



Universitat Autònoma de Barcelona

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:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

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:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

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>

Agents infecciosos implicats en brots de diarrea
neonatal porcina en granges de Catalunya

Anna Vidal Ordeig

Tesi doctoral

Bellaterra, 2019



Universitat Autònoma de Barcelona

Agents infecciosos implicats en brots de diarrea neonatal porcina en granges de Catalunya

Tesi doctoral presentada per l'**Anna Vidal Ordeig** per accedir al grau de Doctora 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, 2019.



FACULTAT DE VETERINÀRIA

Laila Darwich Soliva i Margarita Martín Castillo, professores del Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals de la Facultat de Veterinària

Fan constar:

Que la memòria titulada: "**Agents infecciosos implicats en brots de diarrea neonatal porcina en granges de Catalunya**", presentada per l'**Anna Vidal Ordeig** 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 per a que consti als efectes oportuns, signem la present declaració a Bellaterra, 2 d'abril de 2019:

Dra. Laila Darwich

Dra. Margarita Martín

Anna Vidal

Directora

Directora

Doctoranda

Els estudis de doctorat de l'Anna Vidal Ordeig han estat finançats amb la beca *Personal Investigador en Formació* (PIF) de la Universitat Autònoma de Barcelona durant 3 anys.

Part d'aquesta tesi ha estat finançada pel projecte INIA E-RTA2015-00003-C02-01.

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

TAULA DE CONTINGUTS

LLISTAT D'ABREVIACIONS	v
RESUM	vii
RESUMEN	xi
SUMMARY	xv
PUBLICACIONS	xix

PART I: Introducció general i objectius

INTRODUCCIÓ GENERAL.....	3
1. Introducció a la diarrea neonatal porcina	3
1.1 Definició i característiques generals	3
1.2. Factors de risc associats	4
2. Agents infecciosos relacionats amb la diarrea neonatal	6
2.1 Rotavirus	6
2.2 Coronavirus: PEDV i TGEV.....	10
2.2.1 Virus de la Diarrea Epidèmica Porcina.....	11
2.2.2 Virus de la Gastroenteritis Transmissible.....	13
2.3 <i>Escherichia coli</i>	14
2.3.1 <i>E.coli</i> enterotoxigènic (ETEC).....	16
2.3.2 <i>E.coli</i> enteropatogènic (EPEC).....	18
2.3.3 <i>E.coli</i> productor de toxines Shiga (STEC/VTEC).....	18
2.4 <i>Clostridium perfringens</i>	20
2.4.1 <i>C. perfringens</i> tipus A	21
2.4.2 <i>C. perfringens</i> tipus C.....	22
2.5 <i>Clostridium difficile</i>	23
2.6 Altres agents infecciosos	26
2.6.1 Agents vírics.....	26
2.6.2 Agents bacterians.....	27
2.6.3 Agents parasitaris.....	27
3. Causes no infeccioses de diarrea neonatal	28
4. Diagnòstic dels patògens involucrats en la diarrea neonatal	29

4.1 Diagnòstic clínic i diferencial.....	29
4.2 Diagnòstic laboratorial.....	30
4.2.1 Microbiologia.....	31
4.2.2 Biologia molecular.....	32
4.2.3 Tècniques immunològiques.....	34
4.2.4 Aïllament víric.....	34
5. Tractament de les diarrees d'origen infecciós	35
5.1 Tractament simptomàtic.....	35
5.2. Tractament antimicrobià.....	36
5.2.1. Resistència antimicrobianes.....	36
5.2.1.1 Mecanismes de resistència.....	37
5.2.1.2 Gens de resistència als beta-lactàmics i a la colistina.....	39
6. Profilaxi de les diarrees neonatals	42
BIBLIOGRAFIA INTRODUCCIÓ	45
OBJECTIUS.....	65

PART II: Estudis

ESTUDI 1: Prevalence of enteric pathogens in outbreaks of diarrhea in Spain comparing healthy and diarrheic cases	69
1. Introduction	71
2. Materials and methods	72
2.1 Sampling.....	72
2.2 Microbiological testing.....	73
2.3 Molecular diagnosis of bacterial agents.....	73
2.4 Molecular diagnosis of viral agents.....	75
3. Results	76
3.1 Overall prevalence of enteric pathogens in the diarrheic cases.....	76
3.2 Prevalence and combination of enteric pathogens at farm level.....	79
3.3 Comparison of diarrheic and healthy cases.....	80
4. Discussion	85
5. Acknowledgements	88
6. References	89

ESTUDI 2: Full-genome characterization by deep sequencing of rotavirus A isolates from outbreaks of neonatal diarrhea in pigs in Spain.	93
1. Introduction	95
2. Materials and methods	97
2.1 Case selection and samples.....	97
2.2 RNA extraction and whole genome sequencing.....	97
2.3 Strain genotyping and phylogenetic analyses.....	98
2.4 Temporary estimation of the introduction.....	99
2.5 RVA epitope identification and vaccine comparison.....	100
2.6 Metagenomic analyses.....	100
3. Results	100
3.1 RVA full-genome genotypes.....	100
3.2 Phylogenetic and evolutionary analysis.....	102
3.3 Temporary estimation of the introduction.....	104
3.4 Comparison of amino acid sequences in the neutralizing epitopes.....	105
4. Discussion	108
5. References	110
ESTUDI 3: Antimicrobial resistance profiles and characterization of <i>Escherichia coli</i> strains from cases of neonatal diarrhea in spanish pig farms	115
1. Introduction	117
2. Materials and methods	118
2.1 Microbiological testing.....	118
2.2 Characterization of <i>E. coli</i> virulence factors.....	119
2.3 Antimicrobial resistance phenotyping analyses.....	119
2.4 Genetic characterization of antimicrobial resistance genes.....	120
2.5 Statistical analysis.....	120
3. Results	123
3.1 Microbiological identification and characterization of <i>E.coli</i> isolates.....	123
3.2 Antimicrobial resistance phenotyping and genotyping.....	124
4. Discussion	128
5. Annex	132
6. Acknowledgements	133
7. References	134

PART III: Discussió general i conclusions	141
DISCUSSIÓ GENERAL.....	143
CONCLUSIONS.....	153
BIBLIOGRAFIA DISCUSSIÓ.....	155

LLISTAT D'ABREVIACIONS

ATP	Trifosfat d'Adenosina
BLEE	Beta-lactamasa d'espectre estès (ESBL en anglès)
CDI	Infecció per <i>Clostridium difficile</i>
CMI	Concentració Mínima Inhibidora (MIC en anglès)
CpA	<i>Clostridium perfringens</i> tipus A
CpC	<i>Clostridium perfringens</i> tipus C
Cpe	Enterotoxina de <i>Clostridium perfringens</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
<i>eae</i>	Gen de la intimina
EAST1	Toxina termoestable enteroagregativa d' <i>Escherichia coli</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorràgic
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogènic
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigènic
F	Tipus fimbrial
LT	Toxina termolàbil d' <i>Escherichia coli</i>
NSP	Proteïna no estructural
PCR	Reacció en cadena de la polimerasa
PEDV	Virus de la diarrea epidèmica porcina
PKC	Proteïna-cinasa C

PRCV	Coronavirus respiratori porcí
RNA	Àcid ribonucleic
RV	Rotavirus
STa	Toxina termoestable A d' <i>Escherichia coli</i>
STb	Toxina termoestable B d' <i>Escherichia coli</i>
TcdA	Toxina A de <i>C. difficile</i>
TcdB	Toxina B de <i>C. difficile</i>
TGEV	Virus de la gastroenteritis transmissible
VP	Proteïna vírica
VT1/Stx1	Toxina Vero 1/ Toxina Shiga 1
VT2/Stx2	Toxina Vero 2/ Toxina Shiga 2
VTEC/STEC	<i>Escherichia coli</i> productor de toxina Verocitotòxica/ <i>Escherichia coli</i> productor de toxina Shiga

RESUM

La diarrea neonatal porcina constitueix una de les problemàtiques, tant a nivell sanitari com a nivell econòmic, més freqüents a les granges de porcs d'arreu del món. Malgrat que els brots de diarrea neonatal porcina poden estar ocasionats per múltiples factors, la causa més habitual és la presència de patògens entèrics. Existeixen molts agents infecciosos capaços de provocar diarrea en garrins nous i el diagnòstic definitiu és sovint complex degut a la presència de diversos microorganismes en una mateixa mostra. Per aquesta raó, l'objectiu principal de la present tesi va ser analitzar quins agents infecciosos estaven involucrats de forma més habitual en els brots de diarrea neonatal porcina en granges de Catalunya produïts entre 2017 i 2018.

L'objectiu del primer estudi va ser el càlcul de la prevalença de diversos agents infecciosos a partir de mostres provinents de granges que patien un brot de diarrea neonatal. Es van analitzar mostres de 31 granges, de les quals es van obtenir 303 mostres de femta. En dotze d'aquestes granges només va ser possible mostrejar animals amb signes clínics de diarrea (n=75). En les 19 granges restants es va recollir femta tant d'animals clínicament diarreics (n=140) com de companys de covada aparentment sense diarrea, que es van considerar controls (n=88). Cadascuna de les mostres obtingudes va ser testada per detectar la presència de Rotavirus A, Rotavirus B, Rotavirus C, Virus de la diarrea epidèmica porcina, Virus de la gastroenteritis transmissible, *Escherichia coli* i les seves toxines (LT, Sta, Stb, EAST1, VT1, VT2) i adhesines (F4, F5, F6, F18, F41 i *eae*), *Clostridium perfringens* de tipus A (toxina α) i de tipus C (toxina β), així com també la presència de la toxina β_2 , i *Clostridium difficile* i les seves toxines (TcdA i TcdB). Rotavirus A va resultar ser l'únic patògen que es va poder correlacionar estadísticament amb l'aparició de diarrea. Els altres virus i bacteris analitzats no presentaven diferències significatives entre els resultats obtinguts en el grup diarrea i en el grup control. Malgrat això, l'anàlisi individual de cadascuna de les granges de l'estudi va indicar que altres agents com Rotavirus B, Rotavirus C, *C. difficile* toxigènic o *E. coli* patogènic podien tenir un paper rellevant en el brot de diarrea.

L'objectiu del segon estudi era caracteritzar diverses de les soques de Rotavirus A obtingudes de mostres del primer estudi, a través d'anàlisis genotípics i filogenètics. Es van seleccionar les 24 mostres amb major càrrega vírica, segons els resultats obtinguts mitjançant una PCR quantitativa a temps real. Es va extreure l'ARN d'aquestes mostres amb TRIzol i es va enviar al Servei de genòmica i bioinformàtica de la Universitat Autònoma de Barcelona, on es va realitzar una seqüenciació massiva utilitzant la plataforma Illumina Miseq per a cadascuna de les mostres. Els resultats obtinguts es van comparar i alinear amb seqüències de referència per a cadascun dels 11 gens que conformen el genoma dels rotavirus, de manera que, de cada mostra, es va obtenir una quasi-espècie per a cadascun d'aquests gens. Per tal d'establir a quin genotip pertanyia cadascun dels gens de les mostres, les quasi-espècies de cada gen es van comparar amb seqüències ja publicades al GenBank, utilitzant l'eina *BLASTn search suite*. Els resultats del genotipat van indicar que les 24 soques compartien un nucli comú, ja que 9 de les 11 proteïnes analitzades pertanyien al mateix genotip. Per contra, les proteïnes més externes del rotavirus, VP4 i VP7, presentaven una gran diversitat. En el cas de VP4, es van detectar 5 genotips diferents: el majoritari va ser P23 (16/24), seguit de P7 (4/24), P13 (2/24) i P19 (2/24). En una de les mostres classificada com a P23 també es va determinar el genotip P28 i probablement es tractava d'una co-infecció. Pel que fa a VP7, les soques es van classificar en quatre genotips diferents, sent G9 el majoritari (14/24), seguit de G3 (5/24), G4 (3/24) i G5 (2/24). Aquesta marcada variabilitat en els genotips de les proteïnes més externes del virus, juntament amb la manca de variabilitat del nucli intern del virus, suggeria que la diversificació de les proteïnes VP4 i VP7 s'havia produït en molt poc temps.

Per altra banda, els anàlisis filogenètics es van dur a terme comparant les seqüències de les quasi-espècies de les proteïnes més conservades del rotavirus, VP1, VP6 i NSP5, amb les ja publicades a GenBank. Els arbres filogenètics obtinguts van indicar que totes les mostres analitzades en aquest estudi pertanyien a una única branca evolutiva.

Aquests resultats suggerien que s'havia produït l'entrada d'una soca "parental", possiblement de genotip G9P23, que no era a Catalunya anteriorment, i que s'havia diversificat en poc temps.

Finalment, es va estimar una data d'introducció d'aquesta soca "parental", utilitzant el software BEAST, basat en el càlcul de la taxa de mutació diària de les proteïnes més conservades del virus (VP1, VP6 i NSP5). Els resultats obtinguts indicaven que la data aproximada d'introducció del virus a Catalunya havia estat entre 9 i 11 mesos abans del primer mostreig de l'estudi, i per tant, s'estimava que l'entrada s'havia produït entre el març i el maig del 2016.

El tercer treball es va basar en l'estudi de resistències antimicrobianes de les soques d'*Escherichia coli* obtingudes de mostres de femta de garrins amb diarrea o sense del primer estudi. En l'anàlisi microbiològic, es van seleccionar les plaques d'agar MacConkey en què, morfològicament, només hi hagués un tipus de colònia. Posteriorment, es confirmava que les colònies seleccionades fossin *E. coli* mitjançant proves bioquímiques, i es congelaven amb glicerol a -80°C. Finalment, es van obtenir 122 aïllats d'*E. coli*, dels quals 94 eren d'animals clínicament diarreics i 28 eren d'animals aparentment sans. Per cadascuna de les soques es va fer un antibiograma qualitatiu a través de la tècnica de difusió de disc o Kirby-Bauer front a 21 agents antimicrobians, un antibiograma quantitatiu a través de la tècnica de CMI front a la colistina i, finalment, un anàlisi genotípic de diversos gens de resistència als beta-lactàmics (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY1}, *bla*_{CMY2}) i a la colistina (*mcr-1* a *mcr-5*).

Els resultats obtinguts en l'antibiograma qualitatiu van mostrar uns nivells de resistència a la majoria de famílies d'antibiòtics molt elevats. El 97,5% de les soques presentava resistència a 3 o més antimicrobians, i el 30% d'aquestes, en presentava a més de 7. Els percentatges de resistència més elevats es van trobar front a les sulfonamides (87%), les tetraciclins (87%) i les aminopenicil·lins (80%). En la comparativa entre animals amb diarrea i animals aparentment sans, es van observar diferències estadísticament significatives pel que fa a la resistència a la ciprofloxacina, l'enrofloxacina, la flumequina, la gentamicina i la neomicina. Les soques d'*E. coli* aïllades d'animals diarreics estaven estadísticament correlacionades amb la resistència a aquests antimicrobians.

Pel que fa a la presència de gens de resistència en les soques estudiades, l'únic gen de BLEE detectat va ser *bla*_{CTX-M}, que es va aïllar en 28 soques (23%). Previsiblement, les soques CTX-M+ eren estadísticament més resistents als beta-lactàmics testats (amoxicil·lina/àcid clavulànic, ceftiofur, cefalexina, cefquinoma i ceftriaxona) que les soques CTX-M-, però aquest fenomen també es va observar en el cas de les quinolones testades (ciprofloxacina, enrofloxacina, flumequina) i de la gentamicina.

En el cas de la colistina, els resultats obtinguts pels diferents mètodes van ser desiguals: amb l'antibiograma qualitatiu es van detectar 8 soques resistents a la colistina, mentre que amb l'antibiograma quantitatiu se'n van detectar 6, i només una soca va ser detectada com a resistent els dos mètodes. Finalment, es van detectar 4 soques que contenien el gen de resistència *mcr-1*, una de les quals era resistent pels dos mètodes.

Com a conclusió, els resultats de la present tesi mostren que, en l'actualitat, Rotavirus A és especialment rellevant en els brots de diarrea neonatal, tot i que no és possible descartar la contribució cap de les altres causes, infeccioses i no-infeccioses, sense un bon diagnòstic. També destaquen que *E. coli* és un bon indicador de l'estat de les resistències antimicrobianes presents en la microbiota dels porcs. Els resultats mostren alts valors de resistència als antimicrobians més habituals en la producció porcina, així com la presència de gens de resistència a beta-lactàmics i a la colistina, transmissibles a través de plasmidis entre poblacions bacterianes.

RESUMEN

La diarrea neonatal porcina constituye una de las problemáticas, tanto a nivel sanitario como a nivel económico, más frecuentes en las granjas de cerdos en todo el mundo. A pesar de que los brotes de diarrea neonatal porcina pueden estar ocasionados por múltiples factores, la causa más habitual es la presencia de patógenos entéricos. Existen muchos agentes infecciosos capaces de provocar diarrea en lechones neonatos y el diagnóstico definitivo es a menudo complejo debido a la presencia de varios microorganismos en una misma muestra. Por esta razón, el objetivo principal de la presente tesis fue analizar qué agentes infecciosos estaban involucrados de forma más habitual en los brotes de diarrea neonatal porcina en granjas de Catalunya producidos entre 2017 y 2018.

El objetivo del primer estudio fue el cálculo de la prevalencia de varios agentes infecciosos a partir de las muestras procedentes de granjas que sufrían un brote de diarrea neonatal. Se analizaron muestras de 31 granjas, de las cuales se obtuvieron 303 muestras de heces. En doce de estas granjas solo fue posible tomar muestras de animales con signos clínicos de diarrea (n=75). En las 19 granjas restantes se recogieron heces tanto de animales clínicamente diarreicos (n=140) como de compañeros de camada aparentemente sin diarrea, que se consideraron controles (n=88). Cada una de las muestras obtenidas fue analizada para detectar la presencia de Rotavirus A, Rotavirus B, Rotavirus C, Virus de la diarrea epidémica porcina, Virus de la gastroenteritis transmisible, *Escherichia coli* y sus toxinas (LT, Sta, Stb, EAST1, VT1, VT2) y adhesinas (F4, F5, F6, F18, F41, *eae*), *Clostridium perfringens* de tipo A (toxina α) y de tipo C (toxinas α y β), así como también la presencia de la toxina β_2 , y *Clostridium difficile* y sus toxinas (TcdA y TcdB). Rotavirus A resultó ser el único patógeno que se pudo correlacionar estadísticamente con la aparición de diarrea. Los otros virus y bacterias analizados no presentaban diferencias significativas entre los resultados obtenidos en el grupo diarrea y en el grupo control. A pesar de esto, el análisis individual de cada una de las granjas del estudio indicó que otros agentes como Rotavirus B,

Rotavirus C, *C. difficile* toxigénico o *E. coli* podían tener un papel relevante en el brote de diarrea.

El objetivo del segundo estudio era caracterizar varias de las cepas de Rotavirus A obtenidas de muestras del primer estudio, a través de análisis genotípicos y filogenéticos. Se seleccionaron las 24 muestras con mayor carga vírica, según los resultados obtenidos mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se extrajo el ARN de estas muestras con TRIzol y se envió a secuenciar al Servicio de Genómica y Bioinformática de la Universitat Autònoma de Barcelona, donde se realizó una secuenciación masiva utilizando la plataforma Illumina Miseq para cada una de las muestras. Los resultados obtenidos se compararon y alinearon con secuencias de referencia para cada uno de los 11 genes que conforman el genoma del rotavirus, de manera que, de cada muestra, se obtuvo una cuasi-especie para cada uno de estos genes. Para establecer a qué genotipo pertenecía cada uno de los genes de las muestras, las cuasi-especies de cada gen se compararon con secuencias ya publicadas en GenBank, utilizando la herramienta *BLASTn search suite*. Los resultados del genotipado indicaron que las 24 cepas analizadas compartían un núcleo común, ya que 9 de las 11 proteínas analizadas pertenecían al mismo genotipo. Por el contrario, las proteínas más externas del rotavirus, VP4 y VP7, presentaban una gran diversidad. En el caso de VP4, se detectaron 5 genotipos diferentes: el mayoritario fue P23 (16/24), seguido de P7 (4/24), P13 (2/24) y P19 (2/24). En una de las muestras clasificada como P23 también se determinó el genotipo P28 y probablemente se tratase de una coinfección. En cuanto a VP7, las cepas se clasificaron en cuatro genotipos diferentes, siendo G9 el mayoritario (14/24), seguido de G3 (5/24), G4 (3/24) y G5 (2/24). Esta marcada variabilidad en los genotipos de las proteínas más externas, junto con la ausencia de variabilidad del núcleo interno del virus, sugería que la diversificación de las proteínas VP4 y VP7 se había producido en muy poco tiempo.

Por otro lado, los análisis filogenéticos se llevaron a cabo comparando las secuencias de las cuasi-especies de las proteínas más conservadas del rotavirus, VP1, VP6 y NSP5, con las ya publicadas en GenBank. Los árboles filogenéticos obtenidos indicaron que todas las muestras analizadas en este estudio pertenecían a una sola rama evolutiva.

Estos resultados sugerían que se había producido la entrada de una cepa “parental”, posiblemente de genotipo G9P23, que no estaba presente anteriormente en Catalunya, y que se había diversificado en poco tiempo.

Finalmente, se estimó una fecha de introducción de esta cepa “parental”, utilizando el software BEAST, basado en el cálculo de la tasa de mutación diaria de las proteínas más conservadas del virus (VP1, VP6 y NSP5). Los resultados obtenidos indicaban que la fecha aproximada de introducción del virus a Catalunya había sido entre 9 y 11 meses antes del primer muestreo del estudio y por lo tanto, se estimaba que la entrada se había producido entre marzo y mayo de 2016.

El tercer trabajo se basó en el estudio de resistencias antimicrobianas de las cepas de *Escherichia coli* obtenidas de muestras de heces de lechones con diarrea o sin diarrea del primer estudio. En el análisis microbiológico, se seleccionaron las placas de agar MacConkey en que, morfológicamente, solo hubiera un tipo de colonia. Posteriormente, se confirmó que las colonias seleccionadas fuesen *E. coli* mediante pruebas bioquímicas, y se congelaron en glicerol a -80°C. Finalmente se obtuvieron 122 aislados de *E. coli*, de los cuales 94 eran de animales clínicamente diarreicos y 28 era de animales aparentemente sanos. Para cada una de las cepas, se realizó un antibiograma cualitativo, mediante la técnica de difusión de disco o Kirby-Bauer frente a 21 agentes antimicrobianos, un antibiograma cuantitativo a través de la técnica de CMI frente a la colistina, y finalmente, un análisis genotípico de varios genes de resistencia a los beta-lactámicos (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY1}, *bla*_{CMY2}) y a la colistina (*mcr-1* a *mcr-5*).

Los resultados obtenidos en el antibiograma cualitativo mostraron unos niveles de resistencia a la mayoría de familias de antibióticos muy elevados. El 97,5% de las cepas presentaba resistencia a 3 o más antimicrobianos, y el 30% de éstas, a más de 7. Los porcentajes de resistencia más elevados se encontraron frente a las sulfamidas (87%), las tetraciclinas (87%) y las aminopenicilinas (80%). En la comparativa entre animales con diarrea y animales aparentemente sanos, se observaron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la resistencia a la ciprofloxacina, la enrofloxacin, la flumequina,

la gentamicina y la neomicina. Las cepas de *E. coli* aisladas de animales diarreicos estaban estadísticamente correlacionadas con la resistencia a estos antimicrobianos.

En cuanto a la presencia de genes de resistencia en las cepas estudiadas, el único BLEE detectado fue *bla*_{CTX-M}, que se aisló de 28 cepas (23%). Previsiblemente, las cepas CTX-M⁺ eran estadísticamente más resistentes a los beta-lactámicos evaluados (amoxicilina/ácido clavulánico, ceftiofur, cefalexina, cefquinoma y ceftriaxona) que las cepas CTX-M⁻, pero este fenómeno también se observó en el caso de las quinolonas testadas (ciprofloxacina, enrofloxacin, flumequin) y de la gentamicina.

En el caso de la colistina, los resultados obtenidos por los distintos métodos fueron desiguales: mediante el antibiograma cualitativo se detectaron 8 cepas resistentes a la colistina mientras que, mediante el antibiograma cuantitativo, se detectaron 6, y solo una cepa fue detectada como resistente en los dos métodos. Finalmente, se detectaron 4 cepas que contenían el gen de resistencia *mcr-1*, una de las cuales era resistente por ambos métodos.

Como conclusión, los resultados de la presente tesis muestran que, en la actualidad, Rotavirus A es especialmente relevante en los brotes de diarrea neonatal, a pesar de que no es posible descartar la contribución de ninguna de las otras causas, infecciosas y no infecciosas, sin un buen diagnóstico. También destacan que *E. coli* es un buen indicador del estado de las resistencias a los antimicrobianos presentes en la microbiota de los cerdos. Los resultados muestran altos valores de resistencia a los antimicrobianos más habituales en la producción porcina, así como la presencia de los genes de resistencia a beta-lactámicos y a la colistina, transmisible a través de plásmidos entre poblaciones bacterianas.

SUMMARY

Porcine neonatal diarrhea is one of the most common health and economic problem in pig farms around the world. Although outbreaks of porcine neonatal diarrhea can be caused by multiple factors, the most frequent cause is the presence of enteric pathogens. There are many infectious agents that can cause diarrhea in newborn piglets, and the definitive diagnosis is often complex due to the presence of several microorganisms in the same sample. For this reason, the objective of this thesis was to analyze which infectious agents were most frequently involved in outbreaks of porcine neonatal diarrhea in farms in Catalonia.

The objective of the first study was to calculate the prevalence of several infectious agents from samples obtained from farms suffering an outbreak of neonatal diarrhea. Three hundred and three samples of feces from 31 farms were analyzed. In 12 of these farms, it was only possible to sample animals with clinical signs of diarrhea (n = 75). In the remaining 19 farms, feces were collected from both clinically diarrheal animals (n = 140) and pen-mates with apparently no diarrhea, which were considered controls (n = 88). Each of the samples obtained was tested to detect the presence of Rotavirus A, Rotavirus B, Rotavirus C, Porcine epidemic diarrhea virus, Transmissible gastroenteritis virus, *Escherichia coli* and its toxins (LT, Sta, Stb, EAST1, VT1, VT2) and adhesins (F4, F5, F6, F18, F41 and eae), *Clostridium perfringens* type A (toxin α) and type C (β toxin), as well as the presence of β 2 toxin, and *Clostridium difficile* and its toxins (TcdA and TcdB). Rotavirus A was the only pathogen that could be statistically correlated with the onset of diarrhea. The other viruses and bacteria analyzed did not present significant differences between the results obtained in the diarrhea group and in the control group. In spite of this, the individual analysis of each of the study farms indicated that other agents such as Rotavirus B, Rotavirus C, toxigenic *C. difficile* or *E. coli* could play a relevant role in the outbreak of diarrhea.

The objective of the second study was to characterize several of the rotavirus A strains obtained from samples from the first study, through genotypic and phylogenetic analysis. The 24 samples with the highest viral load were selected, according to the results obtained through a quantitative, real-time PCR. RNA was extracted from these samples using TRIzol and was sent to the Genomics and Bioinformatics Service of the Autonomous University of Barcelona, where deep sequencing was carried out using the Illumina Miseq platform for each sample. The results obtained were compared and aligned with reference sequences for each of the 11 genes that make up the rotavirus genome, so that, from each sample, a quasi-species was obtained for each of these genes. In order to establish to which genotype belonged each of the genes in the samples, the quasi-species of each gene were compared to sequences already published in GenBank, using the BLASTn search suite tool. The results of the genotyping indicated that the 24 strains shared a common core, since 9 of the 11 proteins analyzed belonged to the same genotype. By contrast, the most external proteins of the rotavirus, VP4 and VP7, presented a great diversity. For VP4, 5 different genotypes were detected: the most frequent was P23 (16/24), followed by P7 (4/24), P13 (2/24) and P19 (2/24). In one of the samples classified as P23, the P28 genotype was also determined, and probably it was due to a co-infection. Regarding VP7, strains were classified into four different genotypes, with G9 being the most common (14/24), followed by G3 (5/24), G4 (3/24) and G5 (2/24). This marked variability in the genotypes of the most external proteins of the virus, together with the lack of variability of the internal nucleus of the virus, suggested that the diversification of VP4 and VP7 proteins had occurred in a very short time.

On the other hand, phylogenetic analyses were carried out by comparing the sequences of the quasi-species of the most conserved proteins of rotavirus, VP1, VP6 and NSP5, with those already published in GenBank. The obtained phylogenetic trees indicated that all the samples analyzed in this study belonged to a single evolutionary branch.

These results suggested that the entry of a "parental" strain, possibly of G9P23 genotype that had not been present in Catalonia, had occurred, and that it had diversified in a short time.

Finally, an estimated date of entrance of this "parental" strain was estimated using the BEAST software, based on the calculation of the daily mutation rate of the most conserved virus proteins (VP1, VP6 and NSP5). The results obtained indicated that the approximate date of introduction of the virus had been between 9 and 11 months before the first sampling of the study, and therefore, it was estimated that the entry had occurred between March and May 2016.

The third work of this thesis was based on the study of antimicrobial resistance in strains of *Escherichia coli* obtained from feces from diarrheic and non-diarrheic piglets from the first study. In the microbiological analysis, MacConkey agar plates in which, morphologically, there was only one type of colony were selected. Once it was confirmed that the selected colonies were classified as *E. coli* by means of biochemical tests, the isolates were frozen with glycerol at -80°C. Finally, 122 *E. coli* isolates were obtained, from which 94 were from clinically diarrheic animals and 28 were of apparently healthy animals. For each of the strains, a qualitative antibiogram was performed using the disk diffusion or Kirby-Bauer test for 21 antimicrobial agents, a quantitative antibiogram using the MIC test for colistin, and finally, a genotypic analysis of several resistance genes coding for extended-spectrum beta-lactamases, or ESBLs, (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{CMY1}, *bla*_{CMY2}) and colistin (*mcr-1* to *mcr-5*).

The results obtained in the qualitative antibiogram showed high levels of resistance for most of the antimicrobial families. Most of the strains (97.5%) showed resistance to 3 or more antimicrobials, and 30% of them showed resistance to more than 7. The highest resistance rates were found in sulfonamides (87%), tetracyclines (87%) and aminopenicillins (80%). The comparison between diarrheic animals and apparently healthy animals showed statistically significant differences regarding ciprofloxacin, enrofloxacin, flumequine, gentamicin, and neomycin resistance. *E. coli* strains isolated from diarrheic animals were statistically correlated with resistance to these antimicrobials.

Regarding the presence of resistance genes in the studied strains, the only ESBL gene detected was *bla*_{CTX-M}, which was isolated in 28 strains (23%). Predictably, CTX-M⁺ strains

were statistically more resistant to the tested beta-lactams (amoxicillin / clavulanic acid, ceftiofur, cefalexin, cefquinoma and ceftriaxone) than the CTX-M^r strains, but this phenomenon was also observed in the case of the tested quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, flumequine) and gentamicin.

In the case of colistin, the results obtained by the different methods were unequal: using the qualitative antibiogram, 8 colistin-resistant strains were detected, whereas using the quantitative antibiogram, 6 resistant strains were detected, and only one was found resistant in the two methods. Finally, 4 strains containing the resistance gene *mcr-1* were detected, one of which was resistant by both methods.

In conclusion, the results of this thesis show that, at present, Rotavirus A is especially relevant in outbreaks of porcine neonatal diarrhea, although it is not possible to rule out any of the other causes, infectious and non-infectious, without a good diagnosis. The results also point out that *E. coli* is a good indicator of the state of the antimicrobial resistance in the pig microbiota. The results show high values of resistance to the most commonly used antimicrobials in pig production, as well as the presence of ESBL and colistin resistance genes, that can be transmitted through plasmids between bacterial populations.

