Nature Microbiology*, 4(11), 1826–1831. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0483-9>
- Vrancianu, C. O., Popa, L. I., Bleotu, C., i Chifiriuc, M. C. (2020). Targeting Plasmids to Limit Acquisition and Transmission of Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology*, 11, 761. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00761>
- Wang, Y., Sun, D., Xu, Z., Jiao, X., i Chen, X. (2024). Mobile Colistin Resistance and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Escherichia coli from China, 1993-2019. *Foodborne Pathogens and Disease*, 21(7), 416–423. <https://doi.org/10.1089/fpd.2023.0158>
- Wu, R., Yi, L. X., Yu, L. F., Wang, J., Liu, Y., Chen, X., Lv, L., Yang, J., i Liu, J. H. (2018). Fitness advantage of mcr-1-bearing IncI2 and IncX4 plasmids in vitro. *Frontiers in Microbiology*, 9(2), 331. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00331>
- Zhou, X., Qiao, M., Su, J.-Q., Wang, Y., Cao, Z.-H., Cheng, W.-D., i Zhu, Y.-G. (2019). Turning pig manure into biochar can effectively mitigate antibiotic resistance genes as organic fertilizer. *The Science of the Total Environment*, 649, 902–908. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.08.368>

## CONCLUSIONS

1. Among the enteric pathogens associated with the onset of post-weaning diarrhea in pigs in Catalonia, rotavirus A has been the primary cause directly linked to sick animals. Other pathogens investigated, such as porcine epidemic diarrhea virus, *Escherichia coli*, and *Clostridioides difficile*, were found in equal proportions in both diarrheic and healthy animals under the studied conditions, thus questioning their role in disease development.
2. *Escherichia coli* classical virulence factors have been detected at similar frequencies in animals with and without diarrhea, raising doubts about their role in disease development in field conditions and highlighting the need to search for or update other involved factors.
3. The composition of the intestinal microbiota varies greatly among the animals and farms analyzed, making it difficult to extrapolate the results of individual studies to field conditions. Nevertheless, this study observed the protective effect of the *Ruminococcaceae* family against diarrhea in transitioning piglets, as well as the effect of the *Lactobacillus* genus against rotavirus A infection.
4. *Escherichia coli* strains isolated from weaned pigs were phenotypically resistant to most category D and C antibiotics, as well as to restricted-use category B antimicrobials such as quinolones and colistin. Diarrheic animals presented higher levels of multi-resistant strains compared to their healthy counterparts, suggesting that the use of antimicrobials may not be the best option for treating diarrhea during transition.
5. Whole genome characterization of porcine *Escherichia coli* strains has identified antibiotic resistance genes considered critically important to public health, such as third-generation cephalosporins, quinolones, and colistin. In contrast, resistance genes to other critical antibiotics that confer resistance to carbapenems or tigecycline, described in other countries, have not been detected in Catalonia.
6. Antibiotic resistance genes are mainly located on plasmids, while heavy metal tolerance genes are primarily found on the chromosome. Co-localization of both on the same plasmid is very rare, and in these cases, mercury tolerance genes (an environmental contaminant) predominate. Therefore, co-localization does not appear to be the mechanism by which heavy metals co-select for antibiotic resistance.

7. The colistin resistance gene *mcr-4* is exclusively located on the ColE10 plasmid, which may present a new opportunity for controlling this gene as a therapeutic target.
8. A global study of *E. coli* genomes carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from human and livestock isolates indicates that this gene is found on three specific plasmids (IncI2, IncX4, IncHI2), with their prevalence differing between the Asian continent (IncI2) and Europe (IncX4).
9. The restriction on the use of colistin has led to divergent evolution of the *mcr-1* genomic context between Asia and Europe, suggesting that each region should be studied separately.

## CONCLUSIONS

1. Entre els agents patògens entèrics relacionats amb la aparició de diarrea en el post-deslletament de porcs en Catalunya, el rotavirus A ha estat la causa principal directament associada amb animals malalts. La resta de patògens investigats, virus de la diarrea epidèmica porcina, *Escherichia coli* i *Clostridioides difficile*, es van trobar amb la mateixa proporció en animals amb diarrea i en animals sans en les condicions estudiades, qüestionant així el seu paper en el desenvolupament de la malaltia.
2. Els factors clàssics de virulència per l' *Escherichia coli* s'han detectat en freqüències similars en animals amb i sense diarrea, posant en dubte el seu rol en el desenvolupament de la malaltia a nivell de camp i fent palesa de la necessitat de buscar o actualitzar altres factors involucrats.
3. La composició de la microbiota intestinal es molt variada entre els animals i les granges analitzades, resultant difícil extrapolar els resultats d'estudis individuals a les condicions de camp. Tot i així, en aquest estudi es va observar l'efecte protector de la família *Ruminococcaceae* enfront a la diarrea en garrins de transició i l'efecte del gènere *Lactobacillus* enfront a la infecció per Rotavirus A.
4. Les soques d'*E. coli* aïllades de porcs deslletats, van ser fenotípicament resistents a la majoria d'antibiòtics de categoria D i C, però també d'antimicrobians d'ús restringit de categoria B, com quinolones i colistina. Els animals amb diarrea van presentar uns nivells més alts de soques multi-resistents que els seus companys sans, la qual cosa indica que l'ús d'antimicrobians poden no ser la millor opció per al tractament de la diarrea a les transicions.
5. La caracterització del genoma complet de les soques porcines d'*E. coli* ha detectat gens de resistència a antibiòtics considerats d'importància crítica per a la salut pública, com les cefalosporines de tercera generació, les quinolones o la colistina. Per contra gens de resistència a altres antibiòtics crítics que confereixen resistència als carbapenems o la tigeiclina descrits en altres països, no s'han detectat a Catalunya.
6. Els gens de resistència als antibiòtics es troben majoritàriament localitzats en plasmidis, mentre que els gens de tolerància als metalls pesants es troben principalment en el cromosoma. La co-localització d'ambdós compostos en un mateix plasmidi és molt poc freqüent i, en aquests casos, predominen els gens de tolerància al mercuri (un contaminant

ambiental) de manera que la co-localització no sembla ser el mecanisme de co-selecció d'antibiorresistències dels metalls pesants.