PUBLICACIONS

Els resultats de la present tesi han estat publicats en la següent revista internacional:

Vidal, A., Clilverd, H., Cortey, M., Martín-Valls, G.E., Franzo, G., Darwich, L., Martín, M., Mateu, E., 2018. Full-genome characterization by Deep sequencing of Rotavirus A isolates from outbreaks of neonatal diarrhoea in pigs in Spain. *Vet. Microbiol.* 227, 12-19.

Altres publicacions

Vidal, A., Baldomà, L., Molina-López, R.A., Martín, M., Darwich, L., 2017. Microbiological diagnosis and antimicrobial sensitivity profiles in diseased free-living raptors. *Avian Pathol.* 46, 442-50.

Aportacions a congressos internacionals

Vidal, A., Albamonte, A., Casado, A., Casas, E., Closa, F., López-Béjar, M., Molina-López, R.A., Migura, L., Darwich, L. 2018. High prevalence of cephalosporin resistant Enterobacteriaceae with zoonotic potential in wildlife of Catalonia, poster. 13th European Wildlife Disease Association Congress. 28-31 Agost 2018, Làrissa (Grècia).

Vidal, A., Martín-Valls, G., Tello, T., Mateu, E., Martín, M., Darwich, L., 2018. Prevalence of enteric pathogens in outbreaks of neonatal diarrhea in pig farms of Spain. 10th European Symposium of Porcine Health and Management, poster. 9-11 maig 2018, Barcelona (Spain).

Vidal, A., Clilverd, H., Cortey, M., Martín-Valls, G., Martín, M., Darwich, L., Mateu, E., 2018. Deep-sequencing characterization of two Rotavirus A outbreaks in sucking piglets in Catalonia reveals a high frequency of recombination events. 10th European Symposium of Porcine Health and Management, poster. 9-11 maig 2018, Barcelona (Spain).

PART I: INTRODUCCIÓ GENERAL I

OBJECTIUS

1. Introducció a la diarrea neonatal porcina

1.1. Definició i característiques generals

La diarrea es defineix com la presència excessiva d'aigua en la femta en relació amb la quantitat de matèria seca (Brown *et al.*, 2007). També es considera diarrea l'increment en freqüència i/o en quantitat de deposicions d'un individu. La gravetat de la diarrea es basa en la pèrdua d'aigua i de matèria seca que pot provocar pèrdua d'electròlits i deshidratació greu, i posar en perill la vida de l'animal.

La diarrea neonatal és una problemàtica freqüent en la producció porcina, que afecta a animals de menys de dues setmanes de vida, i que genera grans pèrdues econòmiques en el sector porcí a nivell mundial (Chan *et al.*, 2013). Les causes de diarrea neonatal són moltes i diverses, i no són excloents entre si, fet que dificulta l'establiment d'un bon diagnòstic clínic i l'adequació del seu tractament. Es tracta, doncs, d'una malaltia on hi intervenen diversos factors com ara l'ambient, el maneig dels animals o els agents patògens.

La diarrea en nounats representa un desafiament greu per a la vida del garrí. Tot i que la simptomatologia i els signes clínics variaran en funció de la causa etiològica de la diarrea i de l'estat fisiològic de l'animal, la deshidratació i la pèrdua d'electròlits poden ocasionar una ràpida mort del garrí (Fairbrother i Gyles, 2012)

Existeixen diferents tipus de diarrea en funció de la seva fisiopatologia, classificades en quatre grups:

- a) **Diarrea secretora:** la causa és una disrupció en el transport iònic a través de l'epiteli, alterant canals i transportadors d'ions. Això provoca que hi hagi una descompensació entre els mecanismes d'absorció i de secreció de l'epiteli intestinal (Anand *et al.*, 2016).
- b) **Diarrea per malabsorció:** l'atròfia de les vellositats intestinals és la causa de la diarrea. L'absorció de soluts i ions es veu disminuïda, i l'aigua queda osmòticament retinguda a la llum intestinal.
- c) **Diarrea exsudativa:** apareix quan hi ha pèrdua de cèl·lules epitelials o quan les unions estretes de les cèl·lules es veuen compromeses. La pressió hidrostàtica dels

vasos sanguinis i limfàtics fa que aigua, electròlits i proteïnes s'acumulin a la llum intestinal.

d) **Diarrea per alteracions de motilitat:** la disminució de la motilitat intestinal afavoreix el sobrecreixement bacterià que pot provocar diarrea (Field, 2003). Un increment de la motilitat impedirà que s'absorbeixi l'aigua de l'intestí i també desencadenarà una diarrea.

1.2. Factors de risc associats

Els brots de diarrea neonatal d'origen infecciosos en general apareixen quan hi ha un mal encalostament, quan la vacunació no ha estat eficaç o bé quan l'explotació és seronegativa a un determinat patògen o a una soca concreta i aquest agent hi apareix per primera vegada. A més, les característiques particulars de la fisiologia de l'aparell gastrointestinal dels garrins nous i la immaduresa del sistema immunològic agreugen encara més aquest quadre.

Dins dels factors de risc que s'han associat amb l'aparició de diarrea neonatal en garrins destaquen aquells relacionats amb el maneig dels animals, inherents a l'animal o relacionats amb l'ambient.

a) Relacionats amb el maneig:

- Mal encalostament dels garrins: en el moment del naixement, els garrins no tenen cap tipus d'immunitat. Aquesta immunitat s'adquireix a través del calostre, ric en immunoglobulines G. És important que l'absorció dels anticossos es produeixi durant les primeres 36 hores de vida, ja que passat aquest període de temps, l'intestí del garrí ja no és capaç d'absorbir-los (Rooke i Bland, 2002; Alexopoulos *et al.*, 2018). Un mal encalostament del garrí comporta una adquisició deficient d'anticossos, i per tant, una immunitat disminuïda. Paral·lelament, el calostre aporta energia al garrí i n'afavoreix la termoregulació. En cas que l'encalostament no sigui adequat, l'animal presentarà menor vigor, més debilitat i major predisposició a morir per hipotèrmia o inanició.
- Deficient profilaxi vacunal en mares: La vacunació de les mares contra diversos patògens abans del part és habitual en la majoria d'explotacions per tal de conferir immunitat calostrals als garrins (Matías *et al.*, 2017). La vacunació de les mares és

altament efectiva i disminueix dràsticament l'aparició de diarrea causada per determinats patògens en garrins (Hur i Lee, 2013).

- Ús inadequat d'agents antimicrobians: els bacteris poden adquirir resistència als antibiòtics quan la pauta administrada no és la correcta. Aquesta resistència provoca que els antibiòtics no siguin efectius enfront a certes infeccions bacterianes patògenes.

b) Inherents a l'animal:

- Truges de primeres paritats: les truges de primer i segon part transmeten una immunitat calostrals reduïda respecte les truges de més paritats (Friendship i O'Sullivan, 2015).
- Parts prolongats: els últims garrins en néixer en un part prolongat (interval entre naixements superior als 15 minuts) poden patir hipòxia. En el cas que neixin vius malgrat la hipòxia, els garrins seran dèbils, i més propensos a no poder ingerir calostre. Per tant, tindran una alta probabilitat de patir diarrea i morir a les poques hores del naixement (Langendijk *et al.*, 2018).
- Hiperproliferació de les truges: Com més garrins per part tingui la truja, més dificultat tindran els garrins més dèbils per accedir al calostre, degut a la competició amb els germans (Declerck *et al.*, 2017).

c) Relacionats amb l'ambient:

- Pressió infectiva de patògens: fa referència a la quantitat de microorganismes patògens, principalment d'origen víric i bacterià, presents en una explotació. Com més alta sigui aquesta pressió, més probabilitats tindran els animals de patir una infecció entèrica i desenvolupar diarrea.
- Baixa temperatura ambiental: el garrí és molt sensible a la hipotèrmia, degut al poc pes viu i a la manca de pèl, de teixit adipós i d'energia (Lossec *et al.*, 1998). La hipotèrmia redueix el vigor del garrí, que no s'encalostrearà correctament. A més, el fred també redueix el peristaltisme intestinal, afavorint la proliferació de bacteris potencialment patògens.

2. Agents infecciosos relacionats amb la diarrea neonatal

Existeixen diversos agents vírics, bacterians i parasitaris que poden provocar diarrea neonatal, ja sigui com a patògens únics o en coinfecció. Alguns microorganismes estan ben descrits com a agents primaris causants de diarrea neonatal, mentre que en el cas d'altres, el seu paper no està tan ben definit.

Els agents infecciosos considerats més rellevants es descriuen en la Figura 1.

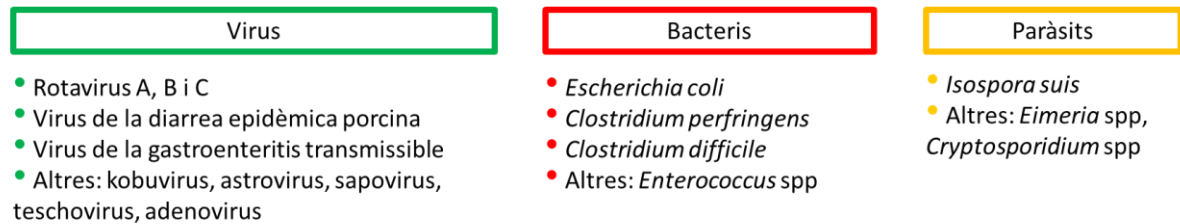


Figura 1. Classificació dels principals agents etiològics relacionats amb la diarrea neonatal porcina.

Aquest apartat descriu les característiques, l'epidemiologia, els signes clínics i les lesions ocasionades pels principals agents etiològics relacionats amb la diarrea neonatal porcina.

2.1 Rotavirus

Els rotavirus formen part de la família *Reoviridae*. Són virus RNA¹ de doble cadena, sense embolcall i tenen el genoma segmentat en 11 fragments que codifiquen sis proteïnes estructurals (VP1-VP4, VP6 i VP7), que formen part de l'estructura del virus, i sis proteïnes no estructurals (NSP1-NSP6) involucrades en la replicació vírica i que només s'expressen en cèl·lules infectades. Cadascun dels segments codifica una proteïna, excepte el segment 11, que en codifica dues, la NSP5 i la NSP6 (Estes i Kapikian, 2007).

Estructuralment, la càpsida del rotavirus té tres capes (Figura 2). Les proteïnes més externes (VP4 i VP7) són les responsables d'induir la producció d'anticossos neutralitzants per part de l'hoste.

¹ S'ha optat per les sigles en anglès en els casos en què siguin d'ús més universal.

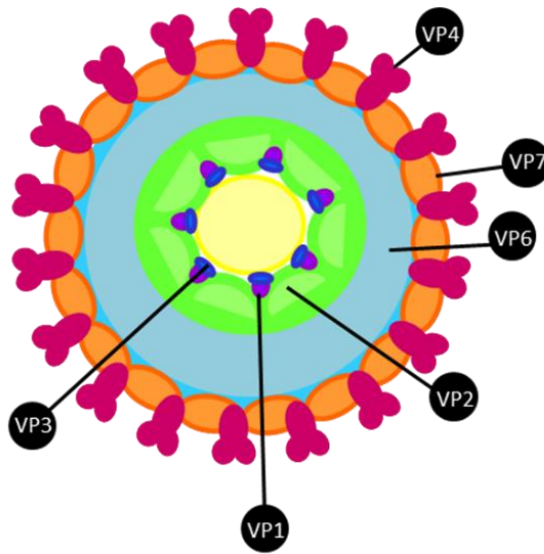


Figura 2. Estructura de les tres capes de la càpsida del rotavirus: la capa externa està formada per les proteïnes VP4 i VP7, la mitja, per VP6, i la capa interna o *core*, per VP1, VP2 i VP3 (Chang *et al.*, 2012).

En funció de les relacions antigèniques i de la seqüència nucleotídica de la proteïna VP6, els rotavirus es classifiquen en 10 serogrupos (A-J) (Matthijnsens *et al.*, 2011; Mihalov-Kovács *et al.*, 2015; Banyai *et al.*, 2017). En porcs, els serogrupos més prevalents són el tipus A (RVA), seguit dels tipus C (RVC) i B (RVB), tot i que també han estat descrits els tipus E i H (Bruce *et al.*, 1990; Wakuda *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2012; Marthaler *et al.*, 2014; Molinari *et al.*, 2016).

Degut a la gran diversitat de genotips que existeix dins de cada serogrup, Matthijnsens *et al.* (2011) van establir un sistema de classificació basat en els 11 fragments del genoma (Taula 1), de manera que els diferents genotips dels gens VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 s'expressen de la forma Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx, on la lletra es relaciona amb la funció o propietat de cada gen i la 'x' és el genotip que presenta cada fragment (Matthijnsens *et al.* 2011).

Taula 1. Descripció i funció de les proteïnes estructurals (VP) i no estructurals (NSP) dels Rotavirus.

Proteïna	Abrev.	Significat	Funcions
VP7	G	<i>Glycosilated</i>	Unió i entrada del virus a la cèl·lula. ¹
VP4	P	<i>Protease-sensitive</i>	Unió i entrada del virus a la cèl·lula. ¹
VP6	I	<i>Inner capsid protein</i>	Estructura i organització dels virions. ²
VP1	R	<i>RNA-dependent RNA-polymerase</i>	Producció de mRNA per a la síntesi de proteïnes víriques. ³
VP2	C	<i>Core protein</i>	Síntesi de dsRNA. ⁴
VP3	M	<i>Methyltransferase</i>	Formació del límit superior 5'. ⁵ Estabilització dels mRNA vírics.
NSP1	A	<i>Interferon antagonist</i>	Inhibició de la secreció d'interferons per part de la cèl·lula. ⁶
NSP2	N	<i>NTPase</i>	Formació de viroplasmes. Replicació i encapsidació del virus. ⁷
NSP3	T	<i>Translation enhancer</i>	Translació mRNA del rotavirus. Supressió de la síntesi de proteïnes de l'hoste. ⁷
NSP4	E	<i>Enterotoxin</i>	Inducció de diarrea per activació de canals de Clor. Replicació, transcripció i morfogènesi del virus. ⁷
NSP5/6	H	<i>Phosphoprotein</i>	Formació de viroplasmes. ⁷

¹Ludert *et al.*, 2002; ²Rey *et al.*, 2003; ³Vásquez-del Carpió *et al.*, 2006; ⁴Patton *et al.*, 1997;
⁵Ogsen *et al.*, 2014; ⁶Arnold, 2016; ⁷Hu *et al.*, 2012.

Pel que fa a l'epidemiologia, la diarrea causada per rotavirus pot afectar animals des d'un dia de vida fins a les 7-8 setmanes. El pic de diarrea sol aparèixer quan els garrins comencen a perdre la immunitat maternal, i varia segons el tipus de rotavirus: 2-3 setmanes en el cas de RVA i 1 setmana vida en el cas de RVC (Marthaler *et al.*, 2014b). La ruta de transmissió primària és la fecal-oral. El grup de RVA és el més prevalent i patogènic tant en humans com en animals (Papp *et al.*, 2013). S'han detectat porcs positius a RVA i RVC arreu del món, tant en animals amb diarrea com sense (Kim *et al.*, 2012; Midgley *et al.*, 2012; Amimo *et al.*, 2015; Silva *et al.*, 2015b). Pel que fa al RVB, la prevalença d'infecció és molt més baixa i s'ha descrit a Amèrica del Nord, Àsia, Sud-àfrica, i Brasil (Alekseev *et al.*, 2018). A Europa, s'ha descrit a Alemanya (Otto *et al.*, 2015) i a la República Txeca (Smitalova *et al.*, 2009).

Els rotavirus infecten als enteròcits més madurs que es troben a la posició apical de les vellositats, especialment del jejú i de l'ili (Desselberger, 2014). L'expansió de la infecció al llarg de l'epiteli és molt ràpida, i la diarrea apareix abans de les 24 hores post-infecció. La replicació del virus dins dels enteròcits provoca la lisi cel·lular i la consegüent atrofia de la mucosa. L'activitat enzimàtica dels enteròcits que queden també disminueix. L'acumulació de molècules que no es poden absorbir, com la lactosa, genera un gradient osmòtic dins la llum, que provoca una diarrea per malabsorció (Chang *et al.*, 2012). La infecció també provoca un augment de calci intracel·lular, que activa canals de clor a la membrana de la cèl·lula, i la sortida massiva de clor a la llum indueix una diarrea per secreció (Hu *et al.*, 2012).

Les lesions es troben exclusivament als intestins. Macroscòpicament, s'observa emaciació, intestins distesos, amb aprimament de la mucosa, plens de gas i contingut líquid o pastós al colon (Chang *et al.*, 2012). Microscòpicament, en l'epiteli es pot observar un gran nombre de cèl·lules immadures, cúbiques i planes. Aquesta morfologia és conseqüència de l'intent de compensar la destrucció dels enteròcits madurs: les criptes intestinals augmenten la seva activitat mitòtica per substituir les cèl·lules lisades (Yang *et al.*, 2015).

La gravetat del quadre clínic és inversament proporcional a l'edat del porc: els casos més greus s'observen en garrins de poques setmanes, mentre que els adults no solen patir la malaltia. Els animals infectats únicament per rotavirus presenten habitualment un quadre lleu que inclou depressió i una diarrea inicialment líquida que, en poques hores, es torna pastosa. Els animals es recuperen al cap de 2 o 3 dies si no hi ha complicacions. La morbiditat és variable però la mortalitat és nul·la o baixa, ja que els garrins no pateixen una deshidratació severa (Chang *et al.*, 2012). Ocasionalment, podem trobar quadres més greus amb mortalitats altes per rotavirus quan coexisteixen amb altres factors de risc com ara coinfeccions amb altres patògens, un mal encalostament, o condicions ambientals desfavorables (Lecce *et al.*, 1982).

2.2. Coronavirus: PEDV i TGEV

El virus de la diarrea epidèmica porcina (PEDV) i el virus de la gastroenteritis transmissible (TGEV) pertanyen al gènere *Alphacoronavirus* de la família *Coronaviridae*, formada per virus RNA de cadena simple amb embolcall. Els coronavirus són causes freqüents de malaltia tant en animals com en humans (Fehr i Perlman, 2015).

El genoma dels coronavirus és el més llarg de tots els virus RNA (Snijder *et al.*, 2016), i conté set fragments de lectura oberta (ORFs): quatre que codifiquen proteïnes estructurals (Espícula (S), Embolcall (E), Membrana (M) i Nucleocàpsida (N) (Taula 2)), i la resta, que codifiquen proteïnes no estructurals (ORF1a, ORF1b i ORF3) (Kocherhans *et al.*, 2001; Song i Park, 2012).

Taula 2. Descripció i funció de les proteïnes estructurals dels coronavirus que afecten el porcí.

Proteïna	Abrev.	Funcions
Nucleocàpsida	N	Embolcalla àcids nucleics. ¹ Inhibició de la producció d'interferó β . ² Increment de l'activitat de COX-2. ³
Membrana	M	Configuració de nous virions. Modulació en la producció d'interferons. ⁴ Alteració del cicle cel·lular dels enteròcits. ⁵
Espícula	S	Entrada del virus a la cèl·lula. ⁶
Embolcall	E	Assemblatge de virions. ⁷

¹Shi *et al.*, 2014; ²Ding *et al.*, 2014; ³Yan *et al.*, 2006; ⁴Siu *et al.*, 2009; ⁵Xu *et al.*, 2015; ⁶Li *et al.*, 2017; ⁷Ruch i Machamer, 2012.

Els dos coronavirus (PEDV i TGEV) que causen diarrea en porcs, presenten un període d'incubació i d'excreció molt curts, de poques hores (Saif *et al.*, 2012). Tot i tractar-se de dos virus antigènicament diferents (Lin *et al.*, 2015), la seva presentació clínica és molt semblant.

2.2.1 Virus de la Diarrea Epidèmica Porcina

Els primers brots descrits del virus de la diarrea epidèmica porcina (PEDV) van aparèixer durant la dècada dels 70, a Anglaterra i Bèlgica (Wood, 1977; Pensaert i de Bouck, 1978). Inicialment va aparèixer com una síndrome diarreica nova, que afectava animals de totes les edats i que cursava de manera molt semblant al TGEV, aleshores ja descrit. Ràpidament es va estendre per Europa, amb una mortalitat neonatal que se situava entre el 30% i el 80%. L'any 1978, dos grups d'investigació independents (Chasey i Cartwright, 1978; Pensaert i de Bouck, 1978) van aconseguir aïllar aquest nou coronavirus i la malaltia va rebre el nom de Diarrea Epidèmica Porcina. Durant els anys següents, el nombre de brots va anar disminuint i la malaltia va esdevenir endèmica a Europa, amb casos aïllats descrits en alguns països que cursaven amb baixa mortalitat, com ara els d'Espanya a l'any 1995 (Carvajal *et al.*, 1995). A l'Àsia, el PEDV va aparèixer al voltant dels anys 80 i, a diferència d'Europa, s'ha mantingut fins l'actualitat com una de les causes més freqüents de diarrea en garrins en diversos països. L'any 2013 es va detectar per primer cop als Estats Units, on va afectar a més de 5000 granges (Stevenson *et al.*, 2013).

Les soques del PEDV es poden classificar en dos grups diferents: el genogrup 1 (G1 o clàssic) i el genogrup 2 (G2 o epidèmic/pandèmic). Cadascun d'aquests grups es divideix a la vegada en dos subgrups. El subgrup G1a inclou la soca CV777, considerada el prototip del virus, soques vacunals i soques adaptades al cultiu cel·lular, i el subgrup G1b inclou variants detectades a la Xina, als Estats Units i a Europa, en general considerades menys virulentes. Els subgrups 2a i 2b contenen les soques responsables dels brots epidèmics a l'Àsia i als Estats Units. Les soques del genogrup 1 es caracteritzen per presentar insercions i/o delecions en la seqüència de la proteïna S del virus i per això s'anomenen també soques INDEL. Per contraposició, les soques del genogrup 2, que no presenten aquestes insercions i delecions, s'anomenen soques NO-INDEL (Argüello *et al.*, 2016).

Quan el PEDV es presenta per primera vegada en una granja seronegativa, la diarrea afecta a tots els animals, de manera especialment devastadora en garrins de menys de dues setmanes de vida. La malaltia cursa amb morbiditat fins el 100% i mortalitat

d'entre el 50% i el 100% en aquesta franja d'edat (Jung i Saif, 2015). En animals més grans, la morbiditat també pot ser del 100% però el percentatge de mortalitat és menor. Quan el PEDV és present en una granja endèmica, la malaltia es presenta sobretot en animals de transició, degut a la pèrdua d'immunitat lactogènica, i en truges de reposició seronegatives (Carvajal *et al.*, 2015)

L'excreció del virus comença un o dos dies post-infecció i dura aproximadament una setmana (Carvajal *et al.*, 1995). La ruta principal de transmissió del virus és la fecal-oral. També s'ha descrit la presència d'RNA víric en mostres d'aire i els aerosols no es poden descartar com a fonts potencials d'infecció (Alonso *et al.*, 2014). Els vòmits dels animals malalts també són infectius. S'ha suggerit una possible transmissió vertical del virus per la detecció d'RNA en la llet de truges lactants però encara no s'ha demostrat (Li *et al.*, 2015).

El PEDV té tropisme pels enteròcits de les vellositats intestinals de l'intestí prim que expressen aminopeptidasa-N, el seu receptor. El virus es replica al citoplasma i té un cicle lític dins la cèl·lula, amb un període d'incubació curt. En poques hores es produeix la degeneració de les vellositats de l'intestí prim, que queden severament reduïdes (Saif *et al.*, 2012). Com a conseqüència de la disminució del nombre d'enteròcits apareix diarrea per malabsorció.

Els animals infectats amb PEDV presenten diarrea aquosa profusa. La disminució de la quantitat de vellositats fa que no es reabsorbeixin ni aigua ni electròlits, generant una ràpida deshidratació en els animals més susceptibles, normalment garrins d'entre una i tres setmanes de vida. El PEDV també pot provocar vòmits, que contribueixen en la deshidratació de l'animal afectat, i febre. La infecció en animals adults és més lleu: la diarrea és moderada i la deshidratació menys marcada. La morbiditat sol ser del 100% però la mortalitat és gairebé nul·la i els animals es solen recuperar al cap d'una setmana (Shibata *et al.*, 2000; Saif *et al.*, 2012; Madson *et al.*, 2014; Annamalai *et al.*, 2015). Les truges infectades poden presentar depressió i anorèxia, amb diarrea lleu o inexistent. El fet que la gravetat de la malaltia depengui de l'edat es deu, probablement, a diversos factors anatòmics i fisiològics de l'animal, però un dels més importants podria ser el temps de regeneració de l'epiteli intestinal, que en garrins nous és de 6-7 dies mentre que a les tres setmanes es redueix a 2-3 dies (Shibata *et al.* 2000; Jung i Saif, 2015).

En la necròpsia, es pot observar macroscòpicament la distensió dels intestins, plens de líquid i llet no digerida. La paret intestinal també és més prima i translúcida. Microscòpicament, les lesions es limiten a l'intestí prim, on s'observa degeneració de les cèl·lules epitelials i atròfia de les vellositats. Les cèl·lules perden l'adherència entre elles i amb la membrana basal. El citoplasma d'algunes cèl·lules conté vacuoles eosinofíliques i s'aprecia també la presència de síncits (Stevenson *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2016).

2.2.2 Virus de la Gastroenteritis Transmissible

El virus de la gastroenteritis transmissible (TGEV) va ser descrit per primera vegada el 1946 als Estats Units (Doyle i Hutchings, 1946). Igual que en el cas del PEDV, el TGEV afecta animals de totes les edats, però només provoca una mortalitat elevada en garrins lactants. De fet, la gravetat de la malaltia és inversament proporcional a l'edat dels animals. A partir dels 12 dies, la mortalitat és baixa (5%), i més enllà de les dues setmanes de vida, és pràcticament nul·la (Saif *et al.*, 2012).

El 1984 es va detectar a Bèlgica un mutant del virus que presentava una deleció en el gen de l'espícula i que es va estendre ràpidament per Europa. Aquest mutant, que no produïa signes entèrics i es replicava al teixit pulmonar, va rebre el nom de coronavirus respiratori porcí (PRCV) (Welter *et al.*, 1993; Wang i Zhang, 2017). A Espanya es va descriure per primer cop el 1986 (Martin-Alonso *et al.*, 1992; Martín *et al.*, 1994).

Malgrat tenir un tropisme i una patogènia diferents, els dos virus, TGEV i PRCV estan antigènica i clonalment molt relacionats, i la infecció natural amb PRCV indueix immunitat enfront al TGEV (Wesley i Woods, 1993; Kim *et al.*, 2000; Wesley i Lager, 2003). En l'actualitat rarament es produeixen brots de diarrea causats per TGEV a Europa.

Una de les característiques epidemiològiques de la infecció per TGEV és que presenta un patró estacional i que els brots es produeixen a l'hivern. Tant la morbiditat com la mortalitat causades pel TGEV són molt altes. El període d'incubació és curt, entre 18 i 72 hores. La transmissió pot ser directa, via fecal-oral o a través de secrecions nasals, o indirecta a través de fòmits (Saif *et al.*, 2012). En una explotació seronegativa la infecció s'observa en animals de qualsevol edat. La mortalitat en garrins de menys de dues

setmanes arriba al 100%. En el cas que afecti a truges lactants, la infecció amb el virus els provoca agalàctia, que contribueix a augmentar la mortalitat en els garrins.

La replicació del virus té lloc en els enteròcits del jejú. Com en el cas del PEDV, la replicació dins el citoplasma i la consegüent destrucció de les vellositats intestinals provoca una disrupció en la digestió, l'absorció i el transport de nutrients i electròlits, i dóna lloc a una diarrea per malabsorció. Degut a l'elevada pressió osmòtica a l'intestí, l'aigua es desplaça cap a la llum intestinal. La mortalitat està causada sobretot per la deshidratació i l'acidosi metabòlica que pateixen els animals afectats. En el cas de TGEV, a més, els mecanismes de transport de sodi es troben alterats (Butler *et al.*, 1974). L'acumulació d'aigua a dins l'intestí prim fa que l'estómac no es pugui buidar correctament i apareguin els vòmits.

El signe clínic més rellevant de la infecció és l'aparició de diarrea profusa i aquosa. Els porcs afectats vomiten i es deshidraten ràpidament (<24h). Els animals es veuen prims, amb els ulls enfonsats i les orelles caigudes.

Pel que fa a les lesions histopatològiques, a nivell macroscòpic s'observa distensió de l'estómac i també es presenten hemorràgies petequials. Els intestins estan plens de contingut i tenen la paret més prima degut a l'atrofia de les vellositats. Com en la infecció per PEDV, la lesió microscòpica principal és l'escurçament de les vellositats intestinals, especialment en la regió del jejú (Hooper i Haelterman, 1969).

2.3. *Escherichia coli*

Escherichia coli és un bacteri Gram negatiu, anaerobi facultatiu, de la família *Enterobacteriaceae*. La majoria de soques d' *E. coli* no són patògenes, i formen part de la flora normal d'individus sans. Algunes soques, però, poden provocar infeccions intestinals i extra-intestinals i causar un ampli ventall de malalties tant a animals com a humans (Allocati *et al.*, 2013).

La diarrea causada per *E. coli*, coneguda com a colibacil·losi, apareix a qualsevol país on hi hagi producció porcina (Fairbrother i Gyles, 2012). *E. coli* és un dels agents etiològics més importants en la diarrea neonatal, i sempre s'ha considerat una causa major de mortalitat i morbiditat en garrins nounats. En els últims anys però, la millora en el

maneig dels animals, de la bioseguretat de les granges i l'establiment de pautes de vacunació de les truges han disminuït la incidència de diarrea colibacil·lar en els països desenvolupats (Dubreuil *et al.*, 2016).

Els garrins s'infecten a la poca estona de néixer, quan comencen a mamar. Tant la pell de la mare com l'ambient en el que es troben poden provocar que el garrí ingereixi el bacteri i es produeixi la diarrea (Fairbrother i Gyles, 2012). La patogenicitat d'*E. coli* rau en la producció de factors de virulència, com ara les toxines o les adhesines presents en la seva superfície. Les fimbries o adhesines fimbrials són proteïnes de superfície responsables de l'adhesió i la colonització del bacteri a les cèl·lules epitelials (Vu-Khac *et al.*, 2007). Els tipus fimbrials de les soques d'*E. coli* que infecten els porcs són F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P), F17, F18 i F41. Hi ha altres adhesines no fimbrials que també permeten l'adhesió d'*E. coli* a l'intestí, anomenats factors de colonització, unint-se a la cèl·lula mitjançant receptors específics, com per exemple l'intimina (*eae*). Un cop adherit, *E. coli* pot produir toxines que provoquin la pèrdua de funcionalitat de la cèl·lula infectada. En funció de les toxines que produeixen, les soques d' *E. coli* causants de diarrea es classifiquen en patotipus (Taula 3).

Taula 3. Patotipus d' *E. coli* més importants en el porc.

Patotipus		Toxines produïdes
ETEC	<i>E.coli</i> enterotoxigènic	Toxines termoestables (Sta, Stb) i/o toxina termolàbil (LT)
STEC/VTEC	<i>E.coli</i> productor de toxines Shiga o Vero	Toxines Shiga/Vero (Stx1 i/o Stx2)
EPEC	<i>E.coli</i> enteropatogènic	Intimina (<i>eae</i>)
EHEC	<i>E.coli</i> enterohemorràgic	Toxines Shiga (Stx1 i/o Stx2) i intimina (<i>eae</i>)

Una soca d'*E. coli* pot pertànyer a la vegada a més d'un patotipus (Frank *et al.*, 2011). En porcs nounats, ETEC i STEC són els principals tipus d' *E. coli* causants de diarrea, mentre que EPEC és més freqüent en animals deslletats (Luppi, 2017).

La gravetat de la diarrea causada per *E. coli* depèn de diversos factors: la virulència de la soca, l'edat de l'animal i el seu estat immune. La diarrea pot aparèixer a partir de les tres hores de vida, i pot afectar a individus concrets o a tota la garrinada. Les garrinades de truges de primer part solen ser més susceptibles que les de truges múltiples, degut a una immunitat passiva reduïda (Luppi, 2017).

Els animals afectats presenten una diarrea aquosa i clara, i de vegades és tan líquida que només es pot apreciar examinant atentament la zona perianal de l'animal (Fairbrother i Gyles, 2012). En els casos més greus, el garrí pot arribar a perdre un 30-40% del pes degut a la deshidratació. S'observa atonia en la musculatura abdominal i flacciditat, i es pot palpar l'estómac dilatat. Els animals presenten depressió, ulls enfonsats i tenen més pèl (Luppi, 2017). La mortalitat en brots de diarrea per *E. coli* es situa entre un 30 i un 40%, sobretot en els animals amb quadre clínic més greu. En els quadres més lleus, els animals es recuperen amb un lleuger retard en el creixement (Fairbrother i Gyles, 2012).

Macroscòpicament, els animals presenten deshidratació greu, dilatació gàstrica i congestió de la paret intestinal. Microscòpicament, les lesions varien en funció del patotipus d'*E. coli* que provoqui la diarrea. En el cas d'ETEC, s'observen adherències a la mucosa del jejú i del íli, i en el cas d'EPEC, les acumulacions de bacteris es localitzen a les criptes de Lieberkühn, criptes intestinals i a les puntes de les vellositats. El nombre de macròfags i neutròfils es pot trobar augmentat a la làmina pròpia i ens els casos més greus de diarrea, s'observa atròfia total de les vellositats intestinals (Fairbrother i Gyles, 2012).

2.3.1 *Escherichia coli* enterotoxigènic (ETEC)

Es classifiquen com a ETEC aquells aïllats d'*E. coli* que sintetitzen enterotoxines. Les enterotoxines es classifiquen en dos grups, segons la seva estabilitat tèrmica: les toxines termolàbils (LT) i les toxines termoestables (St_a, St_b i EAST1) (Dubreuil *et al.*, 2016; Vu-Khac *et al.*, 2007; Qadri *et al.*, 2005).

Els brots de diarrea causada per ETEC poden aparèixer en dos moments diferents del cicle productiu: durant la primera setmana de vida i just després del deslletament. Les diarrees ocasionades per ETEC són de tipus secretor i provoquen una ràpida deshidratació en els garrins que la pateixen. La consistència de la diarrea és

extremadament líquida. La mortalitat es deu a la deshidratació i al desequilibri d'electròlits (Dubreuil *et al.*, 2016).

El component secretor de la diarrea es deu a l'acció de les toxines produïdes per *E. coli*: La pressió osmòtica dels ions provoca sortida d'aigua a la llum intestinal (Figura 3). La quantitat de receptors per les toxines ST disminueix amb l'edat. D'aquesta manera, la prevalença d'infeccions per ETEC en animals adults és inferior (Kopic i Geibel, 2010).

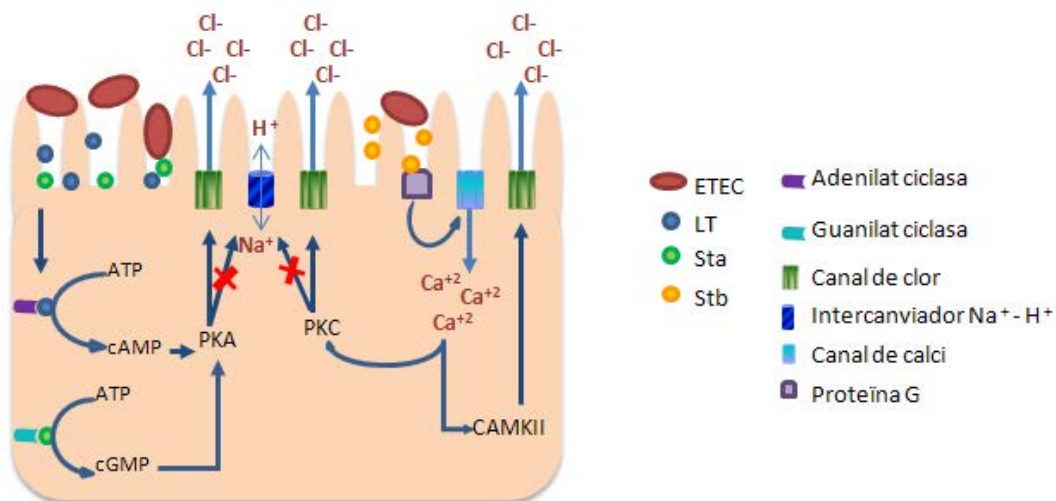


Figura 3. Mecanismes de patogènia d'ETEC. L'acció de LT i Sta provoca un augment dels nivells intracel·lulars de cAMP i cGMP. Aquest augment activa la proteïna-cinasa A (PKA), que provoca l'obertura de canals de clor. La toxina Stb estimula una proteïna G que permet l'obertura de canals de calci a la membrana plasmàtica. L'increment de calci intracel·lular activa la calci/calmodulina proteïna-cinasa II (CAMKII) i la proteïna-cinasa C (PKC), que fosforilen canals de clor. Paral·lelament, PKA i PKC inhibeixen l'intercanviador Na⁺-H⁺, implicant la reabsorció de sodi (Kopic i Geibel, 2010).

Moltes soques ETEC produeixen la toxina EAST1, que comparteix moltes similituds amb la Sta (el domini enterotòxic de les dues toxines presenta una similitud del 50%). Malgrat no estar del tot ben definit, es creu que el mecanisme d'acció d'EAST1 és similar a Sta, i actua activant la cascada guanilat ciclasa/cGMP (Savarino *et al.*, 1993). A la pràctica però, el rol d'EAST1 en la diarrea neonatal s'ha posat en dubte després que diversos estudis trobessin altes prevalències del gen de la toxina en animals sans (Zajacova *et al.*, 2012) i d'altres no trobessin cap associació entre l'administració de la toxina i l'aparició d'efecte patològic o diarrea (Ruan *et al.*, 2012).

2.3.2 *Escherichia coli* enteropatogènic (EPEC)

Les soques EPEC es caracteritzen per les lesions que produeixen a l'intestí i que a nivell histopatològic reben el nom d'*attaching and effacing* (A/E, adhesió i esborrat) (Clarke *et al.*, 2003). Existeixen diversos gens relacionats amb les lesions A/E però l'expressió d'un dels gens, la intimina (eae), és crucial per al desenvolupament de la patogènia (Wang *et al.*, 2013). La intimina és una proteïna de membrana externa que permet l'adhesió del bacteri als enteròcits i indueix canvis en el seu citoesquelet, provocant una reorganització i acumulació d'actina (Figura 4). Això provoca la destrucció de les vellositats intestinals i l'alteració de la membrana apical dels enteròcits (Clarke *et al.*, 2003).

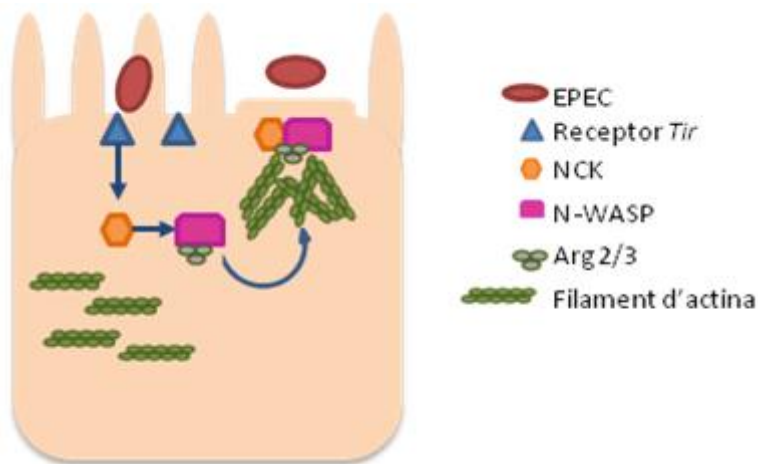


Figura 4. Patogènia d'EPEC. *E. coli* s'adhereix a l'enteròcit a través de la intimina, que activa el receptor translocat d'intimina (Tir). La fosforilació del receptor permet que la proteïna NCK s'hi uneixi i activi la proteïna N-WASP per tal d'estimular la polimerització d'actina mitjançant Arg 2/3. Com a resultat, es crea una estructura molt densa d'actina que s'acumula al lloc d'unió entre EPEC i la cèl·lula, formant els característics 'pedestals'.

2.3.3 *Escherichia coli* productor de toxines Shiga (STEC/VTEC)

Les soques que es classifiquen com a *E. coli* productores de toxina Shiga (STEC) són aquelles que tenen els gens que codifiquen les toxines Shiga 1 i 2 (*stx1* i *stx2*). Indistintament, també reben el nom d'*E. coli* productores de toxina verocitotòxica (VTEC) i en aquest cas els gens s'anomenen *VT1* i *VT2* (Ercoli *et al.*, 2016).

Les toxines Shiga actuen inactivant els ribosomes eucariòtics de les cèl·lules eliminant una adenina del 28S rRNA (Endo *et al.*, 1988). La inhibició de la síntesi de proteïnes és la que causa la mort de la cèl·lula intoxicada (Figura 5).

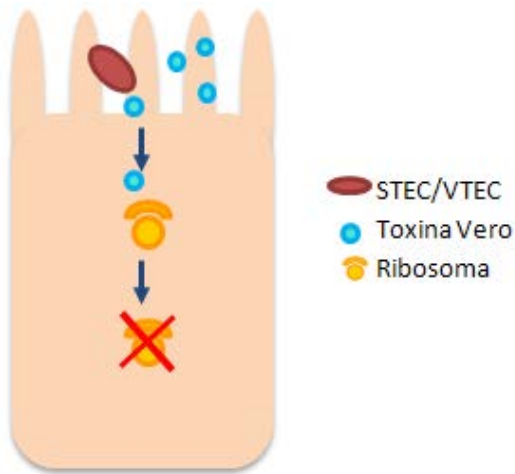


Figura 5. Mecanisme de patogènia de STEC/VTEC. L'eliminació d'una adenina del 28S ribosomal inactiva el ribosoma, i impedeix la formació de noves proteïnes de la cèl·lula, provocant-li la mort.

Un subgrup de les soques STEC són les denominades EHEC (*E. coli* enterohemorràgic), que són altament patògenes pels humans. Les soques EHEC produeixen, a més de les toxines Shiga, la proteïna de membrana intimina que, com en el cas d'EPEC, permet l'adhesió del bacteri als enteròcits i indueix canvis en el seu citoesquelet, provocant una acumulació d'actina (Fairbrother i Gyles, 2012) (Figura 6).

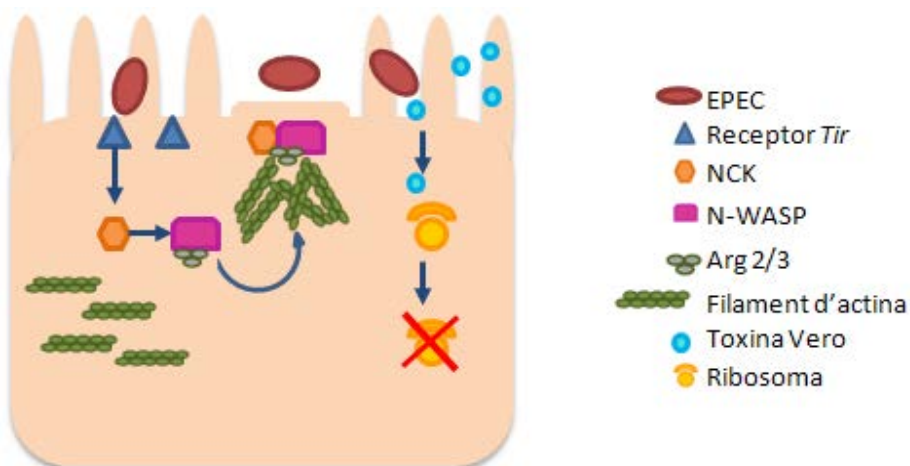


Figura 6. Mecanismes de patogènia d'EHEC. Les soques EHEC combinen els dos mecanismes dels EPEC i STEC/VTEC.

2.4 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens (*C. perfringens*) és un bacil gram positiu, anaerobi estricte i formador d'espores. Es classifica en 5 tipus (A-E), segons la producció de 4 toxines "majors" o de tipatge: alfa (α), beta (β), èpsilon (ϵ) i iota (ι) (McClane, 2005) (Taula 4). A part d'aquestes, *C. perfringens* és capaç de produir fins a 16 toxines més, algunes de les quals acompanyen les toxines majors i agreugen el quadre clínic d'aquest patogen. Les més rellevants a nivell clínic són l'enterotoxina (*cpe*) i la toxina beta-2 (β_2) que poden ser produïdes per totes les soques de *C. perfringens*, i malgrat que s'han associat amb la patogènia, el seu rol no està del tot definit.

C. perfringens es considera un dels patògens més estesos d'arreu del món, present en la microbiota normal del tracte intestinal de totes les espècies d'animals domèstics i de l'home, i en el medi ambient, sobretot com a contaminant habitual del sòl, sediment marí i vegetació en descomposició (Yang *et al.*, 2013).

Taula 4. Classificació dels tipus de *C. perfringens* segons les toxines majors que produeixen.

	Tipus	A	B	C	D	E
Majors	α	+	+	+	+	+
	β	-	+	+	-	-
	ϵ	-	+	-	+	-
	ι	-	-	-	-	+
Altres	<i>cpe</i>	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
	β_2	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-

L'espècie porcina és de les més sensibles en patir malaltia gastrointestinal causada per *C. perfringens*. Els tipus patogènics més habituals són els tipus A (productor de toxina α) i C (productor de toxines α i β) (Songer i Uzal, 2005). *C. perfringens* A forma part de la flora intestinal normal, però el tipus C rarament es troba en l'intestí d'animals sans (Niilo, 1988; Songer i Uzal, 2005).

2.4.1 *Clostridium perfringens* tipus A

La diarrea causada per *C. perfringens* tipus A (CpA) apareix en garrins nous durant la primera setmana de vida. Es caracteritza per ser una diarrea mucosa, no hemorràgica, i que normalment no presenta lesions a nivell histopatològic (Silva i Lobato, 2015). Experimentalment, s'ha observat necrosi de la mucosa intestinal, però no és comú en casos d'infecció natural. La falta de lesions fa que se suposi que la diarrea causada per CpA sigui de tipus secretora (Songer i Uzal, 2005).

CpA es considera un microorganisme comensal del tracte intestinal dels garrins, de manera que és complex establir un diagnòstic que es basi en la simple detecció del bacteri (Silva *et al.*, 2014). Actualment, tot i realitzar-se un diagnòstic molecular per a la detecció de soques productores de toxines, no hi ha cap mètode de genotipat que permeti diferenciar el CpA patogènic del CpA comensal (Chan *et al.*, 2012). En conseqüència, el diagnòstic de CpA com a causant d'enteritis passa per descartar altres agents causants de diarrea, així com l'absència de lesions a nivell histopatològic (Silva i Lobato, 2015).

A finals dels anys 90, es creia que la toxina β_2 tenia un paper rellevant en el desenvolupament de la diarrea causada per CpA (Gibert *et al.* 1997; Klaasen *et al.* 1999). Posteriorment, els resultats d'altres estudis, on la prevalença de soques CpA productores de toxina β_2 en animals sans era la mateixa que la dels malalts, van posar en dubte l'associació d'aquesta toxina i diarrea neonatal (Garmory *et al.*, 2000; Bueschel *et al.*, 2003; Jäggi *et al.*, 2009; Farzan *et al.*, 2013). Tampoc s'ha pogut demostrar que aquesta toxina tingui efectes citotòxics *in vitro* sobre les cèl·lules (Allaart *et al.*, 2014), així que el rol de la toxina β_2 en la patogènia de CpA està encara en vies d'estudi.

Una altra toxina que s'ha relacionat amb la diarrea ha estat l'enterotoxina *cpe*, produïda per *C. perfringens* sobretot de tipus A, tot i que s'ha aïllat de soques tant de tipus C com D (Freedman *et al.*, 2016). En humans, s'ha identificat com el principal factor de virulència de CpA associat a simptomatologia gastrointestinal (Eichner *et al.*, 2016). En el cas del porcí, la majoria d'estudis no han trobat soques *cpe+* (Garmory *et al.*, 2000; Czanderlova *et al.*, 2006; Johansson *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2012; Ngamwongsatit *et al.*, 2016), tot i que recentment s'ha publicat un estudi a la Índia que ha obtingut una

prevalença del 3-6%, però tant en garrins amb diarrea com en garrins aparentment sans (Yadav *et al.*, 2017).

2.4.2 *Clostridium perfringens* tipus C

La diarrea causada per *C. perfringens* tipus C (CpC) afecta a garrins durant la primera setmana de vida, sobretot en els 3 primers dies. Provoca una enteritis necròtica, freqüentment hemorràgica, i ocasiona altes morbiditats i mortalitats en garrins nounats (Songer i Uzal, 2005). La mort dels garrins s'atribueix a les lesions intestinals i a la toxèmia a nivell sistèmic (Li *et al.*, 2016).

Les lesions que CpC ocasiona a la mucosa intestinal s'han atribuït a l'acció de la toxina β (Sayeed *et al.*, 2008; Schumacher *et al.*, 2013), que és una toxina formadora de porus amb capacitat citotòxica (Sakurai i Nagahama, 2006). La susceptibilitat dels animals nounats a CpC es deu, per una banda, a la manca d'una flora intestinal ben establerta, i per l'altra, a una degradació lenta de la toxina β , degut a una baixa secreció de tripsina i a la presència d'inhibidors de proteases al calostre (Songer i Uzal, 2005.)

La patogènia de CpC s'inicia amb la multiplicació del bacteri a l'intestí i la producció de la toxina β , sobretot a nivell de jejú i ili. La toxina s'uneix a les cèl·lules susceptibles mitjançant un receptor i crea porus transmembrana que provoca la sortida de potassi i l'entrada massiva de calci, sodi i clor. Aquest intercanvi d'ions provoca la mort de les cèl·lules afectades i la conseqüent necrosi de la mucosa intestinal (Autheman *et al.*, 2013).

La lesió de la mucosa fa que augmenti la permeabilitat de membrana, fet que facilita l'entrada de proteïnes de la sang a la llum intestinal i afavoreix l'absorció de la toxina a nivell sistèmic, afectant a altres òrgans. (Niilo, 1988; Vidal *et al.*, 2008).

El quadre clínic de la malaltia pot ser agut o crònic. Els quadres aguts es manifesten en animals molt joves (menys d'una setmana de vida) de forma sobtada, amb dolor abdominal intens, depressió i diarrea hemorràgica. El quadre clínic dura unes 24 hores en animals nounats abans que es produeixi la mort. La lesió típica es caracteritza per una enteritis necrotitzant hemorràgica de l'intestí prim, especialment el jejú (Songer, 2012), i una hiperèmia intestinal i mesentèrica amb un important component fibrino-necròtic (Songer i Uzal, 2005). En els quadres crònics, que apareixen en animals més adults, la producció i l'absorció de la toxina β és menor, i per això les lesions són menys

extenses i els percentatges de mortalitat són més baixos. En aquests casos, la diarrea no és hemorràgica, tot i que és persistent (pot durar fins a dues setmanes) i pot provocar la deshidratació de l'animal. La deshidratació, juntament amb possibles complicacions bacterianes, poden arribar, en alguns casos a ocasionar la mort de l'animal (Niilo, 1988).

2.5 *Clostridium difficile*

Clostridium difficile, actualment classificat com a *Clostridioides difficile*² (*C. difficile*) (Lawson *et al.*, 2016) és un bacil gram-positiu, anaerobi estricte, formador d'espores altament resistents al medi ambient, amb capacitat de produir toxines que causen enterocolitis, i de generar fàcilment resistència als antimicrobians. *C. difficile* és un agent habitual de la microbiota normal del tracte intestinal d'animals i persones, però l'existència de soques toxigèniques, amb potencial patogen i zoonòtic reconegut, representen un risc emergent tant per a la salut pública com la sanitat animal (Álvarez-Pérez *et al.*, 2009). Actualment, *C. difficile* és una de les primeres causes de diarrea en persones hospitalitzades que han estat tractades amb antibiòtics i responsable d'un 10-30% de les morts per infecció nosocomial arreu del món (Pépin *et al.*, 2004, 2007). Durant els darrers 10 anys s'ha detectat un increment dels casos de diarrea en humans associats a aquest patogen (Hutton *et al.*, 2014; Esteban-Vasallo *et al.*, 2015).

L'espècie porcina és un dels principals reservoris de *C. difficile*, tot i que la presència de malaltia no s'ha relacionat amb el consum previ d'antibiòtics (Susick *et al.*, 2012). Existeixen soques no-toxigèniques i soques toxigèniques, i ambdues poden colonitzar l'hoste, però només les toxigèniques són capaces de produir malaltia associada a *C. difficile* (Vedantam *et al.*, 2012). Les soques toxigèniques poden produir 3 tipus de toxines, descrites en la Taula 5.

² Les dues terminologies es consideren vàlides, segons l'ICNP (International Code of Nomenclature of Prokaryotes).

Taula 5. Descripció de la funció de les toxines produïdes per *C. difficile*

Toxina	Funció	Referència
Toxina A o enterotoxina	Indueix inflamació, augment de la permeabilitat, secreció de fluid a la llum intestinal i dany a la mucosa.	Chandrasekaran & Lacy, 2017
Toxina B o citotoxina	Indueix una disrupció del citoesquelet, que impedeix que les cèl·lules duguin a terme la seva funció, i que finalment provoca l'apoptosi de la cèl·lula.	Gerding <i>et al.</i> , 2014
Toxina binària	Tot i que el seu rol no està ben descrit, es creu que pot contribuir a la despolimerització dels microtúbuls de la cèl·lula i agreujar la disrupció del citoesquelet.	Gerding <i>et al.</i> , 2014

La colonització de *C. difficile* a l'intestí dels garrins té lloc durant les primeres 48 hores de vida de l'animal (Arruda *et al.*, 2013). Passat aquest temps, pràcticament tota la garrinada està colonitzada (Hopman *et al.*, 2011).

L'evolució dels nivells de prevalença està inversament relacionada amb l'edat dels porcs (Weese *et al.*, 2010; Susick *et al.*, 2012; Grzeskowiak *et al.*, 2016). La proporció d'animals positius és màxima durant les 2 primeres setmanes de vida (60-100% prevalença) i va disminuint durant la transició i l'engreix fins a uns nivells d'infecció pràcticament negligibles (0-8%) en animals d'escorxador (Álvarez-Pérez *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2010; Hoffer *et al.*, 2010; Hopman *et al.*, 2011; Keessen *et al.*, 2011).

La patogènia de la infecció comença amb la ingestió d'espores, que són resistents a la calor i al pH àcid de l'estómac. Un cop aconsegueixen arribar a l'intestí de l'hoste, i en condicions d'anaerobiosi, les espores germinen en cèl·lules vegetatives metabòlicament actives. En cas de produir-se una disbiosi de la microbiota intestinal, *C. difficile* podrà proliferar en excés, i si es tracta d'una soca toxigènica, produirà les toxines que provocaran l'aparició dels signes clínics de la malaltia (Figura 7) (Vedantam *et al.*, 2012).

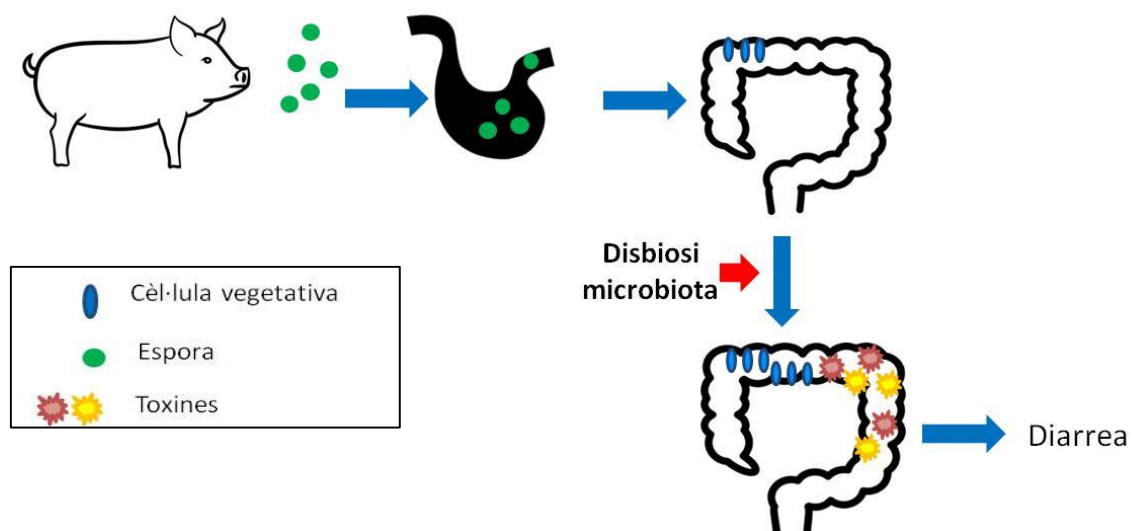


Figura 7. Patogènia de la infecció per *C. difficile* en el porc.

Les toxines accedeixen a la cèl·lula mitjançant endocitosis mediada per receptor. La presència de les toxines inactiva la família *Rho* de GTPases, provocant la desorganització del citoesquelet i l'apoptosi de les cèl·lules infectades. Aquesta mort cel·lular provoca la destrucció de les unions oclusives (*tight junctions*) entre cèl·lules, fet que augmenta la permeabilitat de la membrana intestinal i afavoreix la inflamació del teixit i l'aparició de diarrea (Voth i Ballard, 2005).

Quan hi ha una infecció per *C. difficile* en garrins, el quadre clínic apareix durant la primera setmana de vida, consistent en diarrea grogosa i de consistència entre pastosa i aquosa (Songer i Uzal, 2005). Es pot apreciar una lleu distensió abdominal i s'han descrit casos on els garrins afectats presenten dispnea (Waters *et al.*, 1998). A la necròpsia, la lesió macroscòpica més característica és la presència d'edema al mesocòlon, acompanyat d'una inflamació de l'intestí gros (Arruda *et al.*, 2013). També es produeix una exsudació de fibrina i d'agregats neutrofílics a la llum intestinal, que sovint desencadena la formació d'una pseudomembrana (Waters *et al.*, 1998).

La presència de soques toxigèniques de *C. difficile* en garrins no sempre està relacionada amb la presència de diarrea i colitis necrotitzant, ja que també es detecten amb una alta prevalença en animals asimptomàtics (Yaeger *et al.* 2007).

2.6 Altres agents relacionats amb la diarrea neonatal

2.6.1 Agents vírics

Diversos gèneres de virus han estat considerats com a possibles causants de diarrea, tot i que la seva importància encara està per definir (Taula 6).

Taula 6. Descripció d'altres virus que poden causar diarrea neonatal.

Família	Virus	Signes clínics	Característiques
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus	Diarrea aquosa	Relacionat amb un mal encalostament
<i>Picornaviridae</i>	Kobuvirus Teschovirus	Diarrea, vòmits i deshidratació	Aïllat també en animals sans
<i>Caliciviridae</i>	Sapovirus	Diarrea i anorèxia	Aïllat també en animals sans
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus	Diarrea lleu	Pot anar acompanyat de signes neurològics

Els adenovirus es consideren endèmics a les explotacions porcines d'arreu del món, i gairebé sempre cursa de forma subclínica. Experimentalment, s'ha vist que pot provocar diarrea aquosa acompanyada de vòmits (Horak i Leedom Larson, 2016).

Dins la família *Picornaviridae*, els gèneres Kobuvirus i Teschovirus s'han detectat en mostres fecals d'animals amb diarrea, i també en animals sans (Jackova *et al.*, 2017). Tanmateix, actualment no hi ha cap estudi experimental on es demostrï la capacitat patogènica d'aquests virus per induir un quadre diarreic en el porc (Alexandersen *et al.*, 2012). Per altra banda, sí que s'han reportat infeccions experimentals amb Sapovirus (Guo *et al.*, 2001) i Astrovirus (Indik *et al.*, 2006), en què s'ha aconseguit provocar diarrea en garrins gnotobiòtics. A nivell de camp, però, els sapovirus han estat detectats a diversos països europeus amb prevalences molt variades però sense poder relacionar-los estadísticament amb casos de diarrea (Reuter *et al.*, 2010). Malgrat que el paper

d'aquests virus està encara per estudiar, no es pot descartar la seva contribució en els processos diarreics en garrins.

2.6.2 Agents bacterians

Existeixen altres gèneres de bacteris capaços de provocar diarrea en garrins. Algunes espècies del gènere *Enterococcus* spp, com *E. villorum* (Taniguchi *et al.*, 2017) o *E. hirae* (Larsson *et al.*, 2014), s'han associat esporàdicament a brots de diarrea neonatal en diverses espècies, entre elles la porcina (Cheon i Chae, 1996), produint una atrofia de les vellositats dels enteròcits. Normalment no actuen com a causes primàries de diarrea, sinó com a agents secundaris oportunistes.

Campylobacter coli també pot provocar diarrea en garrins lactants, tot i que la infecció sovint és subclínica (Modolo *et al.*, 1999). Les diarrees ocasionades per *C. coli* són aquoses i poden anar acompanyades de moc i sang (Taylor, 2012).

Diverses espècies de *Salmonella* spp, com *Salmonella* Typhimurium també poden produir diarrea als garrins, tot i que és molt infreqüent que afectin a porcs de menys de dues setmanes de vida. L'aparència de la diarrea causada per *S. typhimurium* és líquida i groga, i dura entre 3 i 7 dies, tot i que sovint es produeixen recidives en els animals afectats (Carlson *et al.*, 2012).

2.6.3 Agents parasitaris

La coccidiosi porcina, produïda per *Isoospora suis* o també anomenada *Cystoisospora suis*, és la causa parasitària més prevalent i de major rellevància patològica en la clínica porcina d'Europa (Gualdi *et al.*, 2003). *I. suis* afecta especialment a animals d'entre 5 i 10 dies. Un estudi de l'any 2004 fet a 12 països europeus diferents va reportar prevalences elevades, amb un 69% de mitjana, entre elles Espanya, amb un 40% (Torres, 2004). Tot i tractar-se d'una malaltia que cursa amb alta morbiditat, la mortalitat associada és baixa (Skampardonis *et al.*, 2012).

La invasió i multiplicació de les formes infectives del paràsit provoca la lisi dels enteròcits. Com en el cas dels virus, la destrucció massiva d'enteròcits estimula la producció de nous enteròcits immadurs, incapaços d'absorbir nutrients, i es produirà una diarrea per malabsorció (Cordero del Campillo *et al.*, 1999).

La diarrea, caracteritzada per femtes de textura pastosa i de color clar, va acompanyada de deshidratació i vòmits (Harleman i Meyer, 1983).

Un altre paràsit relacionat ocasionalment amb diarrea neonatal en el porc és el nematode *Strongyloides ransomi*, tot i que és extremadament infreqüent que aparegui abans de les dues setmanes de vida. La seva importància clínica és reduïda, degut a la seva baixa incidència i el seu baix poder patogen (Thamsborg *et al.*, 2017).