7. El gen de resistència a la colistina *mcr-4* es troba localitzat únicament en el plasmidi ColE10, la qual cosa pot obrir una nova porta pel control d'aquest gen com a target terapèutic.

8. L'estudi a nivell mundial de genomes d'*E. coli* amb el gen de resistència a la colistina *mcr-1* a partir d'aïllats humans i d'animals de producció indiquen que aquest gen es troba localitzat en tres plasmidis concrets (IncI2, IncX4, IncHI2) i que les seves prevalències difereixen entre el continent asiàtic (IncI2) i l' europeu (IncX4).

9. La restricció de l'ús de la colistina ha derivat en una evolució divergent del context genòmic de *mcr-1* entre Àsia i Europa, per la qual cosa cada regió s'ha d'estudiar per separat.

# APÈNDIX





## PUBLICACIONES

Els resultats d'aquesta tesi han estat publicats a les següents revistes:

**Garcias B**, Flores MA, Fernández M, Monteith W, Pascoe B, Sheppard SK, Martín M, Cortey M, Darwich L. Global Variation in *Escherichia coli mcr-1* Genes and Plasmids from Animal and Human Genomes Following Colistin Usage Restrictions in Livestock. *Antibiotics*. 2024; 13(8):759. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080759>

**Garcias B**, Migura-Garcia L, Giler N, Martín M, Darwich L. Differences in enteric pathogens and intestinal microbiota between diarrheic weaned piglets and healthy penmates. *Veterinary Microbiology*. 2024; 295:110162. <https://doi:10.1016/j.vetmic.2024.110162>

**Garcias B**, Martín M, Darwich L. Characterization of Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Diarrheic and Healthy Weaned Pigs in Catalonia. *Animals*. 2024; 14(3):487. <https://doi.org/10.3390/ani14030487>

### Altres publicacions

Fernández M, **Garcias B**, Duran I, Molina-López RA, Darwich L. Current Situation of Bacterial Infections and Antimicrobial Resistance Profiles in Pet Rabbits in Spain. *Veterinary Sciences*. 2023; 10(5):352. <https://doi.org/10.3390/vetsci10050352>

Muñoz-Ibarra E, Molina-López RA, Durán I, **Garcias B**, Martín M, Darwich L. Antimicrobial Resistance in Bacteria Isolated from Exotic Pets: The Situation in the Iberian Peninsula. *Animals*. 2022; 12(15):1912. <https://doi.org/10.3390/ani12151912>

Mengistu TS, **Garcias B**, Castellanos G, Seminati C, Molina-López RA, Darwich L. Occurrence of multidrug resistant Gram-negative bacteria and resistance genes in semi-aquatic wildlife - *Trachemys scripta*, *Neovison vison* and *Lutra lutra* - as sentinels of environmental health. *Science of The Total Environment*. 2022;830:154814. <https://doi:10.1016/j.scitotenv.2022.154814>

**Garcias B**, Aguirre L, Seminati C, Reyes N, Allepuz A, Obón E, Molina-Lopez RA, Darwich L. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactam Resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Wild European Hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) Living in Populated Areas. *Animals*. 2021; 11(10):2837. <https://doi.org/10.3390/ani11102837>

Darwich L, Seminati C, López-Olvera JR, Vidal A, Aguirre L, Cerdá M, **Garcias B**, Valldeperes M, Castillo-Contreras R, Migura-Garcia L, Conejero C, Mentaberre G. Detection of Beta-Lactam-Resistant *Escherichia coli* and Toxigenic *Clostridioides difficile* Strains in Wild Boars Foraging in an Anthropization Gradient. *Animals*. 2021; 11(6):1585. <https://doi.org/10.3390/ani11061585>

### **Aportacions a congressos**

#### **Comunicacions orals**

**Garcias B**, Monteith W, Aguirre A, Vidal A, Pascoe B, Sheppard SK, Martin M, Darwich L. Whole genome sequencing of *Escherichia coli* isolates from pigs to detect antimicrobial, metal and biocide resistance genes in Catalonia. European Symposium of Porcine Health Management 2023. Thessaloniki.

**Garcias B**. Cambios en la microbiota asociados a la diarrea posdeste. XXV Jornades de porcí UAB .2023. Bellaterra.

**Garcias B**, Giler N, Migura L, Martin M, Darwich L. Changes in intestinal microbiota comparing healthy and diarrheic weaned pigs in Catalonian farms. 6th Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 2022. Sevilla.

**Garcias B**, Seminati C, Vidal A, Martin M, Darwich L. Case control study of prevalence of enteric pathogens in Catalonian farms with postweaning diarrhea. 6th Congress of the European Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians. 2022. Sevilla.

#### **Pòsters**

**Garcias B**, Giler N, Migura L, Martin M, Darwich L. Comparison of intestinal microbiota changes and prevalence of pathogens between healthy and diarrheic weaned pigs. European Symposium of Porcine Health Management 2023. Thessaloniki.

**Garcias B**, Flores MA, Fernández M, Mourkas E, Sheppard SK, Martin M, Cortey M, Darwich L. Global colistin-resistance *mcr-1* plasmid epidemiology: mystooking the part for the whole, or how Asia does not mean the whole world. ESCMID GLOBAL 2024. Barcelona