3. Causes no infeccioses de diarrea neonatal

En porcs adults existeixen múltiples causes no infeccioses de diarrea relacionades amb deficiències en la dieta i toxicitats (Reese i Miller, 2012). En el cas dels garrins, estan directament relacionades amb el consum d'aliment i aigua. Les causes més freqüents de diarrees d'origen no infeccioses es relacionen amb els següents factors:

- **Alimentació de la truja:** una dieta rica en proteïna i en greix al voltant del part pot provocar diarrees en el garrins, ja que no són capaços de digerir l'excés de greix present en la llet .
- **Contaminació de l'aliment:** la presència de micotoxines al pinso pot provocar problemes digestius (Pierron *et al.*, 2016).
- **Mal encalostrament:** un dels factors que desencadena la maduració de l'intestí és la nutrició enteral. (Sangild *et al.*, 2002). En el moment en què el garrí comença a mamar, la morfologia intestinal canvia i, durant les primeres 24h de vida, els intestins augmenten el seu pes, longitud i diàmetre, així com les seves vellositats intestinals augmenten en nombre i alçada (Xu *et al.*, 1992). Si no hi ha un bon encalostrament, el sistema gastrointestinal perd capacitats digestives i també immunitàries. Com a conseqüència, quan el garrí torni a ingerir aliment, aquest s'acumularà a la llum intestinal sense que pugui ser absorbit, i es produirà una diarrea per malabsorció (Kongsted *et al.*, 2013).
- **Qualitat de l'aigua:** La presència d'alts continguts de sals minerals a l'aigua pot conduir a l'aparició d'una diarrea osmòtica (Flohr *et al.*, 2014).

4. Diagnòstic dels patògens involucrats en la diarrea neonatal

La realització del diagnòstic d'un brot de diarrea és complexa, degut a la seva naturalesa multifactorial. En la majoria dels casos, hi ha més d'un agent etiològic implicat en el brot: encara que hi hagi un patògen primari, sovint es donen co-infeccions amb altres microorganismes. A més de les causes infeccioses, també s'han de tenir en compte altres factors com els ambientals, l'alimentació i el maneig dels animals.

Per tal de realitzar un diagnòstic acurat, cal basar-se en una sèrie de criteris (Figura 8).

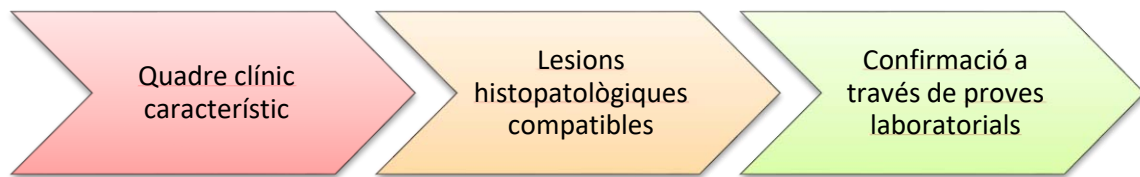


Figura 8. Diagrama representatiu dels tres factors clau per a un bon diagnòstic de les diarrees neonatals.

4.1 Diagnòstic clínic i diferencial

El diagnòstic clínic sol ser complex degut a la inespecificitat de la simptomatologia. Malgrat que el diagnòstic clínic és poc fiable, la presència de determinats signes clínics o l'edat dels animals afectats pot portar a descartar alguns dels agents patògens involucrats en la diarrea.

Pel que fa al diagnòstic diferencial, els agents més comuns en els brots de diarrea neonatal i les seves característiques es detallen a la Taula 7.

Taula 7. Característiques dels agents infecciosos més freqüents en la diarrea neonatal.

Agent	Edat afectada	Signes clínics	Aparença diarrea	Zona afectada	Lesions microscòpiques	Lesions macroscòpiques
Rotavirus	1 - 42 dies	Deshidratació Pèrdua de pes Vòmits	Líquida a pastosa	IP	Atrofia vellositats	Emaciació Intestins distesos i prims Contingut líquid o pastós al colon.
PEDV	1 - desllet	Deshidratació Depressió Vòmits	Aquosa, groc-verdós	IP	Atrofia vellositats	Intestins plens de líquid Paret intestinal prima i translúcida
TGEV	1 - desllet	Deshidratació Depressió Vòmits	Aquosa, transparent -groga	IP	Atrofia vellositats	Distensió de l'estómac Hemorràgies petequials gàstriques
<i>E. coli</i>	1 - desllet	Deshidratació Depressió Pèl brut	Molt líquida, groga	IP	Enteritis catarral Atrofia vellositats	Dilatació gàstrica Congestió de la paret intestinal
<i>C. perfringens</i> C	1 -7 dies	Depressió Dolor abdominal intens	Hemorràgica	IP	Enteritis necròtica-hemorràgica	Hiperèmia intestinal i mesentèrica
<i>C. perfringens</i> A	1-7 dies	Lleugera depressió	Mucosa, transparent-groga	IP	Atrofia lleu de la mucosa	Cap
<i>C. difficile</i>	1-14 dies	Ascitis Deshidratació	Groga i pastosa	IG (còlon)	Colitis erosiva multifocal	Edema mesocòlon Agregats de fibrina

(IP: Intestí prim; IG: Intestí gros, desllet: deslletament)

4.2 Diagnòstic laboratorial

El diagnòstic definitiu de les diarrees neonatals d'origen infecciosos requereix d'un diagnòstic laboratorial que confirmi la presència de l'agent infecciosos implicat en el brot. Les tècniques de diagnòstic utilitzades de forma més freqüent són les microbiològiques i les basades en biologia molecular, tot i que n'existeixen d'altres (Figura 9).

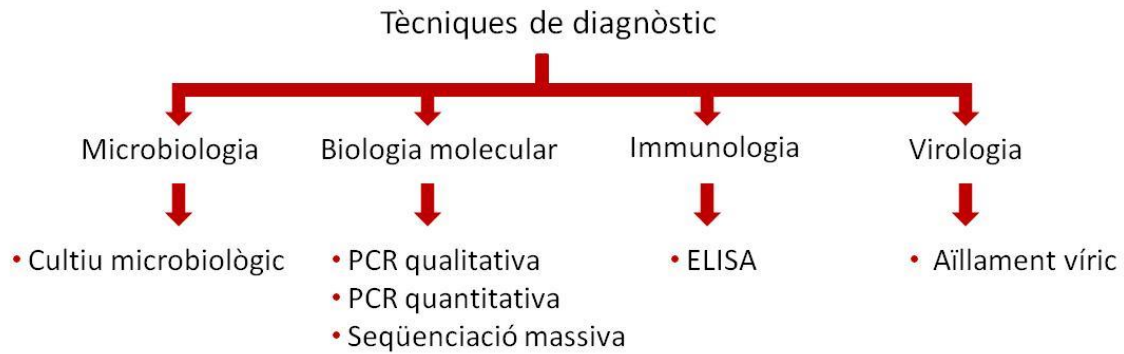


Figura 9. Esquema de les tècniques més habituals en el diagnòstic de diarrees neonatals.

4.2.1 Microbiologia

El diagnòstic microbiològic és útil per a la identificació i l'aïllament de bacteris en femta i contingut intestinal.

Els medis que s'utilitzen de forma habitual pel diagnòstic dels agents bacterians causants de diarrea en garrins són dos: agar sang i agar MacConkey. L'Agar Sang permet el creixement de la gran majoria de bacteris. L'agar MacConkey és un medi selectiu per a bacteris Gram negatiu, especialment de la família *Enterobacteriaceae*. En la seva composició hi té sals biliars, que inhibeixen el creixement de bacteris Gram positiu, i lactosa. La presència de lactosa al medi permet distingir entre bacteris fermentadors de lactosa (lactosa positiu, p.ex *E. coli*) o no fermentadors de lactosa (lactosa negatiu, p.ex *Salmonella* spp).

Clostridium spp és un gènere de bacteris que necessita un cultiu en condicions d'anaerobiosi estricta. En presència d'oxigen, són capaços de formar espores. En el moment de cultivar microbiològicament mostres de femta, les cèl·lules vegetatives d'altres components de la flora poden dificultar el creixement dels bacteris anaeròbics. Per poder aïllar els bacteris esporulats, existeixen dues tècniques que permeten seleccionar les espores, com són el *shock* d'etanol i el *shock* tèrmic (Koransky *et al.*, 1978). L'objectiu d'aquestes dues tècniques és eliminar les cèl·lules vegetatives presents en la mostra. La primera consisteix en fer una dilució 1:1 de la mostra amb etanol al 96% durant 40 minuts. La segona, en diluir la mostra amb sèrum fisiològic estèril, també amb una relació 1:1, i posar-ho a 60°C durant 25 minuts (Clabots *et al.*, 1989; Dharmasena i Jiang, 2018). També existeixen brous d'enriquiment, que es

recomanen quan es considera que els bacteris anaerobis es troben majoritàriament en forma vegetativa (Riley *et al.*, 1987). En funció de l'espècie que es vulgui aïllar, es recomana si cal fer o no selecció d'espores, i si cal utilitzar medis generals o selectius.

Per a aïllar *C. perfringens* es poden fer servir molts medis de cultiu específics, però també agar sang. En la majoria de les ocasions, no és necessari dur a terme la selecció d'espores.

En el cas de *C. difficile*, el cultiu és més complex, i requereix l'ús de medis selectius. La majoria d'aquests medis específics estan enriquits amb fructosa, i cicloserina i cefoxitina (medi CFFA), que inhibeixen el creixement de la majoria d'enterobacteris, cocs i clostridis, excepte *C. difficile* (Rodríguez *et al.*, 2016). El procediment més efectiu per l'aïllament de *C. difficile* és combinar un *shock* d'etanol o tèrmic amb l'ús de medi selectiu CFFA (Marler *et al.*, 1992).

Per a detectar la presència de les dues toxines (toxintipatge) s'utilitzen preferentment mètodes moleculars .

4.2.2 Biologia molecular

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR), descoberta a mitjans dels anys 80, és el mètode més comú i més utilitzat per a la detecció de molts agents relacionats amb patologia entèrica, tant per virus com per bacteris (Persson *et al.*, 2008; Van Asten *et al.*, 2009; Toledo *et al.*, 2012; Marthaler *et al.*, 2014b; Masuda *et al.*, 2016). La PCR pot anar dirigida a la detecció del patògen o a la detecció de factors de virulència, com en el cas d'*E. coli*.

- *PCR qualitativa*

EL principi de la PCR convencional es basa en l'amplificació d'un segment determinat de DNA o RNA utilitzant encebadors específics per un gen concret i cicles amb canvis de temperatura. EL DNA de la mostra s'afegeix a una preparació que conté un enzim polimerasa, nucleòtids, clorur de magnesi i una solució tamponadora, juntament amb dos oligonucleòtids sintètics, anomenats encebadors o *primers*, complementaris a la regió que es vol amplificar.

A continuació, l'amplificació es du a terme utilitzant un termociclador. Un cicle d'amplificació del DNA consta de tres fases (Figura 10). En una PCR convencional, el número de cicles se situa entre 25 i 40.

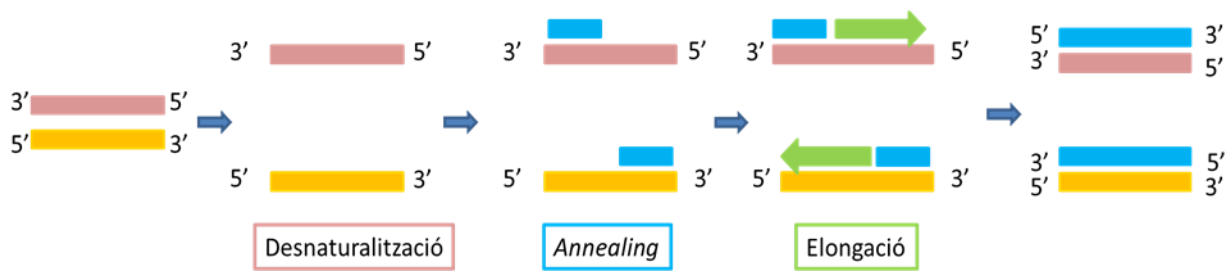


Figura 10. Esquema de les tres fases del cicle de PCR. En la fase de desnaturalització, es produeix un augment de la temperatura, que provoca que les dues cadenes de DNA se separin. A continuació, en la fase d'*annealing*, la temperatura disminueix, i encebadors específics a un gen concret s'uneixen a la seqüència diana. Finalment, durant la fase d'elongació, la temperatura es manté a 72°C i la polimerasa inicia la síntesi de la cadena de DNA a partir dels encebadors.

En cadascun dels cicles, la quantitat de còpies del gen diana augmenta de forma exponencial (Erlich i Arnheim, 1992).

L'amplificació del DNA es pot detectar utilitzant una electroforesi en gel d'agarosa, amb productes intercalants de DNA i visualitzant-ho sota llum ultraviolada.

En el cas de l'RNA, es necessita una fase prèvia, en què l'RNA és convertit a DNA complementari utilitzant un enzim transcriptasa inversa.

- *PCR quantitativa*

L'aparició de la PCR quantitativa o a temps real va suposar una millora en la sensibilitat de la tècnica i en la velocitat en l'obtenció dels resultats. A més, un altre gran avantatge respecte a la PCR convencional és que va permetre la quantificació de material genètic present en la mostra.

El principi és el mateix que en la PCR convencional, però en aquest cas, el termociclador també és un detector de fluorescència a temps real.

A la reacció cal afegir-hi un tercer encebador, que pot ser específic o no específic al gen *target*. En els dos casos, aquest tercer encebador, anomenat sonda, emet fluorescència, que serà captada pel termociclador. L'augment en la senyal de fluorescència es pot observar a temps real a través d'un monitor.

- *Seqüenciació massiva*

Coneguda també com a *Next Generation Sequencing* (NGS), fa referència a un conjunt de tècniques en les quals es produeixen centenars de reaccions de seqüenciació simultàniament, i que tenen com a resultat un volum molt elevat de lectures genòmiques. Cada lectura té una longitud d'entre 50 i 300 parells de bases, i permeten la construcció de biblioteques genòmiques quan s'alineen amb un genoma de referència (Abel i Duncavage, 2013). Aquesta tecnologia té moltes aplicacions, com ara la detecció de mutacions, delecions, insercions, variacions en el número de còpies o translocacions del genoma. En l'àmbit de la diarrea porcina, la seqüenciació massiva s'ha utilitzat per obtenir les seqüències genètiques de virus entèrics, com el PEDV, kobuvirus o astrovirus (Goecke *et al.*, 2017; Rasmussen *et al.*, 2018).

4.2.3 Tècniques immunològiques

Aquestes tècniques es basen en el reconeixement específic d'un antigen per part d'anticossos. Són tècniques ràpides que s'utilitzen freqüentment en medicina humana. Una de les tècniques més utilitzades per a la detecció d'anticossos és l'ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay), que es basa en la unió específica entre l'anticòs i l'antigen que hi ha adherit en la placa. Els ELISA poden ser directes, si tenen com a objectiu la detecció d'un antigen, o indirectes si detecten anticossos.

Pel que fa a patògens entèrics, existeixen *kits* comercials d'ELISA per a la detecció de rotavirus (Zhu *et al.*, 2013), coronavirus (Carman *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2018), *E. coli* (Vázquez *et al.*, 1996), *C. perfringens* (McCourt *et al.*, 2005), *C. difficile* (Arruda *et al.*, 2016) i també per virus emergents, com kobuvirus (Khamrin *et al.*, 2014).

4.2.4 Aïllament víric

L'aïllament víric es considera la tècnica *gold standard* per a la detecció de virus. Amb l'aparició de noves tècniques més ràpides, com la PCR, però, l'aïllament ha perdut rellevància com a tècnica bàsica pel que fa al diagnòstic.

L'aïllament víric és útil per a augmentar el nombre de partícules víriques viables, i poder dur a terme altres tècniques, com ara, la seqüenciació.

En el cas dels virus entèrics, existeixen diverses línies cel·lulars que es poden utilitzar pel seu aïllament, com les cèl·lules Vero pel virus del PEDV (Oka *et al.*, 2014), les ST pel TGEV (Simkins *et al.*, 1989) o les MA104 pel Rotavirus A (Prabha i Verghese, 2009).

5. Tractament de diarrees d'origen infeccios

El tractament de les diarrees infeccioses en els garrins requereix una sèrie d'actuacions dirigides bàsicament a estabilitzar clínicament a l'animal i a eliminar la causa etiològica del problema. En el cas concret de les diarrees neonatals, aquestes actuacions s'han d'efectuar de forma molt ràpida per evitar la mort dels animals per deshidratació en poques hores.

En cas de que es tracti d'una diarrea d'origen bacterià, el protocol de tractament inclou tant el simptomàtic com l'ús d'antimicrobians. Per altra banda, no existeix cap tractament específic per a les diarrees d'origen víric, a banda del tractament simptomàtic.

5.1 Tractament simptomàtic

Per tal de pal·liar la simptomatologia de la diarrea, existeixen diverses estratègies per tractar-ne els signes clínics:

- La deshidratació és el principal perill dels garrins amb diarrea, de manera que un dels punts clau per la supervivència dels animals afectats és la rehidratació amb electròlits per via subcutània o intra-peritoneal, per tal de corregir tant la deshidratació com l'acidosis metabòlica.

- L'administració de probiòtics pot estimular la competició de bacteris no patogènics amb els patògens presents a l'intestí i són útils tant per prevenir la diarrea com per accelerar la recuperació dels garrins afectats. Normalment, els probiòtics contenen bacteris com *Lactobacillus* spp, soques no patogèniques d'*E. coli* o soques d'*Enterococcus faecium* o *Enterococcus faecalis*. L'ús simultani de probiòtics i antimicrobians, però, és contraproductiu, ja que els antimicrobians poden actuar contra els bacteris colonitzadors. (Cooper, 2000).

5.2 Tractament antimicrobià

El tractament clàssic de les diarrees d'origen bacterià ha estat majoritàriament l'administració d'antimicrobians. Els antimicrobians són útils quan es tracta d'un procés de diarrea d'etiologia bacteriana, però està contraindicat en els següents casos:

- Diarrea causada per infeccions víriques o d'origen no infeccios.
- Quan la infecció ha causat un dany intestinal previ a l'administració de l'agent antimicrobià, ja que pot accentuar la disrupció de la flora intestinal.
- En cas que l'agent etiològic causant sigui un bacteri resistent a l'antimicrobià utilitzat.

L'ús indegut d'antimicrobians com a agents terapèutics i com a profilàctics propicia l'aparició i disseminació de gens de resistència als antimicrobians entre poblacions bacterianes. La teràpia antimicrobiana ha d'estar restringida a casos concrets, i requereix un aïllament del patògen i la determinació del seu perfil de resistències (Cooper, 2000).

En la clínica veterinària, les famílies d'antibiòtics més utilitzades per al tractament de les diarrees neonatals d'origen bacterià són els beta-lactàmics, les quinolones, les tetraciclins, els aminoglicòsids i les sulfonamides.

5.2.1 Resistències antimicrobianes

El descobriment de la penicil·lina el 1928, i la seva investigació i producció a gran escala a partir del 1939, van suposar un abans i un després en els tractaments de malalties infeccioses. Durant els anys següents, es van obtenir una gran quantitat de molècules amb propietats antimicrobianes pertanyents a diverses famílies d'antibiòtics (Davies, 2006).

En producció animal, l'ús d'antibiòtics va començar poc després de la Segona Guerra Mundial. La penicil·lina va ser el primer antibiòtic a ser utilitzat per tractar mastitis bovines. Durant els anys següents, l'estreptomicina, la bacitracina i les tetraciclins van servir per tractar diferents patologies tant porcines com bovines (Page i Gautier, 2012). Durant la dècada del 1940 es va descobrir que la presència de clortetraciclina al pinso tenia també un efecte positiu en el ritme de creixement dels animals (Guardabassi, 2013). De manera que amb l'ús d'antibiòtics d'ampli espectre no només es controlaven

malalties bacterianes a nivell poblacional, sinó que a més, promouen el creixement dels animals sense que augmentés el consum de pinso (Gustafson i Bowen, 1997). L'ús d'antibiòtics com a promotors del creixement, però, afavoria l'aparició de resistències a determinats compostos antimicrobians, de manera que l'any 2006, la Unió Europea va prohibir-ne la utilització per a aquesta finalitat (Castanon, 2007).

L'aparició de bacteris resistents als antibiòtics és paral·lela a l'aparició dels antibiòtics, i de fet, la primera penicil·lina va descobrir-se abans que la penicil·lina comencés a ser utilitzada terapèuticament (Davies i Davies, 2010). Al llarg dels anys, i amb el descobriment de nous antibiòtics, s'ha repetit el mateix procés en l'aparició de resistències.

Així doncs, l'ús estès d'antibiòtics, donat el seu gran efecte beneficiós, ha generat com a conseqüència directa que, al llarg dels anys, la presència de bacteris resistents hagi esdevingut una gran problemàtica a nivell sanitari i socioeconòmic en els àmbits animal, humà i ambiental.

5.2.1.1 Mecanismes de resistència

La resistència antimicrobiana en les bactèries pot ser de dos tipus:

- Intrínseca o innata: Els gens de que confereixen resistència formen part del genoma de forma innata. Com que la majoria d'antimicrobians són compostos que es produeixen de forma natural, les poblacions bacterianes que hi conviuen en un mateix ambient han desenvolupat mecanismes de resistència per sobreviure (Munita i Arias, 2016).

- Extrínseca o adquirida: Són aquelles que apareixen com a conseqüència d'una mutació genètica o de l'adquisició de gens de resistència via plasmidis, bacteriòfags o altres elements genètics mòbils (Figura 11). La resistència adquirida permet que poblacions inicialment susceptibles a un determinat antibiòtic hi desenvolupin resistència (Quinn *et al.*, 2011). Aquests gens de resistència adquirits sovint confereixen als bacteris mecanismes per evitar l'acció d'aquests fàrmacs, com:

- Disminució de la concentració d'antibiòtic dins de la cèl·lula, ja sigui dificultant-ne l'entrada o expulsant-lo mitjançant bombes de flux (Delcour, 2009; Blair *et al.*, 2015).

- Modificació del lloc d'unió entre cèl·lula i antibiòtic.

- Inactivació de l'antibiòtic, a través d'enzims.

L'aparició de resistències adquirides es considera una conseqüència directa de l'ús excessiu d'antibiòtics tant en medicina humana com veterinària (Grayson *et al.*, 2012).

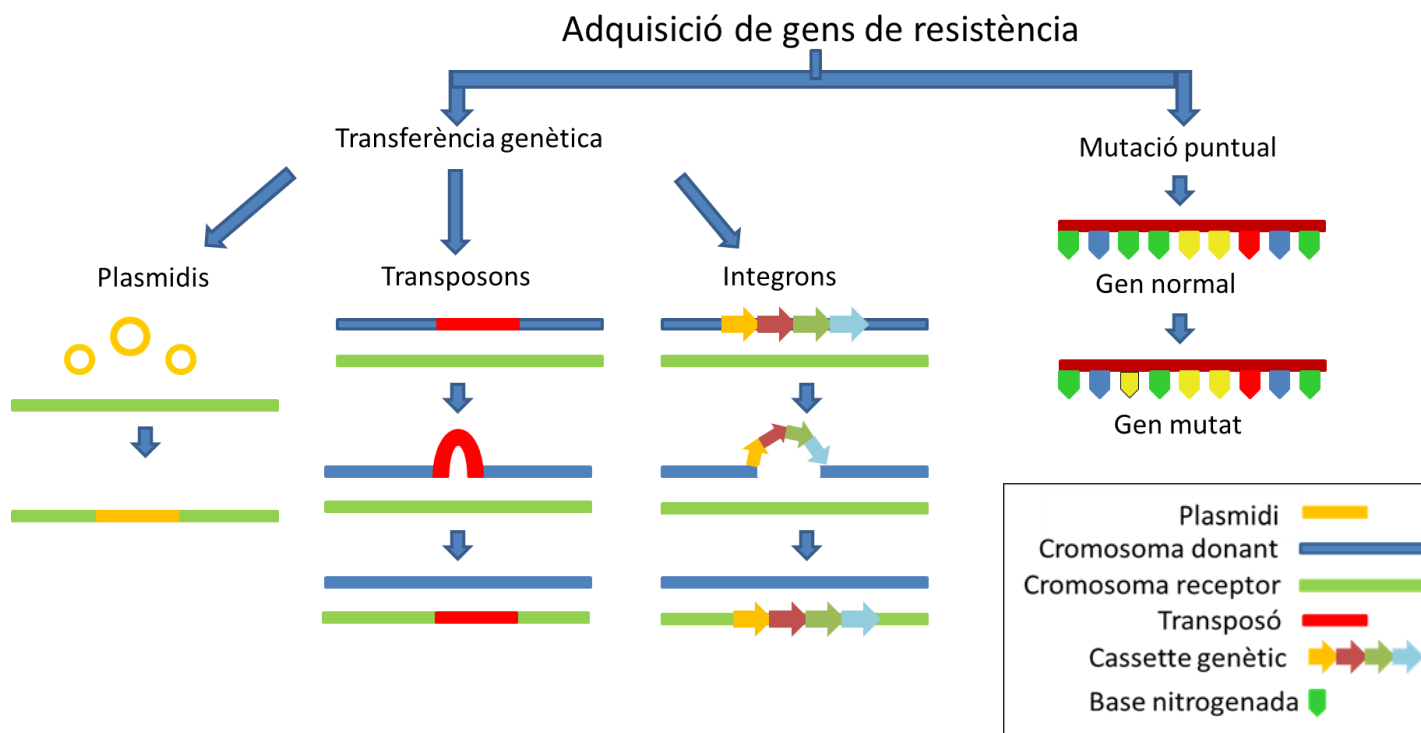


Figura 11. Mecanismes a través dels quals els bacteris poden adquirir resistència als antimicrobians.

Els gens de resistència que es transmeten per via horitzontal ho fan en forma de plasmidis, transposons o integrons. Els plasmidis són molècules de DNA que no formen part del cromosoma bacterià, que es repliquen de forma independent. Sovint contenen gens que poden facilitar la supervivència de la cèl·lula en determinades situacions, com per exemple en presència d'antibiòtics. Els transposons són seqüències genètiques de gran mobilitat que poden moure's dins d'una mateixa molècula de DNA o, fins i tot, entre dues molècules diferents (Bennett *et al.*, 2008). Finalment, els integrons són estructures genètiques capaces d'adquirir *cassettes* de gens de resistència, i permetre que aquests s'integrin al DNA d'altres estructures, com

transposons, plasmidis o al cromosoma bacterià (Rapa i Labbate, 2013). Un mateix integró pot acumular diversos *cassettes* de resistència (Fluit i Schmitz, 1999).

Aquests elements mòbils es transmeten entre bacteries a través de diferents mecanismes:

a) La conjugació és el mecanisme de transmissió més freqüent, en el qual dues cèl·lules s'uneixen mitjançant un pilus sexual que permet el pas de material genètic d'una cèl·lula a l'altra (Thomas i Nielsen, 2005).

b) La transformació consisteix en incorporar DNA 'nu' provinent d'altres bacteris que, en morir, l'han alliberat.

c) La transducció és la transferència de DNA a través d'un bacteriòfag que infecti la cèl·lula (Munita i Arias, 2016).

5.2.1.2 Gens de resistència als beta-lactàmics i a la colistina

Els beta-lactàmics són un dels grups que presenta un augment en les resistències més marcat, provocat per la disseminació de beta-lactamases. Les beta-lactamases són un grup d'enzims capaços d'hidrolitzar penicil·lines, cefalosporines, cefamicines i carbapenems entre d'altres. Actualment, les beta-lactamases es distribueixen en quatre grups (A-D), en una classificació inicialment proposada per Ambler *et al.* (1980), que es basa en les diferències aminoacídiques entre els enzims (Bush i Jacoby, 2010) (Taula 8).

Les Beta-Lactamases d'Espectre Estès (BLEE), classificades dins el grup A, constitueixen el grup més nombrós de beta-lactamases (Bush i Jacoby, 2010). Els gens de les BLEEs es localitzen habitualment en plasmidis i confereixen la capacitat d'hidrolitzar les penicil·lines, les cefalosporines d'ampli espectre (3a i 4a generació) o els monobactàmics (Rupp i Fey, 2003). Existeixen diversos tipus de BLEEs, però els més comuns són CTX-M, TEM i SHV.

	Classe	β -lactamases	Gens de resistència (exemples)
Serine β -lactamases	A	β -lactamases d'ampli espectre BLEE tipus TEM BLEE tipus SHV BLEE tipus CTX-M Carbapenemases	TEM-1, TEM-2, SHV-1 TEM-3 SHV-5 CTX-M-1, CTX-M-9 KPC
	C	AmpC	CMY, DHA
	D	β -lactamases d'ampli espectre BLEE tipus OXA Carbapenemases	OXA-1, OXA-9 OXA-2, OXA-10 OXA-48, OXA-23
Metallo	B	Metal·lo- β -lactamases	VIM, IMP

Taula 8. Descripció dels quatre grups de beta-lactamases i classificació dels gens de resistència als beta-lactàmics més habituals.

TEM i SHV van ser els primers gens de resistència als beta-lactàmics detectats a finals dels anys 70 i principis dels 80 (Matthew, 1979). Inicialment, els organismes que tenien els gens TEM-1 o SHV-1, considerats penicil·linases, presentaven resistència a l'ampicil·lina i cefalosporines de primera i segona generació, però eren susceptibles a les cefalosporines de tercera generació. Malgrat això, l'any 1983, Knothe *et al.* van descobrir un plasmidi amb un gen que, malgrat presentar una sola mutació puntual respecte SHV-1, conferia la capacitat d'hidrolitzar aquestes cefalosporines d'ampli espectre. A partir d'aquí es van anar descobrint nous gens molt similars a TEM-1 i SHV-1 en organismes resistent a les cefalosporines de tercera generació (Paterson i Bonomo, 2005), i ja considerats BLEE. A dia d'avui existeixen 132 variacions del gen SHV i 167 variacions del gen TEM³. Actualment, però, SHV i TEM han deixat de ser els gens BLEE més prevalents, i han estat substituïts per la família d'enzims CTX-M, present arreu del

³ Font: <http://www.laced.uni-stuttgart.de/>. Darrera consulta el 28/03/2019.

món (Bush, 2010). S'han detectat sovint a l'Europa de l'est, Japó i Sud-Amèrica (Bradford, 2001).

A Espanya, CTX-M, TEM i SHV han estat detectats en mostres d'animals salvatges (Cristovao *et al.*, 2017), en pollastres (Riaño *et al.*, 2006), porcs (Escudero *et al.*, 2010) i en humans (Sabaté *et al.*, 2000).

En porcs, les prevalences descrites a Europa per CTX-M se situen entre un 20 i un 40%, per TEM, entre un 5 i un 15%, i per SHV, menys d'un 5% (Randall *et al.*, 2014; García-Cobos *et al.*, 2015).

La colistina és un antimicrobià que pertany a la classe de les polimixines. El seu ús ha estat molt estès en la indústria porcina, per prevenir i tractar infeccions intestinals causades per *E. coli*, especialment les diarrees que apareixen en el moment de deslletar els animals (Rhouma *et al.*, 2017). El seu consum en veterinària ha estat relativament freqüent, però ha anat augmentant durant els últims anys, en part degut a l'augment de resistències a altres antibiòtics, i actualment és un dels cinc antimicrobians més utilitzats en la producció animal a la Unió Europea (EMA, 2016; ESVAC, 2018).

En medicina humana, en canvi, no s'utilitzava fins fa pocs anys, degut als seus efectes adversos. Però l'aparició de bacteris resistents a la majoria dels antibiòtics d'ús habitual ha fet que actualment sigui considerat un antibiòtic d'últim recurs (Kempf *et al.*, 2016).

La colistina és un dels antimicrobians amb menor percentatge de resistències.

Fins al 2016, els mecanismes de resistència descrits pel que fa a la colistina estaven causats per mutacions puntuals en el cromosoma bacterià, i no hi havia evidència que la resistència a les polimixines es transmetés per mitjà de plasmidis.

L'any 2016, però, Liu *et al.* van publicar la detecció d'un plasmidi que contenia un gen de resistència a la colistina, anomenat *mcr-1*. El descobriment d'aquest plasmidi, i d'altres plasmidis similars (*mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* i *mcr-5*) va fer que l'Agència Europea del Medicament (EMA) establís un límit de consum de colistina, a nivell de producció animal, a tots els Estats Membres i suggerís l'eliminació de l'aquest antibiòtic com a agent profilàctic (EMA, 2016).

Des del seu descobriment, els gens de resistència *mcr* s'han detectat arreu del món en aïllats d'humans i d'animals (Doumith *et al.*, 2016, Liu *et al.*, 2016).

En porcs, la freqüència dels gens de resistència a la colistina reportades fins al moment a Europa són baixes. En la majoria d'estudis conduïts a diversos països d'Europa, la prevalença dels gens *mcr* és inferior al 10% (Irrgang *et al.* 2016; Xavier *et al.*, 2016; Roschanski *et al.* 2017), tot i que en d'altres, realitzats a Espanya, França i Itàlia, s'han reportat prevalences més elevades per *mcr-1* i *mcr-4* (Delannoy *et al.*, 2017; Carattoli *et al.* 2017; García *et al.* 2018).

6. Profilaxi de les diarrees d'origen infeccios

Pel que fa a la prevenció de les diarrees neonatals, l'estratègia òptima combina tres criteris:

1. Conferir immunitat específica al garrí nouat a través de la vacunació.

L'ús de vacunes confereix immunitat al garrí contra diversos agents causants de diarrea. La vacunació de les truges és bàsica en la prevenció de la diarrea causada per aquests agents, per tal que transmetin immunitat per via lactogènica als garrins (Matías *et al.*, 2017). Actualment, existeixen vacunes dirigides a prevenir la colonització de soques patògenes d'*E. coli*, *C. perfringens* tipus A i C, i Rotavirus A. La majoria de vacunes contra *E. coli* que s'utilitzen estan compostes de bacterines amb fímbries o de fímbries purificades, que són proteïnes altament immunogèniques (Nagy *et al.*, 1978; Hur i Lee, 2013). Els anticossos que es generen com a conseqüència de la vacunació inhibeixen l'adhesió i la colonització del bacteri a l'epiteli intestinal.

La composició de les vacunes contra *E. coli* existents al mercat inclouen sub-unitats antigèniques de diverses fímbries i, en menor mesura, de toxoides. Les vacunes es poden administrar tant per via parenteral com per via oral. En alguns casos, també es combinen amb sub-unitats d'altres patògens que també provoquen diarrea, com ara *C. perfringens*. No existeixen vacunes enfront a *C. difficile* ni a les seves toxines.

Pel que fa als coronavirus, tant per PEDV com per TGEV existeixen vacunes atenuades, però la seva eficiència no és clara (Saif *et al.*, 2012). En el cas del Rotavirus A, existeix una vacuna als EEUU, però encara no està registrada per el seu ús a Europa.

Les vacunes existents i els immunògens que contenen es resumeixen a la Taula 9.

Taula 9. Relació entre els patògens entèrics i les vacunes registrades i el seu contingut.

Agent infecció	Vacuna existent	Immunògens
<i>E. coli</i>	✓	F4,F5,F6,F18,F41,LT
<i>C. perfringens A</i>	✓	Toxines α i β 2
<i>C. perfringens C</i>	✓	Toxina β
<i>C. difficile</i>	✗	-
Rotavirus A	✓	Virus modificat G4 i G5
Rotavirus B	✗	-
Rotavirus C	✗	-
PEDV	✓	Virus atenuat
TGEV	✓	Virus atenuat

2. Garantir un bon encalostament del garrí.

En el moment del naixement, el garrí no té cap tipus d'immunitat, perquè la placenta epiteliocorial no permet el pas d'anticossos de la truja cap al fetus (Bertasoli *et al.*, 2015). De manera que l'encalostament en les primeres hores de vida és crucial per tal que el garrí adquireixi els anticossos materns.

El calostre proporciona nutrients pel desenvolupament i la funcionalitat de l'aparell gastrointestinal, afavoreix la termoregulació i confereix immunitat passiva al garrí (McCallum *et al.*, 1977; Alexopoulos *et al.*, 2018). El calostre és ric en proteïnes, sobretot immunoglobulines, minerals, vitamines, factors de creixement i hormones (Hurley, 2015). La immunoglobulina majoritària és la immunoglobulina G (IgG), tot i que també hi ha IgM i IgA en nivells més baixos. L'absorció d'IgG s'ha de produir durant les primeres 36 hores de vida del garrí, quan la concentració d'IgG calostrat és més elevada i l'intestí és capaç d'absorbir els anticossos i passar-los a la sang. (Alexopoulos *et al.*, 2018; Rooke i Bland, 2002).

3. Reduir factors com la pressió infectiva o l'estrès dins de la nau.

Paral·lelament a la vacunació, garantir les condicions òptimes a les instal·lacions de la granja i el bon maneig dels animals és bàsic per reduir la incidència de la diarrea neonatal.

Un dels punts crítics és la reducció de la càrrega infecciosa de l'ambient. En aquest aspecte, una bona higiene de les naus és clau. S'ha comprovat que el sistema "tot dins tot fora" i la desinfecció de la nau entre lots pot disminuir dràsticament la pressió infectiva i, en conseqüència, la incidència de diarrees.

L'altre factor important és mantenir una temperatura i una ventilació correctes per garantir el benestar dels animals i evitar l'aparició d'estrès per fred, que augmenta la susceptibilitat davant dels patògens (Cooper, 2000).

BIBLIOGRAFIA INTRODUCCIÓ

Abel, H.J., Duncavage, E.J., 2013. Detection of structural DNA variation from next generation sequencing data: a review of informatic approaches. *Cancer Genet.* 206, 432-40.

Alekseev, K.P., Penin, A.A., Mukhin, A.N., Khametova, K.M., Grebennikova, T.V., Yuzhakov, A.G., Moskvina, A.S., Musienko, M.I., Raev, S.A., Mishin, A.M., Kotelnikov, A.P., Verkhovsky, O.A., Aliper, T.I., Nepoklonov, E.A., Herrera-Ibata, D.M., Shepherd, F.K., Marthaler, D.G., 2018. Genome characterization of a pathogenic porcine Rotavirus B strain identified in Buryat Republic, Russia in 2015. *Pathogens* 20, 7.

Alexandersen, S., Knowles, N.J., Dekker, A., Belsham, G.J., Zhang, Z., Koenen, F., 2012. Picornaviruses. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 587-620.

Alexopoulos, J.G., Lines, D.S., Hallett, S., Plush, K.J., 2018. A Review of success factors for piglet fostering in lactation. *Animals (Basel)* 8.

Allaart, J.G., van Asten, A.J., Vernooij, J.C., Gröne, A., 2014. Beta2 toxin is not involved in in vitro cell cytotoxicity caused by human and porcine cpb2-harboured Clostridium perfringens. *Vet. Microbiol.* 171, 132-38.

Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M.F., Di Ilio, C., 2013. Escherichia coli in Europe: an overview. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 6235-54.

Alonso, C., Goede, D.P., Morrison, R.B., Davies, P.R., Rovira, A., Marthaler, D.G., Torremorell, M., 2014. Evidence of infectivity of airborne porcine epidemic diarrhea virus and detection of airborne viral RNA at long distances from infected herds. *Vet Res.* 45, 73.

Alvarez-Perez, S., Blanco, J.L., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., Garcia, M.E., 2009. Prevalence of Clostridium difficile in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet. Microbiol.* 137, 302-5.

Ambler, R.P., 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 289, 321-31.

Amimo, J.O., Junga, J.O., Ogara, W.O., Vlasova, A.N., Njahira, M.N., Maina, S., Okoth, E.A., Bishop, R.P., Saif, L.J., Djikeng, A., 2015. Detection and genetic characterization of porcine group A rotaviruses in asymptomatic pigs in smallholder farms in East Africa: predominance of P[8] genotype resembling human strains. *Vet. Microbiol.* 175, 195-210.

Anand, S., Mandal, S., Patil, P., Tomar, S.K., 2016. Pathogen-induced secretory diarrhea and its prevention. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 35, 1721-39.

Annamalai, T., Saif, L.J., Lu, Z., Jung, K., 2015. Age-dependent variation in innate immune responses to porcine epidemic diarrhea virus infection in suckling versus weaned pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 168, 193-202.

Argüello, H., de Nova, P.J.G., Rubio, P., Carvajal, A., 2016. Diarrea epidémica porcina: nuevos desafíos de una vieja conocida. *Suis* 130, 12-19.

Arnold, M.M., 2016. The rotavirus interferon antagonist NSP1: many targets, many questions. *J. Virol.* 90, 5212-15.

Arruda, P.H., 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, 104-10.

Arruda, P.H., Madson, D.M., Ramirez, A., Rowe, E.W., Songer, J.G., 2016. Bacterial probiotics as an aid in the control of *Clostridium difficile* disease in neonatal pigs. *Can. Vet. J.* 57, 183-88.

Autheman, D., Wyder, M., Popoff, M., D'Herde, K., Christen, S., Posthaus, H., 2013. *Clostridium perfringens* beta-toxin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells. *PLoS One*, 8, e64644.

Baker, A.A., Davis, E., Rehberger, T., Rosener, D., 2010. Prevalence and diversity of toxigenic *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* among swine herds in the midwest. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2961-67.

Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K., Jakab, F., 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19-26.

Bennett, P.M., 2008. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br. J. Pharmacol.* 153, S347-57.

Bertasoli, B.M., dos Santos, A.C., de Paula, R.S., Barbosa, A.S., Borges da Silva, G.A., Jorge, E.C., 2015. Swine placenta and placentation. *Braz. J. Biol.* 2, 199-207.

Blair, J.M., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J., 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 13, 42-51.

Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 933-51.

Brown, C.C., Baker, D.C., Barker, I.K., 2007. Alimentary system. In: Grant Maxie, M. (ed), Jubb, Kennedy, and Palmer's pathology of domestic animals. Philadelphia, USA. Elsevier Saunders, 81-2.

Bruce, H.J., Nelson, J.K., Benfield, D.A., Nelson, E.A., 1990. Relative prevalence of typical and atypical strains among rotaviruses from diarrheic pigs in conventional swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2, 308-11.

Bueschel, D.M., Jost, B.H., Billington, S.J., Trinh, H.T., Songer, J.G., 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* 94, 121-29.

Bush, K., 2010. Bench-to-bedside review: The role of beta-lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Crit. Care* 14, 224.

Bush, K., Jacoby, G.A., 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54, 969-76.

Butler, D.G., Gall, D.G., Kelly, M.H., Hamilton, J.R., 1974. Transmissible gastroenteritis. Mechanisms responsible for diarrhea in an acute viral enteritis in piglets. *J. Clin. Invest.* 53, 1335-42.

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzoti, G., Magistrali, C.F., 2017. Novel plasmid-mediated *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22.

Carlson, S.A., Barnhill, A.E., Griffith, R.W., 2012. Salmonellosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 709-722.

Carvajal, A., Lanza, I., Diego, R., Rubio, P., Cámenes, P., 1995. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 60-64.

Carvajal, A., Argüello, H., Martínez-Lobo, F.J., Costillas, S., Miranda, R., de Nova P.J.G., Rubio, P., 2015. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Manag.* 1, 12.

Carman, S., Josephson, G., McEwen, B., Maxie, G., Antochi, M., Eernisse, K., Nayar, G., Halbur, P., Erickson, G., Nilsson, E., 2002. Field validation of a commercial blocking ELISA to differentiate antibody to transmissible gastroenteritis virus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus and to identify TGEV-infected swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.* 14, 97-105.

Castanon, J.I., 2007. History of the use of antibiotic as growth promoters in European poultry feeds. *Poult. Sci.* 86, 2466-71.

Chan, G., Farzan, A., Soltes, G., Nicholson, V.M., Pei, Y., Friendship, R., Prescott, J.F., 2012. The epidemiology of *Clostridium perfringens* type A on Ontario swine farms, with special reference to *cpb2*-positive isolates. *BMC Vet. Res.* 8, 156.

Chan, G., Farzan, A., DeLay, J., McEwen, B., Prescott, J.F., Friendship, R.M., 2013. A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. *Can. J. Vet. Res.* 77, 254-60.

Chandrasekaran, R., Lacy, D.B., 2017. The role of toxins in *Clostridium difficile* infection. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 723-750.

Chang, K.O., Saif, L.J., Kim, Y., 2012. Reoviruses (Rotaviruses and Reoviruses). In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 621-34.

Chasey, D., Cartwright, S.F., 1978. Virus-like particles associated with porcine epidemic diarrhoea. *Res. Vet. Sci.*, 25, 255-56.

Cheon, D.S., Chae, C., 1996. Outbreak of diarrhea associated with *Enterococcus durans* in piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 8, 123-24.

Clabots, C.R., Gerding, S.J., Olson, M.M., Peterson, L.R., Gerding, D.N., 1989. Detection of asymptomatic *Clostridium difficile* carriage by an alcohol shock procedure. *J. Clin. Microbiol.* 27, 2386-87.

Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., Williams, P.H., 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 365-78.

Cooper, V.L., 2000. Diagnosis of neonatal pig diarrhea. *Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 16, 117-33.

Cordero del Campillo, M., Hidalgo Argüello, M.R., Díez Baños, N., 1999. Parasitosis del aparato digestivo. In: Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A. (eds.), *Parasitología veterinaria*. Spain. McGraw-Hill/Interamericana, 451-82.

Cristóvão, F., Alonso, C.A., Igrejas, G., Sousa, M., Silva, V., Pereira, J.E., Lozano, C., Cortés-Cortés, G., Torres, C., Poeta, P., 2017. Clonal diversity of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolates in fecal samples of wild animals. *FEMS Microbiol. Lett.* 1, 364.

Czanderlova, L., Hlozek, P., Chmelar, D., Lany, P., 2006. *Clostridium perfringens* in suckling piglets with diarrhoea and its PCR typing and prevalence in the Czech Republic in 2001-2003. *Vet. Med. (Praha)* 51, 461-67.

Davies, J., 2006. Where have all the antibiotics gone?. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 17, 287-90.

Davies, J., Davies, D., 2010. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417-33.

Declerck, I., Sarrazin, S., Dewulf, J., Maes, D., 2017. Sow and piglet factors determining variation of colostrum intake between and within litters. *Animal* 11, 1336-43.

Delannoy, S., Le Devendec, L., Jouy, E., Fach, P., Drider, D., Kempf, I., 2017. Characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. *Front. Microbiol.* 8, 2278.

Delcour, A.H., 2009. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 808-16.

Desselberger, U., 2014. Rotaviruses. *Virus Res.* 190, 75-96.

Dharmasena, M., Jiang, X., 2018. Improving culture media for the isolation of *Clostridium difficile* from compost. *Anaerobe* 51, 1-7.

Ding, Z., Fang, L., Jing, H., Zeng, S., Wang, D., Liu, L., Zhang, H., Luo, R., Chen, H., Xiao, S., 2014. Porcine epidemic diarrhea virus nucleocapsid protein antagonizes beta interferon production by sequestering the interaction between IRF3 and TBK1. *J. Virol.* 88, 8936-45.

Doumith, M., Godbole, G., Ashton, P., Larkin, L., Dallman, T., Day, M., Day, M., Muller-Pebody, B., Ellington, M.J., de Pinna, E., Johnson, A.P., Hopkins, K.L., Woodford, N., 2016. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2300-5.

Doyle, L.P., Hutchings, L.M., 1946. A transmissible gastroenteritis in pigs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 108, 257-59.

Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E., Schifferli, D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal. Plus* 7.

Eichner, M., Protze, J., Piontek, A., Krause, G., Piontek, J., 2016. Targeting and alteration of tight junctions by bacteria and their virulence factors such as *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Pflugers Arch.* 469, 77-90.

Endo, Y., Tsurugi, K., Yutsudo, T., Takeda, Y., Ogasawara, T., 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. *Eur. J. Biochem.* 171, 45-50.

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.

Escudero, E., Vinué, L., Teshager, T., Torres, C., Moreno, M.A., 2010. Resistance mechanisms and farm-level distribution of fecal *Escherichia coli* isolates resistant to extended-spectrum cephalosporins in pigs in Spain. *Res. Vet. Sci.* 88, 83-87.

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

Erlich, H.A., Arnheim, N., 1992. Genetic analysis using the polymerase chain reaction. *Annu. Rev. Genet.* 26, 479-506.

Esteban-Vasallo, M.D., Naval Pellicer, S., Domínguez-Berjón, F., Cantero Caballero, M., Asensio, Á., Saravia, G., Astray-Mochales, J., 2016 *Clostridium difficile*-related hospitalizations in Madrid (Spain) between 2003 and 2014, a rising trend. *J. Infect.* 72, 401-403.

Estes, M.K., Kapikian, A., 2007. Rotaviruses. In: Knipe, D., Griffin, D., Lamb, R., Martin, M., Roizman, B., Straus, S. (eds.), *Fields Virology*. Philadelphia, USA. Wolters Kluwer Health/ Lippincott, Williams and Wilkins, 1917–75.

ESVAC, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption, 2018. Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016. London, UK. European Medicines Agency.

Fairbrother, J.M., Gyles, C.L., 2012. Colibacillosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 723-49.

Farzan, A., Kircanski, J., DeLay, J., Soltes, G., Songer, J.G., Friendship, R., Prescott, J.F., 2013. An investigation into the association between *cpb2*-encoding *Clostridium perfringens* type A and diarrhea in neonatal piglets. *Can. J. Vet. Res.* 77, 45-53.

Fehr, A.R., Perlman, S., 2015. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis. *Methods Mol. Biol.* 1282, 1-23.

Field, M., 2003. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J. Clin. Invest.* 111, 931-43. Review.

Flohr, J.R., Tokach, M.D., Dritz, S.S., DeRouchey, J.M., Goodband, R.D., 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. *J. Anim. Sci.* 92, 3624-35.

Fluit, A.C., Schmitz, F.J., 1999. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility, and epidemiology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 18, 761-70.

Frank, C., Werber, D., Cramer, J.P., Askar, M., Faber, M., an der Heiden, M., Bernard, H., Fruth, A., Prager, R., Spode, A., Wadl, M., Zoufaly, A., Jordan, S., Kemper, M.J., Follin, P.,

Müller, L., King, L.A., Rosner, B., Buchholz, U., Stark, K., Krause, G., HUS Investigation Team, 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *N. Engl. J. Med.* 365, 1771-80.

Freedman, J.C., Shrestha, A., McClane, B.A., 2016. *Clostridium perfringens* Enterotoxin: Action, Genetics, and Translational Applications. *Toxins (Basel)* 8.

Friendship, R.M.; O'Sullivan, T.L., 2015. Sow health. In: Farmer, C.(ed.), *The Gestating and Lactating Sow*. Wageningen, The Netherlands . Wageningen Academic Publishers, 409–21.

García, V., García-Meniño, I., Mora, A., Flament- Simon, S.C., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J.E., Alonso, M.P., 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). *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 104-08.

García-Cobos, S., Köck, R., Mellmann, A., Frenzel, J., Friedrich, A.W., Rossen, J.W., 2015. Molecular Typing of Enterobacteriaceae from Pig Holdings in North-Western Germany Reveals Extended- Spectrum and AmpC β -Lactamases Producing but no Carbapenem Resistant Ones. *PLoS One*. 10:e0134533.

Garmory, H.S., Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R.W., 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.* 124, 61-67.

Gerding, D.N., Johnson, S., Rupnik, M., Aktories, K., 2014. *Clostridium difficile* binary toxin CDT: mechanism, epidemiology, and potential clinical importance. *Gut Microbes* 5, 15-27.

Gibert, M., Jolivet-Reynaud, C., Popoff, M.R., 1997. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens*. *Gene* 203, 65-73.

Goecke, N.B., Hjulsager, C.K., Kongsted, H., Boye, M., Rasmussen, S., Granberg, F., Fischer, T.K.,

Midgley, S.E., Rasmussen, L.D., Angen, Ø., Nielsen, J.P., Jorsal, S.E., Larsen, L.E., 2017. No evidence of enteric viral involvement in the new neonatal porcine diarrhea syndrome in Danish pigs. *BMC Vet. Res.* 13, 315.

Grayson, M.L., Heymann, D., Pittet, D., 2012. The evolving threat of antimicrobial resistance. In: Martínez, L. (Ed.), *The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action*. Geneva, Switzerland. World Health Organization, 1-10.

Grześkowiak, Ł., Zentek, J., Vahjen, W., 2016. Determination of the extent of *Clostridium difficile* colonisation and toxin accumulation in sows and neonatal piglets. *Anaerobe* 40, 5-9.

Guardabassi, L., 2013. Sixty years of antimicrobial use in animals: what is next? *Vet. Rec.* 173, 599-603.

Gualdi, V., Vezzoli, F., Luini, M., Nisoli, L., 2003. The role of *Iso spor a suis* in the etiology of diarrhoea in suckling pigs. *Parasitol. Res.* 90, 163-65.

Guo, M., Evermann, J.F., Saif, L.J., 2001. Detection and molecular characterization of cultivable caliciviruses from clinically normal mink and enteric caliciviruses associated with diarrhea in mink. *Arch. Virol.* 146, 479-93.

Gustafson, R.H., Bowen, R.E., 1997. Antibiotic use in animal agriculture. *J. Appl. Microbiol.* 83, 531-41.

Harleman, J.H., Meyer, R.C., 1983. *Iso spor a suis* infection in piglets. A review. *Vet. Q.* 5, 178-85.

Hoffer, E., Haechler, H., Frej, R., Stephan, R., 2010. Low occurrence of *Clostridium difficile* in fecal samples of healthy calves and pigs at slaughter and in minced meat in Switzerland. *J. Food Prot.* 73, 973-75.

Hooper, B.E., Haelterman, E.O., 1969. Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med.* 33, 29-36.

Hopman, N.E., Keessen, E.C., Harmanus, C., Sanders, I.M., van Leengoed, L.A., Kuijper, E.J., Lipman, L.J., 2011. Acquisition of *Clostridium difficile* by piglets. *Vet Microbiol.* 149, 186-92.

Horak, S., Leedom Larson, K.R., 2016. Porcine adenovirus. Swine Health Information Center and Center for Food Security and Public Health, College of Veterinary Medicine, Iowa State University.

Hu, L., Crawford, S.E., Hyser, J.M., Estes, M.K., Prasad, B.V., 2012. Rotavirus non-structural proteins: structure and function. *Curr. Opin. Virol.* 2, 380-88.

Hur, J., Lee, J.H., 2013. Protection against neonatal *Escherichia coli* diarrhea by vaccination of sows with a novel multivalent vaccine candidate expressing *E. coli* adhesins associated with neonatal pig colibacillosis. *Res. Vet. Sci.* 94, 198-204.

Hurley, W.L., 2015. Composition of sow colostrum and milk. In: Farmer, C. (ed.), *The gestating and lactating sow*. The Netherlands. Wageningen Academic Publishers, 193-229.

Hutton, M.L., Mackin, K.E., Chakravorty, A., Lyras, D., 2014. Small animal models for the study of *Clostridium difficile* disease pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 352, 140-49.

Indik, S., Valíček, L., Smíd, B., Dvoráková, H., Rodák, L., 2006. Isolation and partial characterization of a novel porcine astrovirus. *Vet. Microbiol.* 117, 276-83.

Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B.A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Zierner, T., Thomas, K., Roesler, U., Käsbohrer, A., 2016. Prevalence of mcr-1 in *E. coli* from livestock and food in Germany, 2010-2015. PLoS One 11, e0159863.

Jackova, A., Sliz, I., Mandelik, R., Salamunova, S., Novotny, J., Kolesarova, M., Vlasakova, M., Vilcek, S., 2017. Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A. Infect. Genet. Evol. 49, 73-77.

Jäggi, M., Wollschläger, N., Abril, C., Albini, S., Brachelente, C., Wyder, M., Posthaus, H., 2009. Retrospective study on necrotizing enteritis in piglets in Switzerland. Schweiz. Arch. Tierheilkd. 151, 369-75.

Johansson, A., Aspan, A., Bagge, E., Båverud, V., Engström, B.E., Johansson, K.E., 2006. Genetic diversity of *Clostridium perfringens* type A isolates from animals, food poisoning outbreaks and sludge. BMC Microbiol. 6, 47.

Jung, K., Saif, L.J., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus infection: Etiology, epidemiology, pathogenesis and immunoprophylaxis. Vet. J. 204, 134-43.

Keessen, E.C., Gaastra, W., Lipman, L.J., 2011. *Clostridium difficile* infection in humans and animals, differences and similarities. Vet. Microbiol. 153, 205-17.

Kempf, I., Jouy, E., Chauvin, C., 2016. Colistin use and colistin resistance in bacteria from animals. Int. J. Antimicrob. Agents. 48, 598-606.

Khamrin, P., Maneekarn, N., Okitsu, S., Ushijima, H., 2014. Epidemiology of human and animal kobuviruses. Virusdisease, 25, 195-200.

Kim, L., Hayes, J., Lewis, P., Parwani, A.V., Chang, K.O., Saif, L.J., 2000. Molecular characterization and pathogenesis of transmissible gastroenteritis coronavirus (TGEV) and porcine respiratory coronavirus (PRCV) field isolates co-circulating in a swine herd. Arch. Virol. 145, 1133-47.

Kim, H.H., Matthijnssens, J., Kim, H.J., Kwon, H.J., Park, J.G., Son, K.Y., Ryu, E.H., Kim, D.S., Lee, W.S., Kang, M.I., Yang, D.K., Hyun, B.H., Park, S.I., Park, S.J., Cho, K.O., 2012. Full-length genomic analysis of porcine G9P[23] and G9P[7] rotavirus strains isolated from pigs with diarrhea in South Korea. Infect. Genet. Evol. 12, 1427-35.

Klaasen, H.L., Molkenboer, M.J., Bakker, J., Miserez, R., Häni, H., Frey, J., Popoff, M.R., van den Bosch, J.F., 1999. Detection of the beta2 toxin gene of *Clostridium perfringens* in diarrhoeic piglets in The Netherlands and Switzerland. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 24, 325-32.

Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., Mitsuhashi, S., 1983. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 11, 315-17.

Kocherhans, R., Bridgen, A., Ackermann, M., Tobler, K., 2001. Completion of the porcine epidemic diarrhoea coronavirus (PEDV) genome sequence. *Virus Genes* 23, 137-44.

Kongsted, H., Jonach, B., Haugegaard, S., Angen, O., Jorsal, S.E., Kokotovic, B., Larsen, L.E., Jensen, T.K., Nielsen, J.P., 2013. Microbiological, pathological and histological findings in four Danish pig herds affected by a new neonatal diarrhoea syndrome. *BMC Vet. Res.* 9, 206.

Kopic, S., Geibel, J.P., 2010. Toxin mediated diarrhea in the 21 century: the pathophysiology of intestinal ion transport in the course of ETEC, *V. cholera* and rotavirus infection. *Toxins (Basel)* 2, 2132-57.

Koransky, J.R., Allen, S.D., Dowell, V.R., 1978. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 762-65.

Langendijk, P., Fleuren, M., van Hees, H., van Kempen, T., 2018. The course of parturition affects piglet condition at birth and survival and growth through the nursery phase. *Animals (Basel)* 8.

Larsson, J., Lindberg, R., Aspán, A., Grandon, R., Westergren, E., Jacobson, M., 2014. Neonatal piglet diarrhoea associated with enteroadherent *Enterococcus hirae*. *J. Comp. Pathol.* 151, 137-47.

Lawson, P.A., Citron, D.M., Tyrrell, K.L., Finegold, S.M., 2016. Reclassification of *Clostridium difficile* as *Clostridioides difficile* (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938. *Anaerobe* 40, 95-99.

Lecce, J.G., Balsbaugh, R.K., Clare, D.A., King, M.W., 1982. Rotavirus and hemolytic enteropathogenic *Escherichia coli* in weanling diarrhea of pigs. *J. Clin. Microbiol.* 16, 715-23.

Li, R., Tian, X., Qiao, S., Guo, J., Xie, W., Zhang, G., 2015. Complete genome sequence of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus variant CH/HNYF/2014. *Genome Announc.* 3.

Li, J., Paredes-Sabja, D., Sarker, M.R., McClane, B.A., 2016. *Clostridium perfringens* sporulation and sporulation-associated toxin production. *Microbiol. Spectr.* 4.

Li, C., Li, W., Lucio de Esesarte, E., Guo, H., van den Elzen, P., Aarts, E., van den Born, E., Rottier, P.J.M., Bosch, B.J., 2017. Cell attachment domains of the Porcine Epidemic Diarrhea Virus spike protein are key targets of neutralizing antibodies. *J. Virol.* 91.

Lin, C.M., Gao, X., Oka, T., Vlasova, A.N., Esseili, M.A., Wang, Q., Saif, L.J., 2015. Antigenic relationships among porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus strains. *J. Virol.* 89, 3332-42.

Lin, H., Zhou, H., Gao, L., Li, B., He, K., Fan, H., 2018. Development and application of an indirect ELISA for the detection of antibodies to porcine epidemic diarrhea virus based on a recombinant spike protein. *BMC Vet. Res.* 14, 243.

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., 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. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161-68.

Lossec, G., Herpin, P., Le Dividich, J., 1998. Thermoregulatory responses of the newborn pig during experimentally induced hypothermia and rewarming. *Exp. Physiol.* 83, 667-78.

Ludert, J.E., Ruiz, M.C., Hidalgo, C., Liprandi, F., 2002. Antibodies to rotavirus outer capsid glycoprotein VP7 neutralize infectivity by inhibiting virion decapsidation. *J. Virol.* 76, 6643-51.

Luppi, A., 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag.* 3, 16.

Madson, D.M., Magstadt, D.R., Arruda, P.H., Hoang, H., Sun, D., Bower, L.P., Bhandari, M., Burrough, E.R., Gauger, P.C., Pillatzki, A.E., Stevenson, G.W., Wilberts, B.L., Brodie, J., Harmon, K.M., Wang, C., Main, R.G., Zhang, J., Yoon, K.J., 2014. Pathogenesis of porcine epidemic diarrhea virus isolate (US/Iowa/18984/2013) in 3-week-old weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 174, 60-68.

Masuda, T., Tsuchiaka, S., Ashiba, T., Yamasato, H., Fukunari, K., Omatsu, T., Furuya, T., Shirai, J., Mizutani, T., Nagai, M., 2016. Development of one-step real-time reverse transcriptase-PCR-based assays for the rapid and simultaneous detection of four viruses causing porcine diarrhea. *Jpn. J. Vet. Res.* 64, 5-14.

Marler, L.M., Siders, J.A., Wolters, L.C., Pettigrew, Y., Skitt, B.L., Allen, S.D., 1992. Comparison of five cultural procedures for isolation of *Clostridium difficile* from stools. *J. Clin. Microbiol.* 30, 514-16.

Marthaler, D., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnsens, J., Nelson, M., Ciarlet, M., 2014. Widespread rotavirus H in commercially raised pigs, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1195-98.

Marthaler, D., Homwong, N., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnsens, J., Ciarlet, M., 2014b. Rapid detection and high occurrence of porcine rotavirus A, B, and C by RT-qPCR in diagnostic samples. *J. Virol. Methods* 209, 30-34.

Martín, M., Casal, J., Lanza, I., Rubio, P., Cármenes, P., 1994. Porcine respiratory coronavirus spread in Catalunya, Spain, a previously infection-free area. *Prev. Vet. Med.* 21, 65-74.

Martín-Alonso, J.M., Balbín, M., Garwes, D.J., Enjuanes, L., Gascón, S., Parra, F., 1992. Antigenic structure of transmissible gastroenteritis virus nucleoprotein. *Virology* 188, 168-74.

Matías, J., Berzosa, M., Pastor, Y., Irache, J.M., Gamazo, C., 2017. Maternal Vaccination. Immunization of Sows during Pregnancy against ETEC Infections. *Vaccines (Basel)* 5.

Matthew, M., 1979. Plasmid-mediated beta-lactamases of Gram-negative bacteria: properties and distribution. *J. Antimicrob. Chemother.* 5, 349-58.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., McDonald, S.M., Attoui, H., Bányai, K., Brister, J.R., Buesa, J., Esona, M.D., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Johne, R., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Parreño, V., Rahman, M., Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Patton, J.T., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156, 1397-413.

McCallum, I.M., Elliot, J.I., Owen, B.D., 1977. Survival of colostrum-deprived neonatal piglets fed gamma-globulins. *Can. J. Anim. Sci.* 57, 151-58.

McClane, B.A., 2005. Clostridial enterotoxins. In: Druse, P. (ed.), *Handbook on Clostridia*. Boca Raton, USA. CRC Press, 385–406.

McCourt, M.T., Finlay, D.A., Laird, C., Smyth, J.A., Bell, C., Ball, H.J., 2005. Sandwich ELISA detection of *Clostridium perfringens* cells and alpha-toxin from field cases of necrotic enteritis of poultry. *Vet. Microbiol.* 106, 259-64.

Midgley, S.E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsgager, C.K., Jakab, F., Kaplon, J., Larsen, L.E., Monini, M., Poljšak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Steyer, A., Koopmans, M., Böttiger, B., 2012. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156, 238-45.

Mihalov-Kovács, E., Gellért, Á., Marton, S., Farkas, S.L., Fehér, E., Oldal, M., Jakab, F., Martella, V., Bányai, K., 2015. Candidate new rotavirus species in sheltered dogs, Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 660-63.

Modolo, J.R., Fernandes Margato, L.F., Gottschalk, A.F., Magalhães Lopes, C.A., 1999. Incidence of *Campylobacter* in pigs with and without diarrhea. *Rev. Microbiol.* 30, 19-21.

Molinari, B.L., 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, 125-32.

Munita, J.M., Arias, C.A., 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Spectr.* 4.

Nagy, B., Moon, H.W., Isaacson, R.E., To, C.C., Brinton, C.C., 1978. Immunization of suckling pigs against enteric enterotoxigenic *Escherichia coli* infection by vaccinating dams with purified pili. *Infect. Immun.* 21, 269-74.

Niilo, L., 1988. *Clostridium perfringens* type C enterotoxemia. *Can. Vet. J.* 29, 658-664.

Ngamwongsatit, B., Tanomsridachchai, W., Suthienkul, O., Urairong, S., Navasakuljinda, W., Janvilisri, T., 2016. Multidrug resistance in *Clostridium perfringens* isolated from diarrheal neonatal piglets in Thailand. *Anaerobe* 38, 88-93.

Ogden, K.M., Snyder, M.J., Dennis, A.F., Patton, J.T., 2014. Predicted structure and domain organization of rotavirus capping enzyme and innate immune antagonist VP3. *J. Virol.* 88, 9072-85.

Oka, T., Saif, L.J., Marthaler, D., Esseili, M.A., Meulia, T., Lin, C.M., Vlasova, A.N., Jung, K., Zhang, Y., Wang, Q., 2014. Cell culture isolation and sequence analysis of genetically diverse US porcine epidemic diarrhea virus strains including a novel strain with a large deletion in the spike gene. *Vet. Microbiol.* 173, 258-69.

Otto, P.H., Rosenhain, S., Elschner, M.C., Hotzel, H., Machnowska, P., Trojnar, E., Hoffmann, K., Johne, R., 2015. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhoea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet. Microbiol.* 179, 168-76.

Page, S.W., Gautier, P., 2012. Use of antimicrobial agents in livestock. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 31, 145-88.

Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijssens, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Microbiol.* 165, 190-99.

Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 18, 657-86.

Patton, J.T., Jones, M.T., Kalbach, A.N., He, Y.W., Xiaobo, J., 1997. Rotavirus RNA polymerase requires the core shell protein to synthesize the double-stranded RNA genome. *J. Virol.* 71, 9618-26.

Pensaert, M.B., de Bouck, P., 1978. A new coronavirus-like particle associated with diarrhea in swine. *Arch. Virol.* 58, 243-47.

- Pépin, J., Valiquette, L., Alary, M.E., Villemure, P., Pelletier, A., Forget, K., Pépin, K., Chouinard, D., 2004. Clostridium difficile-associated diarrhea in a region of Quebec from 1991 to 2003: a changing pattern of disease severity. CMAJ.171, 466-72.
- Pépin, J., Valiquette, L., Gagnon, S., Routhier, S., Brazeau, I., 2007. Outcomes of Clostridium difficile-associated disease treated with metronidazole or vancomycin before and after the emergence of NAP1/027. Am. J. Gastroenterol. 102, 2781-88.
- Persson, S., Torpdahl, M., Olsen, K.E., 2008. New multiplex PCR method for the detection of Clostridium difficile toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. Clin. Microbiol. Infect.14, 1057-64.
- Pierron, A., Alassane-Kpembi, I., Oswald, I.P., 2016. Impact of two mycotoxins deoxynivalenol and fumonisin on pig intestinal health. Porcine Health Manag. 2, 21.
- Prabha, S., Verghese, S., 2009. Detection of porcine rotavirus from tissue and faecal specimens. Indian J. Med. Microbiol. 27, 149-52.
- Qadri, F., Svennerholm, A.M., Faruque, A.S., Sack, R.B., 2005. Enterotoxigenic Escherichia coli in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. Clin. Microbiol. Rev. 18, 465-83.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J., 2011. Antibacterial resistance. In: Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S., Hartigan, P.J., Veterinary Microbiology and Microbial Disease. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 157-64.
- Randall, L.P., Lemma, F., Rogers, J.P., Cheney, T.E., Powell, L.F., Teale, C.J., 2014. Prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Escherichia coli from pigs at slaughter in the UK in 2013. J. Antimicrob. Chemother. 69, 2947-50.
- Rapa, R.A., Labbate, M., 2013. The function of integron-associated gene cassettes in Vibrio species: the tip of the iceberg. Front. Microbiol. 4, 385.
- Rasmussen, T.B., Boniotti, M.B., Papetti, A., Grasland, B., Frossard, J.P., Dastjerdi, A., Hulst, M., Hanke, D., Pohlmann, A., Blome, S., van der Poel, W.H.M., Steinbach, F., Blanchard, Y., Lavazza, A., Bøtner, A., Belsham, G.J., 2018. Full-length genome sequences of porcine epidemic diarrhoea virus strain CV777; Use of NGS to analyse genomic and sub-genomic RNAs. PLoS One 13:e0193682.
- Reese, D.E., Miller, P.S., 2012. Nutrient deficiencies and excesses. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), Diseases of swine. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 923-37.

- Reuter, G., Zimsek-Mijovski, J., Poljsak-Prijatelj, M., Di Bartolo, I., Ruggeri, F.M., Kantala, T., Maunula, L., Kiss, I., Kecskeméti, S., Halaihel, N., Buesa, J., Johnsen, C., Hjulsager, C.K., Larsen, L.E., Koopmans, M., Böttiger, B., 2010. Incidence, diversity, and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *J. Clin. Microbiol.* 48, 363-68.
- Rey, F.A., Lepault, J., Cohen, J., 2003. The three-dimensional structure of rotavirus VP6. In: Desselberger, U., Gray, J. (eds.), *Viral gastroenteritis*. Houston, USA. Gulf Publishing company, 129-41.
- 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.* 59, 31.
- Riaño, I., Moreno, M.A., Teshager, T., Sáenz, Y., Domínguez, L., Torres, C., 2006. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Salmonella enterica* strains of healthy food animals in Spain. *J. Antimicrob. Chemother.* 58, 844-47.
- Riley, T.V., Brazier, J.S., Hassan, H., Williams, K., Phillips, K.D., 1987. Comparison of alcohol shock enrichment and selective enrichment for the isolation of *Clostridium difficile*. *Epidemiol. Infect.* 99, 355-59.
- Rodriguez, C., Warszawski, N., Korsak, N., Taminiau, B., Van Broeck, J., Delmée, M., Daube, G., 2016. Laboratory identification of anaerobic bacteria isolated on *Clostridium difficile* selective medium. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* 63, 171-84.
- Rooke, J.A., Bland, I.M., 2002. The acquisition of passive immunity in the new-born piglet. *Livest. Prod. Sci.* 78, 13-23.
- Roschanski, N., Falgenhauer, L., Grobbel, M., Guenther, S., Kreienbrock, L., Imirzalioglu, C., Roesler, U., 2017. Retrospective survey of *mcr-1* and *mcr-2* in German pig-fattening farms, 2011-2012. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 266-71.
- Ruan, X., Crupper, S.S., Schultz, B.D., Robertson, D.C., Zhang, W., 2012. *Escherichia coli* expressing EAST1 toxin did not cause an increase of cAMP or cGMP levels in cells, and no diarrhea in 5-day old gnotobiotic pigs. *PLoS One.* 7, e43203.
- Ruch, T.R., Machamer, C.E., 2012. The coronavirus E protein: assembly and beyond. *Viruses* 4, 363-82.
- Rupp, M.E., Fey, P.D., 2003. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs* 63, 353-65.
- Sabaté, M., Tarragó, R., Navarro, F., Miró, E., Vergés, C., Barbé, J., Prats, G., 2000. Cloning and sequence of the gene encoding a novel cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase (CTX-M-9) from *Escherichia coli* in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 1970-73.

Saif, L.J., Pensaert, M.B., Sestak, K., Yeo, S.G., Jung, K., 2012. Coronaviruses. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), Diseases of swine. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 501-24.

Sangild, P.T., Petersen, Y.M., Schmidt, M., Elnif, J., Petersen, T.K., Buddington, R.K., Greisen, G., Michaelsen, K.F., Burrin, D.G., 2002. Preterm birth affects the intestinal response to parenteral and enteral nutrition in newborn pigs. *J. Nutr.* 132, 2673-81.

Sayeed, S., Uzal, F.A., Fisher, D.J., Saputo, J., Vidal, J.E., Chen, Y., Gupta, P., Rood, J.I., McClane, B.A., 2008. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model. *Mol. Microbiol.* 67, 15-30.

Savarino, S.J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B.M., Levine, M.M., Guandalini, S., Guerry, P., 1993. Enteraggagative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 3093-97.

Sakurai, J., Nagahama, M., 2006. *Clostridium perfringens* beta-toxin: characterization and action. *Toxin Rev.* 25, 89-108.

Schumacher, V.L., Martel, A., Pasmans, F., Van Immerseel, F., Posthaus, H., 2013. Endothelial binding of beta toxin to small intestinal mucosal endothelial cells in early stages of experimentally induced *Clostridium perfringens* type C enteritis in pigs. *Vet. Pathol.* 50, 626-9.

Shi, D., Lv, M., Chen, J., Shi, H., Zhang, S., Zhang, X., Feng, L., 2014. Molecular characterizations of subcellular localization signals in the nucleocapsid protein of porcine epidemic diarrhea virus. *Viruses* 6, 1253-73.

Shibata, I., Tsuda, T., Mori, M., Ono, M., Sueyoshi, M., Uruno, K., 2000. Isolation of porcine epidemic diarrhea virus in porcine cell cultures and experimental infection of pigs of different ages. *Vet. Microbiol.* 72, 173-82.

Silva, R.O., D'Elia, M.L., Tostes Teixeira, E.P., Pereira, P.L., de Magalhães Soares, D.F., Cavalcanti, Á.R., Kocuvan, A., Rupnik, M., Santos, A.L., Junior, C.A., Lobato, F.C., 2014. *Clostridium difficile* and *Clostridium perfringens* from wild carnivore species in Brazil. *Anaerobe* 28, 207-11.

Silva, R.O., Lobato, F.C., 2015. *Clostridium perfringens*: A review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. *Anaerobe* 33, 14-7.

Silva, F.D., Espinoza, L.R., Tonietti, P.O., Barbosa, B.R., Gregori, F., 2015b. Whole-genomic analysis of 12 porcine group A rotaviruses isolated from symptomatic piglets in Brazil during the years of 2012-2013. *Infect. Genet. Evol.* 32, 239-54.

Simkins, R.A., Saif, L.J., Weilnu, P.A., 1989. Epitope mapping and the detection of transmissible gastroenteritis viral proteins in cell culture using biotinylated monoclonal antibodies in a fixed-cell ELISA. *Arch Virol.* 107, 179-90.

Siu, K.L., Kok, K.H., Ng, M.H., Poon, V.K., Yuen, K.Y., Zheng, B.J., Jin, D.Y., 2009. Severe acute respiratory syndrome coronavirus M protein inhibits type I interferon production by impeding the formation of TRAF3.TANK.TBK1/IKKepsilon complex. *J. Biol. Chem.* 284, 16202-9.

Skampardonis, V., Sotiraki, S., Kostoulas, P., Leontides, L., 2012. Factors associated with the occurrence and level of *Isospora suis* oocyst excretion in nursing piglets of Greek farrow-to-finish herds. *BMC Vet. Res.* 8, 228.

Smitalova, R., Rodak, L., Smid, B., Psikal, I., 2009. Detection of nongroup A rotaviruses in faecal samples of pigs in the Czech Republic. *Vet. Med. (Praha)* 54, 12-18.

Snijder, E.J., Decroly, E., Ziebuhr, J., 2016. The Nonstructural Proteins directing Coronavirus RNA synthesis and processing. *Adv. Virus Res.* 96, 59-126.

Song, D., Park, B., 2012. Porcine epidemic diarrhoea virus: a comprehensive review of molecular epidemiology, diagnosis, and vaccines. *Virus Genes* 44, 167-75.

Songer, J.G., Uzal, F.A., 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 528-36.

Songer, J.G., 2012. Clostridiosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 709-722.

Stevenson, G.W., Hoang, H., Schwartz, K.J., Burrough, E.R., Sun, D., Madson, D., Cooper, V.L., Pillatzki, A., Gauger, P., Schmitt, B.J., Koster, L.G., Killian, M.L., Yoon, K.J., 2013. Emergence of Porcine epidemic diarrhea virus in the United States: clinical signs, lesions, and viral genomic sequences. *J. Vet. Diagn. Invest.* 25, 649-54.

Stubbs, S., Rupnik, M., Gibert, M., Brazier, J., Duerden, B., Popoff, M., 2000. Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol. Lett.* 186, 307-12.

Susick, E.K., Putnam, M., Bermudez, D.M., Thakur, S., 2012. Longitudinal study comparing the dynamics of *Clostridium difficile* in conventional and antimicrobial free pigs at farm and slaughter. *Vet. Microbiol.* 157, 172-78.

Taniguchi, Y., Tamamura, Y., Wada, Y., Kobayashi, A., Shibahara, T., Ishiwaka, Y., Kadota, K., 2017. Diarrhea caused by *Enterococcus villorum* in piglets. *Jpn. Agr. Res. Q.* 51, 287-92.

- Taylor, D.J., 2012. Miscellaneous bacterial infections. In: : Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), Diseases of swine. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 866-881.
- Thamsborg, S.M., Ketzis, J., Horii, Y., Matthews, J.B., 2017. Strongyloides spp. infections of veterinary importance. Parasitology 144, 274-84.
- Thomas, C.M., Nielsen, K.M., 2005. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. Nat. Rev. Microbiol. 3, 711-21.
- Toledo, A., Gómez, D., Cruz, C., Carreón, R., López, J., Giono, S., Castro, A.M., 2012. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. J. Med. Virol. 61, 148-56.
- Torres, A., 2004. Prevalence survey of *Isospora suis* in twelve European countries. Proceedings of the 18th IPVS Congress, Hamburg, 243.
- Van Asten, A.J., van der Wiel, C.W., Nikolaou, G., Houwers, D.J., Gröne, A., 2009. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol. 136, 411-12.
- Vásquez-del Carpió, R., Morales, J.L., Barro, M., Ricardo, A., Spencer, E., 2006. Bioinformatic prediction of polymerase elements in the rotavirus VP1 protein. Biol. Res. 39, 649-59.
- Vazquez, F., González, E.A., Garabal, J.I., Valderrama, S., Blanco, J., Baloda, S.B., 1996. Development and evaluation of an ELISA to detect *Escherichia coli* K88 (F4) fimbrial antibody levels. J. Med. Microbiol. 44, 453-63.
- Vedantam, G., Clark, A., Chu, M., McQuade, R., Mallozzi, M., Viswanathan, V.K., 2012. *Clostridium difficile* infection: toxins and non-toxin virulence factors, and their contributions to disease establishment and host response. Gut Microbes 3, 121-34.
- Vidal, J.E., McClane, B.A., Saputo, J., Parker, J., Uzal, F.A., 2008. Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon. Infect. Immun. 76, 4396-404.
- Voth, D.E., Ballard, J.D., 2005. *Clostridium difficile* toxins: mechanism of action and role in disease. Clin. Microbiol. Rev. 18, 247-63.
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., López, C., González, E.A., Blanco, J., 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. Vet. J. 174, 176-87.
- Wakuda, M., Ide, T., Sasaki, J., Komoto, S., Ishii, J., Sanekata, T., Taniguchi, K., 2011. Porcine rotavirus closely related to novel group of human rotaviruses. Emerg. Infect. Dis. 17, 1491-93.

Wang, L., Wakushima, M., Aota, T., Yoshida, Y., Kita, T., Maehara, T., Ogasawara, J., Choi, C., Kamata, Y., Hara-Kudo, Y., Nishikawa, Y., 2013. Specific properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 1232-40.

Wang, L., Hayes, J., Byrum, B., Zhang, Y., 2016. US variant porcine epidemic diarrhea virus: histological lesions and genetic characterization. *Virus Genes.* 52, 578-81.

Wang, L., Zhang, Y., 2017. Genomic Characterization of a New PRCV Variant, United States, 2014. *Transbound. Emerg. Dis.* 64, 672-74.

Waters, E.H., Orr, J.P., Clark, E.G., Schaufele, C.M., 1998. Typhlocolitis caused by *Clostridium difficile* in suckling piglets. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10, 104-8.

Weese, J.S., Wakeford, T., Reid-Smith, R., Rousseau, J., Friendship, R., 2010. Longitudinal investigation of *Clostridium difficile* shedding in piglets. *Anaerobe* 16, 501-4.

Welter, M.W., Horstman, M.P., Welter, C.J., Welter, L.M., 1993. An overview of successful TGEV vaccination strategies and discussion on the interrelationship between TGEV and PRCV. *Adv. Exp. Med. Biol.* 342, 463-68.

Wesley, R.D., Woods, R.D., 1993. Immunization of pregnant gilts with PRCV induces lactogenic immunity for protection of nursing piglets from challenge with TGEV. *Vet. Microbiol.* 38, 31-40.

Wesley, R.D., Lager, K.M., 2003. Increased litter survival rates, reduced clinical illness and better lactogenic immunity against TGEV in gilts that were primed as neonates with porcine respiratory coronavirus (PRCV). *Vet. Microbiol.* 95, 175-86.

Wood, E.N., 1977. An apparently new syndrome of porcine epidemic diarrhoea. *Vet. Rec.* 100, 243-44.

Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhel, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro. Surveill.* 21.

Xu, R.J., Mellor, D.J., Tungthanathanich, P., Birtles, M.J., Reynolds, G.W., Simpson, H.V., 1992. Growth and morphological changes in the small and the large intestine in piglets during the first three days after birth. *J. Dev. Physiol.* 18, 161-72.

Xu, X.G., Zhang, H.L., Zhang, Q., Dong, J., Huang, Y., Tong, D.W., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus M protein blocks cell cycle progression at S-phase and its subcellular localization in the porcine intestinal epithelial cells. *Acta Virol.* 59, 265-75.

Yadav, J.P., Das, S.C., Dhaka, P., Vijay, D., Kumar, M., Mukhopadhyay, A.K., Chowdhury, G., Chauhan, P., Singh, R., Dhama, K., Malik, S.V.S., Kumar, A., 2017. Molecular characterization and antimicrobial resistance profile of *Clostridium perfringens* type A isolates from humans, animals, fish and their environment. *Anaerobe* 47, 120-124.

Yaeger, M.J., Kinyon, J.M., Songer, G.J., 2007. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 52-59.

Yan, X., Hao, Q., Mu, Y., Timani, K.A., Ye, L., Zhu, Y., Wu, J., 2006. Nucleocapsid protein of SARS-CoV activates the expression of cyclooxygenase-2 by binding directly to regulatory elements for nuclear factor-kappa B and CCAAT/enhancer binding protein. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 1417-28.

Yang, C.C., Hsu, P.C., Chang, H.J., Cheng, C.W., Lee, M.H., 2013. Clinical significance and outcomes of *Clostridium perfringens* bacteremia—a 10-year experience at a tertiary care hospital. *Int. J. Infect. Dis.* 17:e955-60.

Yang, X., Twitchell, E., Li, G., Wen, K., Weiss, M., Kocher, J., Lei, S., Ramesh, A., Ryan, E.P., Yuan, L., 2015. High protective efficacy of rice bran against human rotavirus diarrhea via enhancing probiotic growth, gut barrier function and innate immunity. *Sci. Rep.* 5:15004.

Zajacova, Z.S., Konstantinova, L., 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. *Vet. Microbiol.* 154, 369-75.

Zhu, J., Yang, Q., Cao, L., Dou, X., Zhao, J., Zhu, W., Ding, F., Bu, R.E., Suo, S., Ren, Y., Li, G., Ren, X., 2013. Development of porcine rotavirus vp6 protein based ELISA for differentiation of this virus and other viruses. *Viol. J.* 10:91.

OBJECTIUS

És conegut que les diarrees neonatals tenen un component multifactorial, entre els quals s'inclouen agents infecciosos. Es poden trobar molts estudis sobre les causes de diarrea enfocats en els animals malalts però, en canvi, hi ha pocs estudis on es determini quin és el paper d'aquests diferents patògens en què es considerin tant animals afectats com animals aparentment sans de la mateixa covada. D'altra banda, el diagnòstic de laboratori precisa considerar les possibles interaccions de tots els microorganismes que participin en els brots per fer un abordatge integral. És habitual fer diagnòstics centrats en la detecció d'un sol patogen i no considerar possibles coinfeccions al mateix temps. També, entre els agents bacterians és freqüent l'aparició de resistències als antimicrobians utilitzats de forma habitual a les granges. La seva presència pot condicionar l'eficàcia dels tractaments i la predominança d'aquests bacteris resistents com agents primaris en els brots de diarrea. Per tant, els objectius plantejats en la present tesi han estat:

1. Analitzar la prevalença dels principals agents infecciosos relacionats amb brots de diarrea neonatal en granges porcines i comparar la seva prevalença en animals amb diarrea i en animals aparentment sans.
2. Determinar les relacions filogenètiques entre les soques víriques aïllades de brots de diarrea neonatal causada per Rotavirus A.
3. Caracteritzar les soques d'*E. coli* aïllades de brots de diarrea neonatal i determinar-ne el perfil de resistències antimicrobianes.

PART II: ESTUDIS

ESTUDI 1: Prevalence of enteric pathogens in diarrheic and non-diarrheic samples from pig farms with neonatal diarrhea in the North East of Spain

1. Introduction

Neonatal diarrhea is one of the major causes of economic losses in porcine production, associated with high mortality, decreased growth rates and increase of medical costs. Infectious and non-infectious factors can be involved in diarrhea outbreaks in suckling piglets. Among non-infectious factors are nutritional, immunological, and environmental or management deficiencies. Infectious agents, such as viruses, bacteria or coccidia are the most important causes of enteric outbreaks. All those pathogens can cause diarrhea in piglets by themselves although co-infections are commonly reported (Kongsted *et al.*, 2018; Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018).

In recent years, viruses -particularly coronaviruses and rotaviruses- have regained attention as agents of diarrhea in pigs. The first emergence of the porcine coronavirus known as Porcine Epidemic Diarrhea Virus (PEDV) in the 70s decade, was followed by a high morbidity and mortality in piglets in all Europe. But along the years, the virulence of PEDV in Europe has been decreased, and nowadays, PEDV can be involved in isolated outbreaks of diarrhea and with low mortality rates in piglets (Carvajal *et al.*, 1995). Another coronavirus, transmissible gastroenteritis virus (TGEV) can cause diarrheal outbreaks in neonatal pigs. However, the spread of a respiratory coronavirus (PRCV) around Europe has conferred crossed immunity to the animals, and diarrheas caused by TGEV are uncommon nowadays (Saif *et al.*, 2009).

In regards to rotaviruses, several genogroups (A, B, C, E and H) have been associated with diarrhea in pigs but rotavirus A (RVA) still is the most frequent (Marthaler *et al.*, 2014). Other species such as rotavirus B (RVB) C (RVC) and H (RVH) have been identified in diarrhea outbreaks (Morin *et al.*, 1990; Martella *et al.*, 2007, Amimo *et al.*, 2013b; Vlasova *et al.*, 2017) but the amount of information on their actual contribution to neonatal diarrhea in pigs is still scarce.

Regarding bacterial infections, *Escherichia coli* has historically been considered one of the main agents causing neonatal diarrhea in pigs (Chan *et al.*, 2013). Different *E. coli* pathotypes have been identified based on toxin production and other virulence factors.

The most common are the enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) strains, characterized by the production of enterotoxins (Sta, Stb and LT), followed by the enteropathogenic *E. coli* (EPEC) strains, producing intimin (*eae* gene), and the verotoxigenic *E. coli* strains (VTEC) producing verotoxins (VT1, VT2) (Toledo *et al.*, 2012). Anaerobic bacterial pathogens such as enterotoxigenic strains of *Clostridium perfringens* type A (producing Cp α toxin), *C. perfringens* type C (producing Cp α and Cp β toxins) and *Clostridium difficile* producing enterotoxin A (TcdA) and/or cytotoxin B (TcdB) have also been reported in diseased piglets (Kim *et al.*, 2018, Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018). However, while the role of *C. perfringens* type C in neonatal diarrhea is well described, the role of *C. perfringens* type A and *C. difficile*, as primary agents of diarrhea or as synergic agents of other co- infections, is still not well defined.

Ideally, diagnosis of outbreaks of neonatal diarrhea should consider the clinical findings and lesions, the epidemiological pattern and obviously, the infectious agents potentially involved. However, since the role of some agents is predominant, most often the focus is mainly put on the infectious causes. Nowadays, in most cases, several agents with the potential for producing diarrhea in piglets are found in the same outbreak.

The objective of this study was to determine the prevalence of several pathogens causing neonatal diarrhea and to compare their frequencies with that of healthy pen-mates.

2. Materials and methods

2.1 Sampling

Thirty-one farms presenting neonatal diarrhea in 1-week old piglets were included in the study between February 2017 and June 2018. Farms were located in Catalonia (NE of Spain), one of the regions of Europe with a higher pig density (242 pigs/km²). A total of 215 diarrheic samples were taken from the 31 tested farms (5-10 animals/farm). Additionally, from 19 of these studied farms, 88 fecal samples (3-5 animals/farm) were obtained of apparently healthy pen-mates of the same age. A farm was considered as positive to a specific pathogen when at least one sample of the tested animals was found positive.

2.2 Microbiological testing

Fecal samples were submitted for diagnostic to the Laboratori Veterinari de Diagnosi de Malalties Infeccioses, of the Universitat Autònoma de Barcelona (Spain). Stool samples were directly analyzed upon arrival for microbiological identification of *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* and an aliquot of each sample was stored at -80 °C.

For *E. coli* isolation, samples were aerobically cultured on Columbia blood agar (BD GmBh, Germany) and MacConkey agar plates (Oxoid, UK), and were incubated during 24 hours at 37 °C. After incubation, plates in which only *E. coli* morphologically compatible colonies were observed were followed-up and re-cultured for further analysis. An aliquote of each isolate was stored at -80 °C.

To recover *C. perfringens* and *C. difficile* from faeces, samples were firstly treated with ethanol (96%, 35 min), in order to eliminate the vegetative cells, and then centrifuged (x 8,000 g) as described by Koransky *et al.* (1978). The pellet was then cultured on a selective medium for *Clostridium* spp (Conda Laboratorios, Spain), and incubated anaerobically during 48 hours at 37 °C.

2.3 Molecular diagnosis of bacterial agents

DNA was extracted from bacterial cultures by boiling. Briefly, bacterial growth from MacConkey plates and *Clostridium* spp. selective medium plates from all samples were diluted in 600 µL of sterile distilled water and 200 µL of the dilution were then transferred to a new tube. Two-hundred microliters of sterile distilled water were added to each tube. All tubes were boiled in a water bath for 10 min, and then centrifuged at 13,000 rpm for 5 min. After centrifugation, the supernatant was recovered and stored at -80 °C until processed.

For all PCR, the PCR mix consisted of: 1x PCR Buffer, 0.2 mM of each dNTP (Bioline, France), 3 mM of MgCl₂, 1 mM of each primer and 1 U of Taq Polymerase. A final volume of 2.5 µL of DNA was used as template. Cycling conditions for the detection of each pathogen can be

found in Table 1. In each reaction, positive (reference strain) and negative control (sterile water) were included.

Table 1. Cycling conditions for RT-PCR for the detection of *E. coli* adhesins and toxins, and *C.difficile* and *C perfringens* toxins.

Agent	Reference strain	Initial step	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	Nº of cycles	Reference
<i>E. coli</i> adhesins and toxins	FV12048, FV9722, FV7633, FV12047, O157-84	5 min 94°C	1 min 94°C	1 min 63°C	1 min 72°C	7 min 72°C	30	Toledo <i>et al.</i> , 2012
<i>C.difficile</i> TcdA, TcdB	Positive strain	10 min 94°C	50 s 94°C	40 s 53°C	50 s 72°C	3 min 72 °C	25	Persson <i>et al.</i> , 2008
<i>C. perfringens</i> α, β, β2	CETC 822	5 min 95°C	1 min 94°C	1 min 53°C	1 min 72°C	10 min 72 °C	30	Van Asten <i>et al.</i> , 2009

Reference *E. coli* and *C. perfringens* strains used as positive controls were kindly donated by Dr. Blanco (*E. coli* Reference Laboratory, Santiago de Compostela, Spain). Positive *C. difficile* strain was kindly donated by Dr. Sanfeliu (UDIAT Diagnostic Centre, Sabadell, Spain)

PCR products were resolved in a 1.5 % agarose gel by electrophoresis. Reference positive strains and a 100 bp ladder (Biotools B&M labs, Spain) were used to identify the positive samples. Amplified PCR products were visualized using ethidium bromide staining under UV light.

2.4 Molecular diagnosis of viral agents

Faecal samples were centrifuged (6000 g, 5 min) before the RNA extraction. Non-diarrheic samples were initially diluted in 500 µL of sterile distilled water before centrifuging. The Nucleospin RNA extraction kit (Macherey-Nagel, Germany) was used following the manufacturer's instructions. The final extracted RNA was suspended in 50 µL of RNase-free water (Macherey-Nagel, Germany). Detection of viral agents was done using the AgPath-ID™ One-Step RT-PCR kit (Applied Biosystems, ThermoFisher, USA). For RVA, PEDV and TGEV/PRCV, the protocol designed by Masuda *et al.* (2016) was followed, and RVB and RVC were detected using a previously described RT-PCR by Marthaler *et al.* (2014). Cycling conditions can be found in Table 2.

Positive RVA and PEDV samples were kindly donated by Dr. Pujols (IRTA-CReSA, Bellaterra, Spain).

Table 2. Cycling conditions for RT-PCR for the detection of viral agents

Agent	Reverse transcription	Taq activation	Denaturation	Annealing and extension	Number of cycles	Reference
RVA, PEDV, TGEV/PRCV	5 min 42 °C	10 min 95 °C	5 s 95 °C	34 s 60 °C	40	Masuda <i>et al.</i> , 2016.
RVB	5 min 45 °C	10 min 95 °C	15 s 95 °C	45 s 50 °C	45	Marthaler <i>et al.</i> , 2014.
RVC	5 min 45 °C	10 min 95 °C	15 s 95 °C	45 s 60 °C	45	Marthaler <i>et al.</i> , 2014.

3. Results

3.1 Overall prevalence of enteric pathogens in the diarrheic cases

The prevalence of enteric pathogens from the diarrheic cases evaluated in the study showed a high diversity in the proportion of positive samples per each of the 31 farm tested (Fig 1). *C. perfringens* A, *C. difficile* toxigenic strains, and RVA and RVC were the most frequently agents diagnosed at farm level (Fig 1). The analyzed coronaviruses, PEDV and TGEV/PRCV, were integrated into the category of porcine coronaviruses (PCoV), given the low detection of these agents.

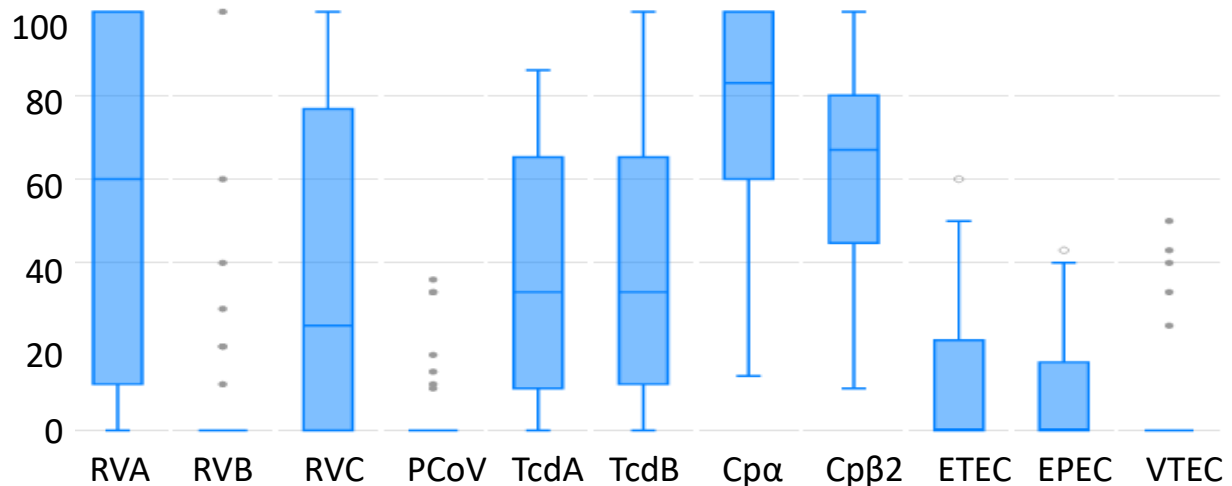


Figure 1. Proportion of positive samples for each analyzed farms (n=31) and enteric pathogens by Boxplot. RVA/B/C, rotavirus A/B/C; PCoV, porcine coronaviruses; TcdA/B, *C. difficile* toxins; Cpa/β2, *C. perfringens* toxins; ETEC, enterotoxigenic *E. coli*; EPEC, enteropathogenic *E. coli*; VTEC, verotoxigenic *E. coli*. The distribution of data is displayed as follows: the box is determined by the Interquartile Range (IQR: 25th and 75th percentiles) and the median line shows the middle value of the dataset; the whiskers are determined by the 5th and 95th percentiles; minimum and maximum values are shown at the ends of the bars and outliers as gray dots.

Regarding the number of diarrheic animals in the overall population analyzed, viruses presented the following prevalence (Table 3): 51.6% (111/215) of samples were positive for RVA, 9.3% (20/215) for RVB and 39.1% (84/215) for RVC. The percentage of samples positive to coronaviruses was low (11/215, 5.1%), 6 of them being positive to TGEV/PRCV and 5, to PEDV. Regarding bacterial agents, *C. perfringens* Cpa toxin was found in 71%

(152/215) of the samples while only 7 samples (3.3%) from two different farms were found positive for Cp β toxin (Table 3). Moreover, Cp β 2 toxin was detected in 87% of Cp α toxin positive samples (132/152). TcdA and TcdB *C. difficile* isolates were found in 28.9% (62/215) and 34% (73/215) of the samples, respectively, being 22.3% of the samples TcdA/TcdB double positive.

E. coli was isolated in pure culture in 44% (94/215) of the tested samples from diarrheic animals. The genotype characterization of these 94 isolates showed a low prevalence (<5%) of *E. coli* toxins and fimbriae, except for Stb, *eae* and EAST1 genes (Table 3). In addition, *E. coli* pathogenic strains were isolated from 21 (67.7%) different farms but with a low proportion of positive samples. The highest prevalence corresponded to the ETEC pathotype (12.1%), harbouring Sta, STb and/or LT genes, followed by the EPEC pathotype (9.8%) with the *eae* gene, and lasting with an occasional VTEC (5.1%) strains, none of them harbouring neither VT1 and VT2 genes.

Table 3. Prevalence of viral agents and bacterial genes detected PCR in samples of diarrheic piglets (n=215) from 31 tested farms. CI, Confidence Intervals with 95% of confidence

Pathogen	Piglets (N=215)		Farms (N=31)		
	Number	% (95% CI)	Number	%	
<i>Viral agents</i>					
RVA	111	51.6 (50.9-52.3)	25	80.6	
RVB	20	9.3 (8.6-10)	7	22.6	
RVC	84	39.1 (38.4-39.8)	22	71	
PCoV	11	5.1 (4.4- 5.8)	7	22.6	
<i>C.perfringens</i>					
Cp α	152	70.7 (70-71.4)	31	100	
Cp β	7	3.3 (2.6-4)	2	6.4	
Cp β_2	132	61.4 (60.7-62.1)	30	96.8	
<i>C. difficile</i>					
TcdA	62	28.9 (28.2-29.6)	25	80.6	
TcdB	73	34 (33.3-34.7)	25	80.6	
<i>E.coli adhesins</i>					
F4	4	1.9 (1.2-2.6)	1	3.2	
F5	1	0.5 (0-1.2)	1	3.2	
F6	0	0 (0-0.7)	0	0	
F18	1	0.5 (0-1.2)	1	3.2	
F41	6	2.8 (2.1-3.5)	4	12.9	
EPEC	<i>eae</i>	21	9.8 (9.1-10.5)	11	35.5
<i>E.coli toxins</i>					
ETEC	LT	3	1.4 (0.7-2.1)	2	6.5
	Sta	5	2.3 (1.6-3)	2	6.5
	Stb	23	10.7 (10-11.4)	11	35.5
	EAST1	122	57 (56.3-57.7)	27	87.1
VTEC	VT1	5	2.3 (1.6-3)	3	9.7
	VT2	6	2.8 (2.1-3.5)	4	12.9

3.2 Prevalence and combination of enteric pathogens at farm level

All farms except one (30/31) were positive to Rotaviruses A, B and/or C (Table 4). RVA (80.6%) and RVC (71%) were isolated from most of the farms (25 and 22, respectively), and were detected concomitantly in 17 of them (54.8%). By contrast, only 7 farms were positive to RVB, always found in co-infection with RVC, 4 farms were positive to PEDV and 3 farms, positive to TGEV/PRCV.

As regards the bacterial agents, *C. perfringens* A was found in 100% of farms, followed by *C. difficile* toxigenic strains (87.1% farms). Pathogenic *E.coli*, mainly ETEC and EPEC strains, was found in 64.5% of farms. Finally, 58% of farms were positive to RVA/RVC/*C.difficile*/CpA infections (Table 4).

Table 4. Distribution of farms positive to the different panel of enteric pathogens. RVA/B/C, Rotavirus A/B/C; *C. difficile*, toxigenic strains (TcdA, TcdB); *E. coli*, pathogenic *E.coli*; PCoV, porcine coronaviruses; Cp A/C, *C. perfringens* A/C.

Farms (N=31)		RVA	RVB	RVC	PCoV	<i>C.difficile</i>	Cp A	Cp C	<i>E.coli</i>
Number of positive farms: enteric pathogen associations	6	+	-	+	-	+	+	-	+
	4	+	-	+	-	+	+	-	-
	3	+	-	-	-	+	+	-	+
	3	-	+	+	-	+	+	-	+
	2	+	-	+	+	+	+	-	+
	1	+	+	+	+	+	+	-	+
	1	+	-	-	+	+	+	-	+
	1	+	-	-	+	+	+	-	-
	1	+	-	+	-	+	+	+	+
	1	+	-	-	-	+	+	+	+
	1	+	+	+	-	+	+	-	-
	1	+	+	+	+	-	+	-	-
	1	+	-	+	-	-	+	-	+
	1	+	-	-	+	-	+	-	-
	1	+	-	-	-	-	+	-	-
	1	-	+	+	-	+	+	-	-
	1	-	-	+	-	+	+	-	+
	1	-	-	-	-	+	+	-	-
TOTAL FARMS	31	25	7	22	7	27	31	2	20

3.3 Comparison of diarrheic and healthy cases

Diarrheic animals (n=140) and non-diarrheic (n=88) pen-mates could be sampled in 19 out of 31 farms. Rotavirus A was the unique pathogen statistically associated with the cases of diarrhea since it was detected in a higher prevalence in diseased pigs compared to the control animals [61.4% vs 31.8%, Chi-square=18.95, $p < 0.001$] (Table 5). Regarding to bacterial pathogens, although prevalence of *C. difficile* TcdA and *E. coli* F41 or Sta toxigenic strains were slightly higher in the diseased animals, no statistical differences were found when comparing diseased versus non-diseased pen-mates (Table 5).

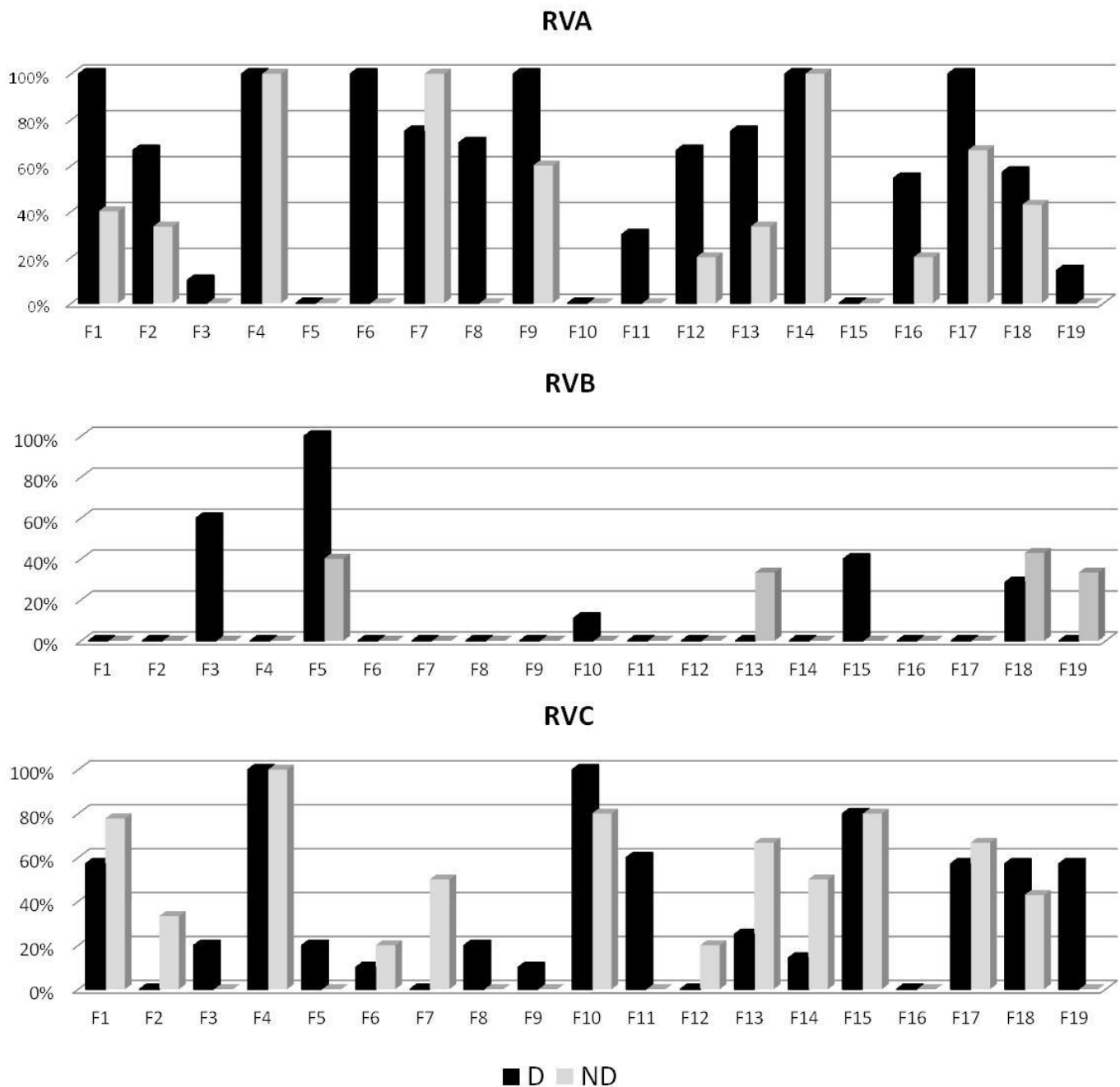
Table 5. Proportion and statistical values of enteric agents between diarrheic (n=140) and healthy (n=88) animals.

Agent	Proportion Cases % (n)	Proportion Controls % (n)	Pearson Chi-square	p-value	Fisher's exact test (p)
<i>Viral agents</i>					
RVA	61.4 (86)	31.8 (28)	18.95	0.00013	-
RVB	12.1 (17)	4.9 (6)	1.69	0.19	-
RVC	33.6 (47)	36.4 (32)	0.18	0.67	-
PCoV	4.3 (6)	2.3 (2)	0.65	-	0.72
<i>C. perfringens</i>					
Cp α	73.5 (103)	79.5 (70)	1.05	0.30	-
Cp β	2.8 (4)	1.1 (1)	0.75	-	0.65
Cp β 2	60.7 (85)	61.4 (54)	0.01	0.922	-
<i>C. difficile</i>					
TcdA	25.7 (36)	19.3 (17)	1.24	0.27	-
TcdB	27.1 (38)	29.5 (26)	0.15	0.69	-
<i>E. coli adhesins</i>					
F4	0	1.1 (1)	-	-	-
F5	0.7 (1)	0	-	-	-
F6	0	0	-	-	-
F18	0.7 (1)	0	-	-	-
F41	3.6 (5)	1.1 (1)	1.25	-	0.41
<i>eae</i>	13.6 (19)	14.8 (13)	0.065	0.8	-
<i>E. coli toxins</i>					
LT	0	0	-	-	-
Sta	1.4 (2)	0	-	-	-
Stb	5.7 (8)	3.4 (3)	0.63	-	0.54
EAST1	57.1 (80)	67 (59)	2.23	0.14	-
VT1	2.9 (4)	0	-	-	-
VT2	2.9 (4)	0	-	-	-

There were six farms out of 19 in which RVA could not be considered the main causative agent of the diarrhea process, either because of the absence of RVA positive animals in the farm or because the RVA prevalence was higher in healthy animals than in diseased cases. In those particular farm cases, other bacterial agents such as toxigenic *C. difficile* (TcdA /

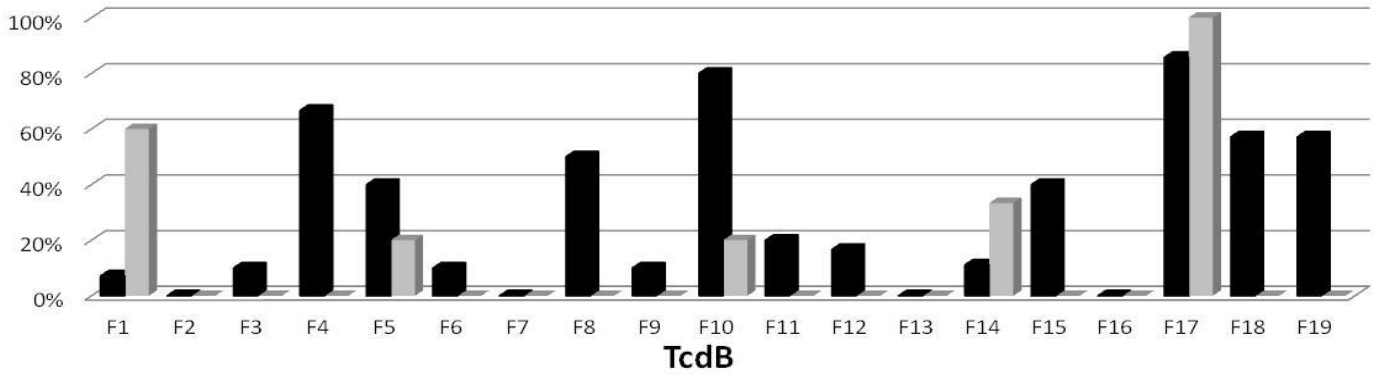
TcdB) or pathogenic *E. coli* (mainly ETEC or VTEC), or other viruses, such as RVB, could be identified in a larger proportion of diseased pigs compared to the healthy pen-mates (Figure 2).

Figure 2. Proportion of positive samples between diarrheic cases (black bar) and healthy

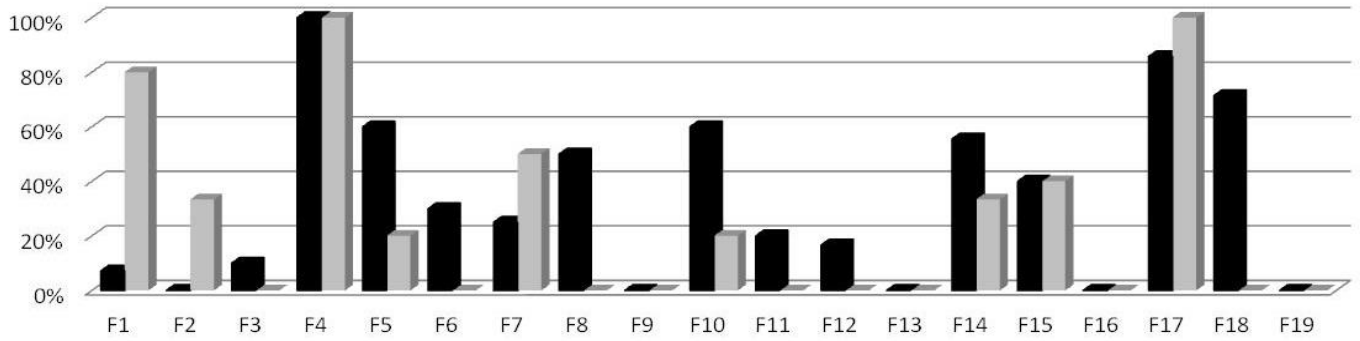


controls (light bar) distributed by farms and enteric pathogens.

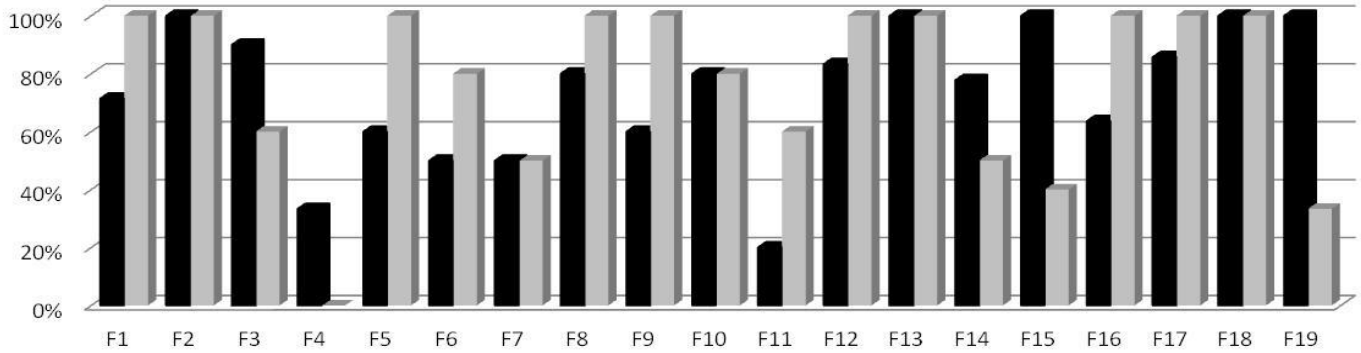
TcdA



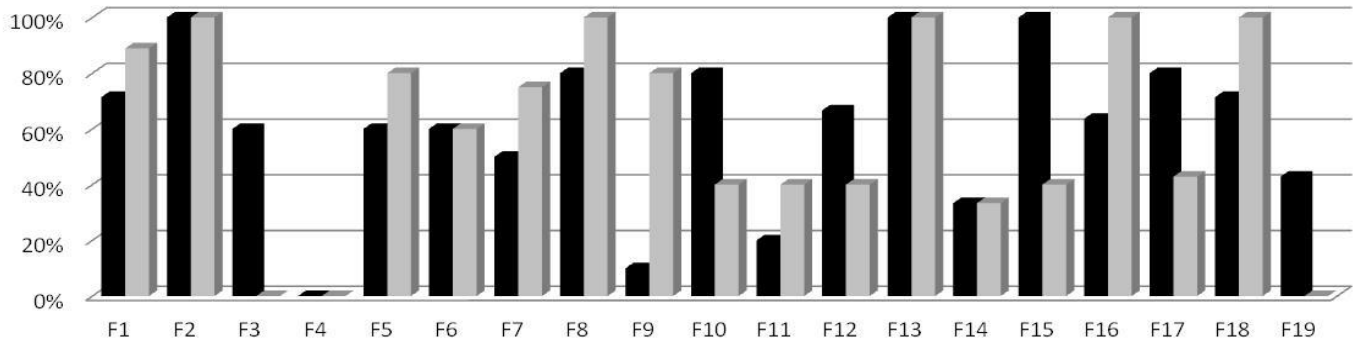
TcdB



Cpa

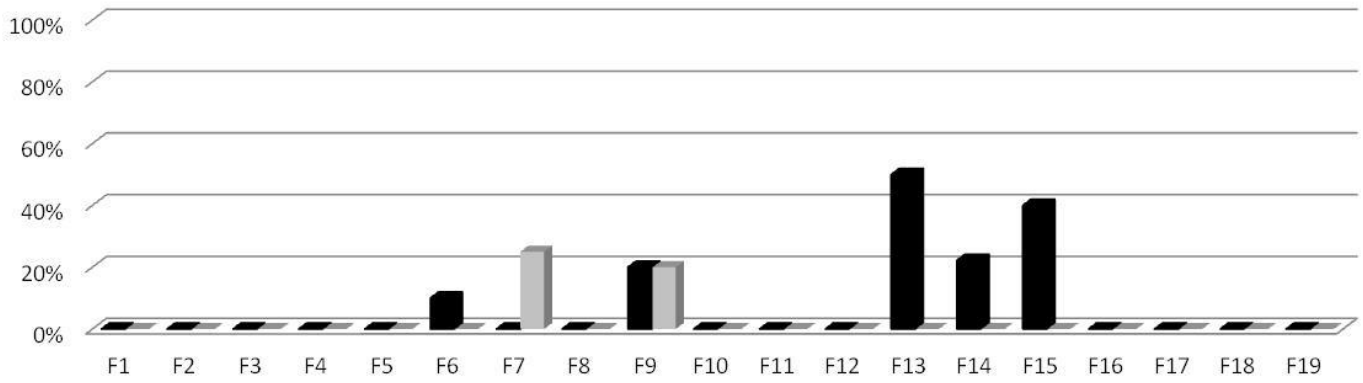


Cpb2

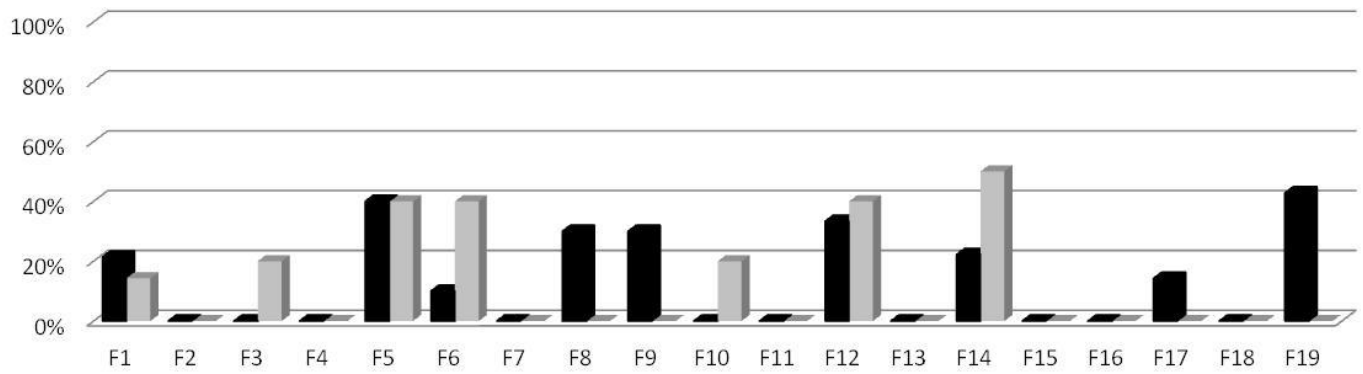


■ D ■ ND

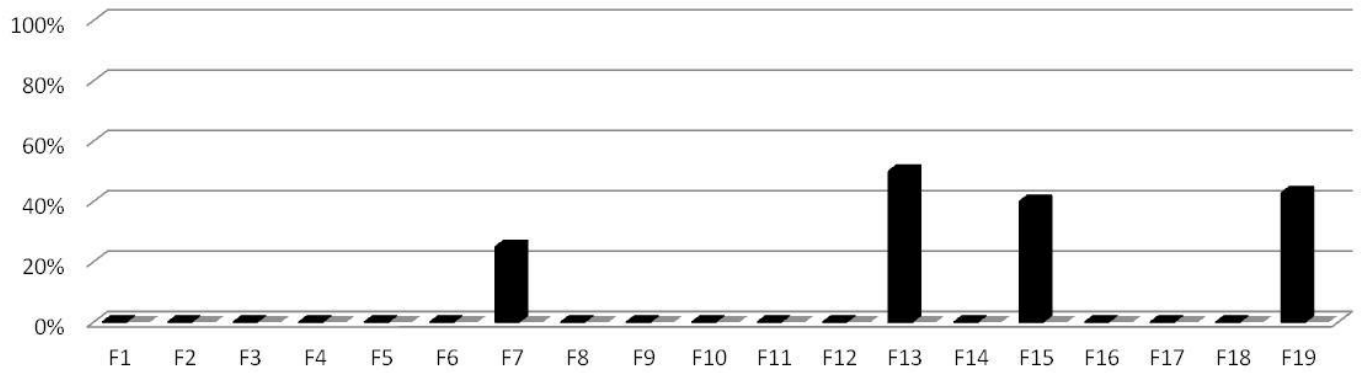
ETEC



EPEC



VTEC



■ D ■ ND

4. Discussion

This study reports novel data of the prevalence of the main pathogens causing neonatal diarrhea in Spain. In general, *C. perfringens* type A, toxigenic *C. difficile* and rotavirus could be isolated from most of the analyzed farms. Furthermore, most of the analyzed samples of this study, regardless the health status of the piglet, were positive for multiple combinations of pathogens, involving principally RVA, RVC, *E. coli*, and toxigenic strains of *C. difficile* and *C. perfringens* type A. Moreover, the large diversity of agent combinations and disease situations detected in the different farms, stand for the multifactorial origin of the neonatal diarrhea in pigs and, in consequence, show the actual complexity to establish a definitive diagnosis.

One of the main results provided by this study when comparing diseased and healthy pen-mates was the role of RVA infection as the principal risk factor for developing diarrhea in neonatal pigs in Spain. This result agrees with a recent case-control study conducted in pig farms suffering neonatal diarrhea outbreaks in Denmark, in which the authors determined the presence of several enteric pathogens and concluded that RVA was the only agent that could be statistically associated to neonatal diarrhea (Kongsted *et al.*, 2018). It is well known that Rotaviruses are frequently associated with outbreaks of neonatal diarrhea worldwide (Kim *et al.*, 1999), nevertheless in some cases their role as a causative agent of disease in pigs have been controversial. While some studies did not find a clear association between RVA infection and neonatal disease (Ruiz *et al.*, 2016; Amimo *et al.*, 2013a), others did find a statistical relationship between neonatal diarrhea and RVA single infection (Linares *et al.*, 2009; Kongsted *et al.*, 2018; Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018), or RVA combined with other factors such as co-infections or management conditions (Ruiz *et al.* 2016).

As regards other rotaviruses, most of the RVC positive farms found in this study were also RVA positive, and with similar RVC frequencies between piglets suffering diarrhea and the healthy pen-mates. By contrast, although the farm prevalence of RVB was low, the positive farms presented a high animal prevalence, and mainly observed in the diarrheic piglets. Thus, in our study both RVB and RVC could be considered as main causing agents of

diarrhea in some farms, when comparing the prevalence obtained between the diarrheic and the control groups. There are not many publications reporting the prevalence of RVB and C in pigs. In a study conducted in the United States, the authors reported similar rotaviruses prevalence with 62% RVA, followed by 53% RVC and 33% RVB (Marthaler *et al.*, 2014). Rotavirus B has also been detected in several Asian countries, South Africa, and Brazil (Alekseev *et al.*, 2015). In Europe, limited reports of RVB have been described in Germany (Otto *et al.*, 2015) and the Czech Republic (Smitalova *et al.*, 2009) so far, with prevalence of 1.6% and 0.6% respectively.

Regarding the analyzed coronaviruses, PEDV and TGEV/PRCV, only 13 animals from 8 different farms turned out positive for porcine coronaviruses. Similar results were found recently in Spain by Mesonero-Escuredo *et al.* (2018), in which the authors found a low prevalence for PEDV (3.7%), suggesting a low frequency of coronaviruses and sporadic PEDV outbreaks in Spain and Europe during the period in which this study was performed, and did not detect TGEV in any sample. The PCR used for the detection of TGEV in this study could not distinguish TGEV strains from PRCV strains, as the target gene was the nucleocapside, instead of the spike gene, which allows the differentiation of both viruses. Therefore, samples which turned out positive for TGEV/PRCV should be sequenced and characterized.

The prevalence of *C. perfringens* type A, as well as the Cp β 2 positive strains, was very high and similar between diarrheic and healthy pigs. The role of this cp β 2 toxin in the pathogenesis of neonatal diarrhea is controversial and while several studies have associated it with diarrhea outbreaks (Garmory *et al.*, 2000; Bueschel *et al.*, 2003), others found no differences between diseased and healthy pigs (Jaggi *et al.*, 2009; Farzan *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). Since *C. perfringens* type A is a commensal gut microorganism, the diagnosis of this agent cannot be interpreted unambiguously, given that it is not possible to distinguish commensal from pathogenic strains. Thus, although it has been considered as a main pathogen involved in persistent neonatal diarrhea (Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018), a direct pathogen-toxin-disease association has not been yet elucidated. As regards *C. perfringens* type C, the prevalence detected in the present study was low. This could be the

consequence of the periodic vaccination program implemented in sows (Salvarani *et al.*, 2013).

It has been suggested that *C. difficile* could be the most important uncontrolled cause of neonatal diarrhea in pigs (Songer *et al.*, 2006) with significantly higher prevalence in diarrheic piglets (Kim *et al.*, 2018). However, in our study, the general prevalence of toxigenic *C. difficile* was similar in both healthy and diarrheic animals. Yet, in some farms, the presence of toxigenic *C. difficile* could be related to the onset of neonatal diarrhea. Other studies have reported a high prevalence of *C. difficile* toxins in healthy animals concluding no clear relationship between diarrheal outbreaks and the presence of toxigenic *C. difficile* in pigs (Yaeger *et al.*, 2007, Álvarez-Pérez *et al.*, 2009).

EPEC has been and is still considered the main agent responsible for intestinal disorders in piglets (Dubreuil *et al.*, 2016), being F4, the main fimbriae associated with diarrhea, followed by F5, F6 and F41 in a lower prevalence (Luppi *et al.*, 2016). In the present study, *E. coli* was frequently and equally isolated from diarrheic and non-diarrheic piglets. These results are similar to those reported by Toledo *et al.* (2012), with prevalence less than 3% for LT, VT1 and VT2. This low prevalence of *E. coli* pathotypes and virulent factors is probably related to the *E. coli* vaccination programs implemented in sows in the Spanish farms. Most of these vaccines available on the market contain *E. coli* fimbriae (mostly F4, F5, F6 and F41) and toxoids (such as LT), and therefore, prevent the infection caused by pathogenic strains of *E. coli*. By contrast, EAST1 positive *E. coli* were very common. The pathogenic role of the EAST1 toxin is not clear, given that it has also been found in a high prevalence in strains from healthy animals of our study in agreement with other works (Zajacova *et al.*, 2012).

Nevertheless, in some farms in which RVA was not considered to be the main causative agent, the diarrheic process of the piglets could be associated to pathogenic *E. coli* (mainly EPEC and VTEC) or toxigenic *C. difficile* strains

The high frequency of multiple infections detected in neonatal pigs suffering or not from diarrhea makes the setting up of a final diagnosis a very difficult task. Additional

information supplied by complementary techniques or studies, *i.e.* histopathological examination, may be of great value to produce a final diagnosis. Therefore, in future studies, histopathological studies, as well as serological testing would be useful in order to understand how the dynamics of infection and the immunity of the piglet work, and to provide an accurate diagnostic.

In conclusion, the large diversity of agent combinations and disease situations detected in the different pig farms confirms the multifactorial origin of the neonatal diarrhea in pigs stand for a more personalized diagnosis and management advice at a farm level.

5. Acknowledgements

Our grateful thanks to all the participating veterinarians. A. Vidal was supported by a PIF grant from the Universitat Autònoma de Barcelona. This work was partly funded by INIA E-RTA2015-00003-C02-01 project.

6. References

Alekseev, K.P., Penin, A.A., Mukhin, A.N., Khametova, K.M., Grebennikova, T.V., Yuzhakov, A.G., Moskvina, A.S., Musienko, M.I., Raev, S.A., Mishin, A.M., Kotelnikov, A.P., Verkhovsky, O.A., Aliper, T.I., Nepoklonov, E.A., Herrera-Ibata, D.M., Shepherd, F.K., Marthaler, D.G., 2015. Genome characterization of a pathogenic porcine Rotavirus B strain identified in Buryat Republic, Russia in 2015. *Pathogens* 7, 46.

Álvarez-Pérez, S., Blanco, J.L., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., Garcia, M.E., 2009. Prevalence of *Clostridium difficile* in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet. Microbiol.* 137,302-5.

Amimo, J.O., Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2013a. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J. Clin. Microbiol.* 51,1142-51.

Amimo, J.O., Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2013b. Prevalence and heterogeneity of porcine group C rotaviruses in nursing and weaned piglets in Ohio, USA and identification of a potential new VP4 genotype. *Vet. Microbiol.* 164, 27-38.

Bueschel, D.M., Jost, B.H., Billington, S.J., Trinh, H.T., Songer, J.G., 2003. Prevalence of *cpb2*, encoding beta2 toxin, in *Clostridium perfringens* field isolates: correlation of genotype with phenotype. *Vet. Microbiol.* 94, 121-29.

Carvajal, A., Lanza, I., Diego, R., Rubio, P., Cámenes, P., 1995. Evaluation of a blocking ELISA using monoclonal antibodies for the detection of porcine epidemic diarrhea virus and its antibodies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 7, 60-64.

Chan, G., Farzan, A., DeLay, J., McEwen, B., Prescott, J.F., Friendship, R.M., 2013. A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. *Can. J. Vet. Res.* 77, 254-60.

Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E., Schifferli, D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal. Plus* 7.

Farzan, A., Kircanski, J., DeLay, J., Soltes, G., Songer, J.G., Friendship, R., Prescott, J.F., 2013. An investigation into the association between *cpb2*-encoding *Clostridium perfringens* type A and diarrhea in neonatal piglets. *Can. J. Vet. Res.* 77, 45-53.

Garmory, H.S., Chanter, N., French, N.P., Bueschel, D., Songer, J.G., Titball, R.W., 2000. Occurrence of *Clostridium perfringens* beta2-toxin amongst animals, determined using genotyping and subtyping PCR assays. *Epidemiol. Infect.* 124, 61-7.

Jäggi, M., Wollschläger, N., Abril, C., Albini, S., Brachelente, C., Wyder, M., Posthaus, H., 2009. Retrospective study on necrotizing enteritis in piglets in Switzerland. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 151,369-75.

Kim, Y., Chang, K.O., Straw, B., Saif, L.J., 1999. Characterization of group C rotaviruses associated with diarrhea outbreaks in feeder pigs. *J. Clin. Microbiol.* 37, 1484-8.

Kim, H.Y., Cho, A., Kim, J.W., Kim, H., Kim, B., 2018. High prevalence of *Clostridium difficile* PCR ribotype 078 in pigs in Korea. *Anaerobe* 51, 42-46.

Kongsted, H., Pedersen, K., Hjulsager, 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. *Porcine Health Manag.* 4,17.

Koransky, J.R., Allen, S.D., Dowell, V.R., 1978. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 35, 762-65.

Lee, C., 2016. Erratum to: Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Viol. J.* 13:19.

Lee, K.E., Lim, S.I., Shin, S.H., Kwon, Y.K., Kim, H.Y., Song, J.Y., An, D.J., 2014. Distribution of *Clostridium perfringens* isolates from piglets in South Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 745-49.

Linares, R.C., Fernandes Barry, A., Fernandes Alfieri, A., Médici, K.C., Feronato, C., Grieder, W., Alfieri, A.A., 2009. Frequency of group A rotavirus in piglet stool samples from non-vaccinated Brazilian pig herds. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 52, 63-68.

Lippke, R.T., Borowski, S.M., Marques, S.M.T., Paesi, S.O., Almeida, L.L., Moreno, A.M., Zlotowski, P., Corbellini, L.G., Barcellos, D.E.S.N., 2011. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 505-10.

Luppi, A., Gibellini, M., Gin, T., Vangroenweghe, F., Vandenbroucke, V., Bauerfeind, R., Bonilauri, P., Labarque, G., Hidalgo, A., 2016. Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea in Europe. *Porcine Health Manag.* 2, 20.

Martella, V., Bányai, K., Lorusso, E., Bellacicco, A.L., Decaro, N., Camero, M., Bozzo, G., Moschidou, P., Arista, S., Pezzotti, G., Lavazza, A., Buonavoglia, C., 2007. Prevalence of group C rotaviruses in weaning and post-weaning pigs with enteritis. *Vet. Microbiol.* 123, 26-33.

Marthaler, D., Homwong, N., Rossow, K., Culhane, M., Goyal, S., Collins, J., Matthijnssens, 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.

Masuda, T., Tsuchiaka, S., Ashiba, T., Yamasato, H., Fukunari, K., Omatsu, T., Furuya, T., Shirai, J., Mizutani, T., Nagai, M., 2016. Development of one-step real-time reverse transcriptase-PCR-based assays for the rapid and simultaneous detection of four viruses causing porcine diarrhea. *Jpn. J. Vet. Res.* 64, 5-14.

Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C., Segalés, J., 2018. Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhea cases in Spain. *Porcine Health Manag.* 5, 4-5.

Morin, M., Magar, R., Robinson, Y., 1990. Porcine group C rotavirus as a cause of neonatal diarrhea in a Quebec swine herd. *Can. J. Vet. Res.* 54, 385-89.

Otto, P.H., Rosenhain, S., Elschner, M.C., Hotzel, H., Machnowska, P., Trojnar, E., Hoffmann, K., Johne, R., 2015. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet. Microbiol.* 179, 168-76.

Persson, S., Torpdahl, M., Olsen, K.E., 2008. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 1057-64.

Ruiz, V.L., Bersano, J.G., Carvalho, A.F., Catroxo, M.H., Chiebao, D.P., Gregori, F., Miyashiro, S., Nassar, A.F., Oliveira, T.M., Ogata, R.A., Scarcelli, E.P., Tonietti, P.O., 2016. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. *BMC Res. Notes* 9, 22.

Saif, L.J., Pensaert, M.B., Sestak, K., Yeo, S.G., Jung, K., 2012. Coronaviruses. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 501-24.

Salvarani, F.M., Conceição, F.R., Cunha, C.E., Moreira, G.M., Pires, P.S., Silva, R.O., Alves, G.G., Lobato, F.C., 2013. Vaccination with recombinant *Clostridium perfringens* toxoids α

and β promotes elevated antepartum and passive humoral immunity in swine. *Vaccine*. 31,4152-55.

Smitalova, R., Rodak, L., Smid, B., Psikal, I., 2009. Detection of nongroup A rotaviruses in faecal samples of pigs in the Czech Republic. *Vet. Med. (Praha)* 54, 12-18.

Songer, J.G., Anderson, M.A., 2006. *Clostridium difficile*: an important pathogen of food animals. *Anaerobe* 12, 1-4.

Toledo, A., Gómez, D., Cruz, C., Carreón, R., López, J., Giono, S., Castro, A.M., 2012. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *J. Med. Virol.* 61, 148-56.

Van Asten, A.J., van der Wiel, C.W., Nikolaou, G., Houwers, D.J., Gröne, A., 2009. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. *Vet. Microbiol.* 136, 411-12.

Vlasova, A.N., Amimo, J.O., Saif, L.J., 2017. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, immune responses and control strategies. *Viruses* 9.

Wang, Q., Vlasova, A.N., Kenney, S.P., Saif, L.J., 2019. Emerging and re-emerging coronaviruses in pigs. *Curr. Opin. Virol.* 34, 39-49.

Yaeger, M.J., Kinyon, J.M., Songer, J.G., 2007. A prospective, case control study evaluating the association between *Clostridium difficile* toxins in the colon of neonatal swine and gross and microscopic lesions. *J. Vet. Diagn. Invest.* 19, 52-9

Zajacova, Z.S., Konstantinova, L., 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. *Vet. Microbiol.* 154, 369-75.

ESTUDI 2: Full-genome characterization by deep sequencing of rotavirus A isolates from outbreaks of neonatal diarrhea in pigs in Spain.

Vet. Microbiol. (2018) 227:12-19.
doi: 10.1016/j.vetmic.2018.10.002.

1. Introduction

Rotaviruses are non-enveloped double stranded RNA viruses within the family *Reoviridae*, subfamily *Sedoreovirinae*, genus *Rotavirus*. The 18.5 kb genome is organized in 11 segments, encoding six structural (VP1-VP4, VP6 and VP7) and five/six non-structural proteins (NSP1-NSP5/6). Structurally, the viral particle has a triple-layered icosahedral protein capsid. The outer layer is composed of VP4 and VP7 proteins, the inner layer of VP6 proteins, and the core layer of VP2 proteins. The core encases the RNA-dependent RNA polymerase VP1, the capping enzyme VP3, and the eleven genome segments (Estes & Greenberg, 2013; Desselberger, 2014). Currently, the genus *Rotavirus* comprises ten species designated as *Rotavirus A* to *J* based on VP6 antigenicity (Matthijnssens *et al.*, 2012; Estes & Greenberg, 2013; Bányai *et al.*, 2017; ICVT, 2017). Rotavirus A (RVA) is one of the main causes of diarrhea in piglets worldwide (Chang *et al.*, 2012).

RVA have been long considered to be clinically more important within the *Rotavirus* species and have been therefore further characterized. A binary classification system for RVA was first established based on the serological reactivity of the outer capsid proteins VP7 and VP4 that corresponded to the G and P serotypes and, later, G and P genotypes (Estes & Greenberg, 2013). These two proteins play an important role in the protective immunity inducing neutralizing antibodies (Chang *et al.*, 2012).

Considering the extremely high genetic diversity of RVA, a major drawback of the abovementioned classification is that most of the genome is not taken into account. Therefore, a full-genome sequence classification system was established, in which VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 genes are represented by Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx genotypes, respectively (Matthijnssens *et al.*, 2008a; 2008b).

Due to the segmented nature of the RVA genome, reassortment between isolates occurs, despite certain genotype constellations function best when they are kept together (Heiman *et al.*, 2008; McDonald *et al.*, 2012; Matthijnssens *et al.*, 2012; Estes & Greenberg, 2013; Desselberger, 2014) Reassortment events are common within RVA isolates in a given species but also between different animal species, including humans (Teodoroff *et al.*,

2005; Hoshino *et al.*, 2005; Martella *et al.*, 2005; Do *et al.*, 2016; Jing *et al.*, 2017). The accumulation of point mutations is considered the main mechanism of evolution in RVA, yet other mechanisms such as recombination have been also described (Estes & Greenberg, 2013; Papp *et al.*, 2013; Desselberger, 2014).

There is relatively little information about the epidemiology, the genetic and antigenic diversity, and the real impact and importance of RVA in pigs. RVA is detected most frequently in 7 to-60-day-old pigs, with the highest prevalence at 3-5 weeks of age (Chang *et al.*, 2012). So far, twelve G genotypes and sixteen P genotypes have been identified in this species, the most frequent genotypes being G3, G4, G5, G9, and G11 associated to P[6], P[7], P[13], P[23], P[27], and P[34] (Amimo *et al.*, 2013; Papp *et al.*, 2013; Chandler-Bostock *et al.*, 2014; Pham *et al.*, 2014; Theuns *et al.*, 2014; Vlasova *et al.*, 2017).

Since the beginning of 2017, an apparent increase in the number of outbreaks of neonatal diarrhea in pigs of North-eastern Spain was detected. The analysis of the first cases indicated the presence of RVA and suggested a potential epidemic. These outbreaks affected 1 to-7-day-old piglets, with morbidities ranging from 50 to 80% of litters and mortality rates up to 30%. In some cases, also adult sows presented clinical signs, suggesting a lack of herd immunity. This situation probably indicated the introduction of a novel strain or strains of RVA in the Spanish pig population. Currently, no porcine RVA vaccine is licensed in Spain and has to be imported, mainly from USA. The aim of this study was to: i) investigate neonatal diarrhea outbreaks in pigs to determine the type of RVA involved and its possible origin and evolution and ii) determine the antigenic differences between the RVA strains and the RVA vaccine strains.

2. Materials and Methods

2.1 Case selection and samples

The present study focused on fecal samples previously identified as RVA positive by real-time quantitative PCR using the protocol proposed by Masuda *et al.* (2016) that targets the VP6 gene of the virus. Samples were collected by veterinarians in 16 apparently unrelated outbreaks of neonatal diarrhea (less than 7 days of age). In several cases, litters from both primiparous and multiparous sows were affected. The origin of the replacement gilts was different in each farm. In one herd sows were vaccinated against rotavirus with a commercial vaccine. Samples were submitted to the Veterinary Diagnostic Laboratory of Infectious Diseases of the Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, Barcelona, Spain) for diagnosis from March to November 2017. The geographical origin was mostly Catalonia and Aragon regions (n=15) with one case from Castile and León. Cases were referred from 9 different companies. At least five samples per outbreak were obtained for the initial diagnosis of RVA.

Fecal samples (n=24) were selected based on: i) low Cycle threshold (C_t) values (<25), ii) the absence of other relevant pathogenic agents in the previous microbiological cultures and molecular analysis, and iii) the age and clinical presentation of the animals (neonates). All samples were previously shown to be negative by real-time reverse transcription PCR for porcine epidemic diarrhea virus and transmissible gastroenteritis virus; and by PCR of the cultured sample for enteropathogenic *E. coli* and toxigenic strains of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile*. Samples were stored at -80 °C for further sequencing.

2.2 RNA extraction and whole genome sequencing

Fecal samples were diluted 1:5 in sterile distilled water. Total RNA extraction was performed using the TRIzol reagent (ThermoFischer Scientific) following the manufacturer's instructions. For each reaction, 500 µL of the diluted faeces were used. The purity of the extracted RNA was assessed by spectrophotometry (A_{260}/A_{280} ratio) and then they were submitted to the Genomics Bioinformatics Service (SGB) of the UAB for library preparation

and next-generation or deep sequencing (NGS) of RNA using the Illumina Miseq Platform. The method applied did not include any PCR amplification step; the whole extracted RNA was sequenced. The following pipeline was applied for assessing the presence and sequence of RVA: i) the construction of a genomic library for Illumina NGS sequencing, ii) the trimming of low quality reads (those showing quality scores lower than 20) with Trimmomatic (Bolger *et al.*, 2014), iii) the mapping of reads against the 11 genes of RVA (VP1-4, VP6, VP7, NSP1-NSP5) using several porcine RVA reference sequences available at Genbank and the Burrows-wheeler aligner (Li & Durbing, 2010), iv) the variant calling with LoFreq (Wilm *et al.*, 2012) to determine the frequency of each nucleotide at each position in the viral quasi-species, v) the construction of a viral quasi-species in fasta format using VCFtools, and vi) the assembly of a consensus sequence for every gene of each sample, using the program Consensus (<https://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/consensus.html>).

2.3 Strain genotyping and phylogenetic analyses

Full-genome genotypes (Matthijnssens *et al.*, 2008a) were determined by: i) comparing the consensus sequences of each genome segment with the available reference sequences in GenBank using the BLASTn search suite, ii) using the RotaC 2.0 genotyping tool (Maes *et al.*, 2009), and iii) using the RVA genotype determination tool of Virus Pathogen Resource (<https://www.viprbrc.org>). In case of finding a discrepancy between the different systems, sequences were submitted to the Rotavirus Classification Working Group (<https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg>). Also, in those cases showing discrepancy a recombination analysis was carried out with the program GARD (Kosakovsky-Pond *et al.*, 2006) using the sequences of the potential parental genotypes with the dataset detailed below.

For the purposes of comparison, all the complete sequences of each RVA gene available in GenBank for porcine, bovine, canine, feline, murine and human RVA were downloaded. A dataset for each gene was constructed with the abovementioned data and multiple-

sequence alignments were produced using the ClustalW program in BioEdit software (Hall, 1999). The evolutionary relationships among strains were determined in a phylogenetic analysis using the nucleotide alignments of every gene (Maximum likelihood method, with general time reversible model, 1,000 iterations) using MEGA 7.0 (Kumar *et al.* 2016). Then, the predicted amino acid sequences were produced and an amino acid network for VP1, VP6 and NSP5 –the most conserved genes in the inner and intermediate layers- was constructed using the Median-Joining method in the NETWORK version 5 software (www.fluxus-engineering.com). In order to avoid the over-representation of human strains in the final dataset, only the closest sequences within the 100 BLASTn results of human origin were used.

2.4 Temporary estimation of the introduction

The rate of evolution and the time to the most recent common ancestor (tMRCA) for VP1, VP6 and NSP5 were calculated using a Bayesian Markov chain Monte Carlo (MCMC) approach implemented in BEAST (Drummond *et al.*, 2012). Firstly, the aligned nucleotide sequences of all viral quasi-species, one per each gene, were used to generate a BEAST input file using the software BEAUTi. Three independent runs of MCMC per dataset were performed under a strict molecular clock model, using the Hasegawa–Kishino–Yano model of sequence evolution with a proportion of invariant sites and gamma distributed rate heterogeneity (HKY+I+ Γ) with partitions into codon positions, and the remaining default parameters in the prior's panel. Every MCMC run was 10 million steps long and the posterior probability distribution of the chains was sampled every 1,000 steps. Convergence was assessed on the basis of an effective sampling size after a 10% burn-in using Tracer software, version 1.7 (Rambaut *et al.*, 2018). The estimations were the mean values obtained for the three runs.

2.5 RVA epitope identification and vaccine comparison

The RVA epitopes described in VP7 (Aoki *et al.*, 2009) and in the VP4 trypsin cleavage product VP8* (Dormitzer *et al.*, 2002; Monnier *et al.*, 2006) were identified in all 24 samples and compared with the amino acid composition of the mentioned antigenic segments in the vaccine strains Gottfried, OSU and A2, corresponding to genotypes G4P[6], G5P[7] and G9P[7], respectively (Naseer *et al.*, 2017).

2.6 Metagenomic analyses

Additionally, the presence of other RNA viruses was analyzed by means of a metagenomic analysis using Kraken, a program of taxonomic sequence classification of NGS reads (Wood & Salzberg, 2014).

3. Results

3.1 RVA full-genome genotypes

The genotype constellations of the RVA strains sequenced in this study are shown in Figure 1. Of the 16 outbreaks investigated, in 13 farms only one RVA genotype per farm was found, while in three cases two different RVA were detected (farms F7, F12 and F13). In global, four G genotypes and five P genotypes were found, with G9P[23] being the most common combination. In one sample (348 farm F4) sequences of two VP4 genotypes (P[23] and P[28]) were determined, probably indicating a co-infection. No apparent relation was found between the presence of a given genotype and a given company or region. In contrast, the backbone genome or internal core gene cassette shared the same genotype pattern for all the isolates, except for the NSP4 gene in one sample (438 farm F7). The consensus sequences for every protein in each sample were submitted to GenBank with the Accession Numbers MH238075 to MH238338.

Farm	Sample	VP7	VP4	VP6	VP1	VP2	VP3	NSP1	NSP2	NSP3	NSP4	NSP5	
C1	F1	253	G3	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		255	G3	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
	F2	264	G4	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		270	G4	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
F3	284	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	
F4	348	G9	P[23]*	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1	
C2	F5	222	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
	F6	341	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
	F7	437	G3	P[19]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		438	G5	P[19]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E9	H1
C3	F8	447	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		448	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
	F9	451	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		452	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
C4	F10	376	G4	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
	F11	393	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		394	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
C5	F12	35	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		37	G3	P[7]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
C6	F13	471	G3	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
		473	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
C7	F14	108	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
C8	F15	456	G5	P[13]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1
C9	F16	486	G9	P[23]	I5	R1	C1	M1	A8	N1	T7	E1	H1

Figure 1. Constellation of RVA genotypes found in the present study. The figure shows the distribution of genotypes by viral protein considering the company (C1 to C9), the farm (F1 to F16) and the sample code. The genotype nomenclature follows the recommendations of the Rotavirus Classification Working Group. *Sample 348 was also genotyped as P[28] for the VP4 protein.

3.2 Phylogenetic and evolutionary analysis

The phylogenetic analysis using the data available in GenBank indicated that the sequences determined in the present study belonged to distinct clusters but probably all of them were of pig origin (Figure 2). The internal gene cassette formed a significant cluster within porcine isolates from pigs or transmitted to humans (Figure 3).

Similarly, the amino acid networks constructed from the VP1 deduced amino acid sequences showed that all the RVA isolates of the present study clustered together in a single porcine group, suggesting a porcine monophyletic branch (Figure 4). VP6 sequences clustered in a branch together with other porcine strains, but NSP5 sequences clustered in a branch containing porcine and porcine-like human RVA sequences.

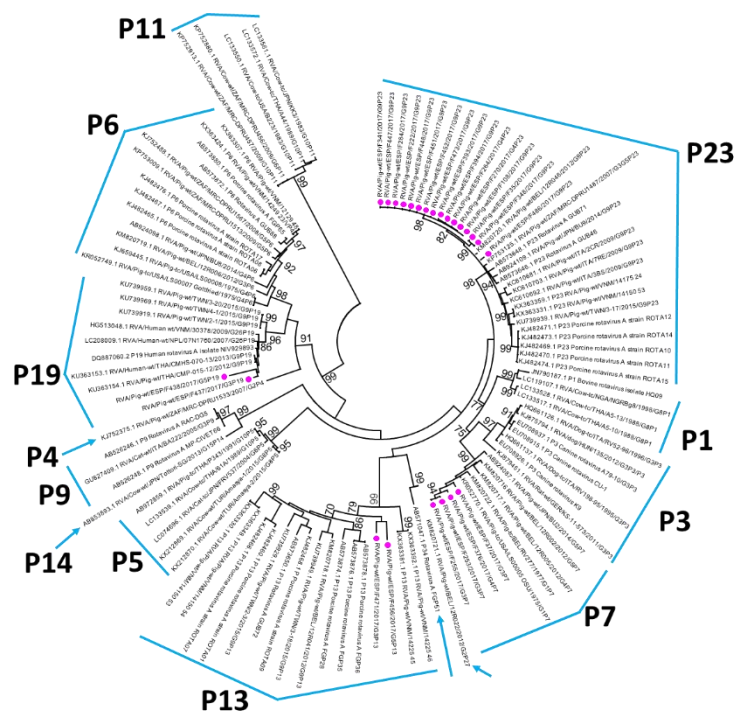


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree calculated with the general time reversible model of VP4 gene. P genotypes are indicated along the tree. In pink, the RVA isolates of the present study. RVA strains isolated in different species were included for comparison purposes. Numbers along the branches indicate the bootstrap values; only values larger than 75% are indicated.

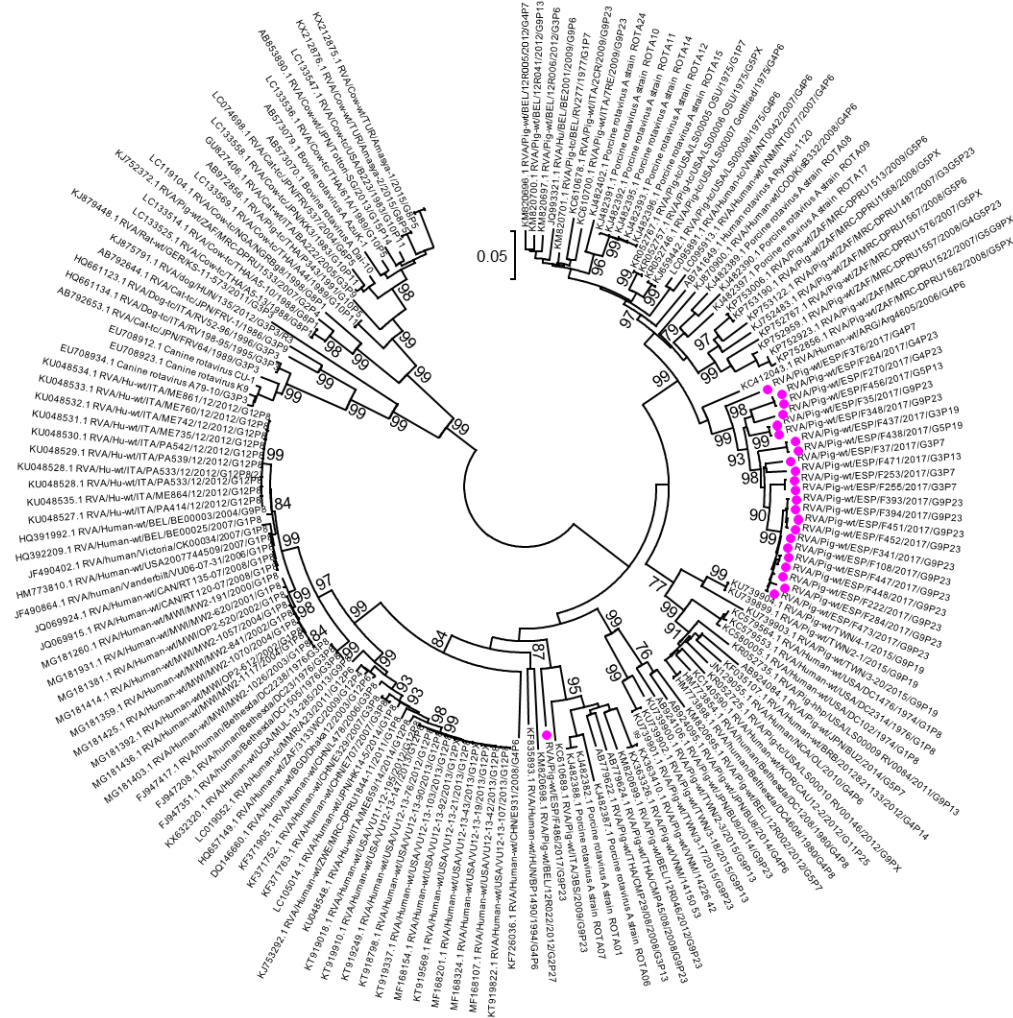


Figure 3. Maximum likelihood phylogenetic tree calculated with the general time reversible model of VP1 gene. In pink, the RVA isolates of the present study. RVA strains isolated in different species were included for comparison purpose). Numbers along the branches indicate the bootstrap values; only values larger than 75% are indicated.

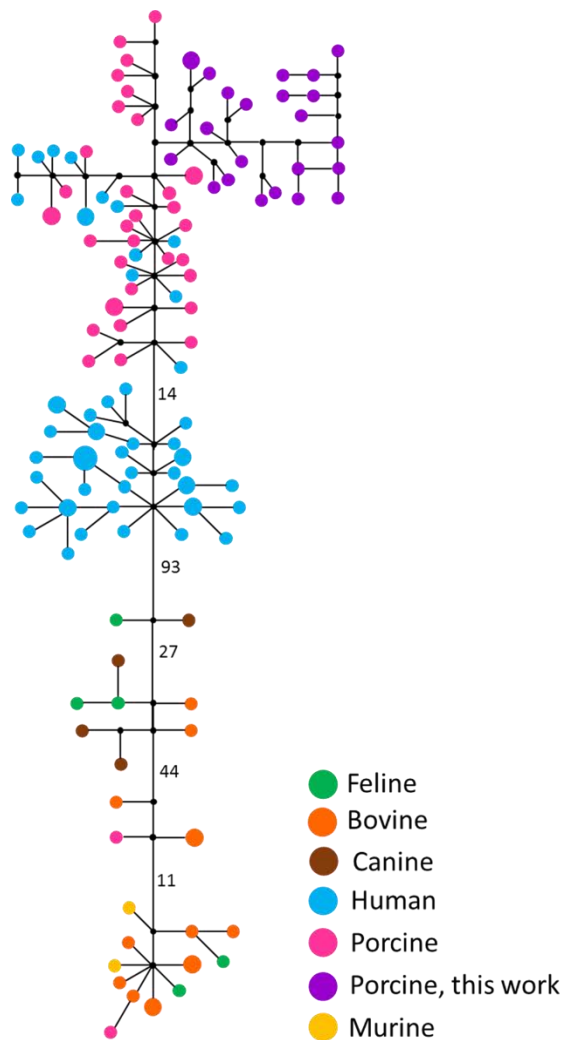


Figure 4. Median-Joining network based on the amino acid sequences of the VP1 gene using animal and human RVA sequences available in Genbank. Numbers along the branches represent the amino acid differences. Only numbers larger than 10 are represented.

3.3 Temporary estimation of the introduction

A fast rate of substitution – in the range of 10^{-3} subst·site⁻¹·year⁻¹ – was consistently obtained from the VP1, VP6 and NSP5 runs. Hence, the estimated tMRCA was dated between 9 and 11 months prior to the first sampling date, and accordingly the introduction of the virus was inferred between March and May 2016.

3.4 Comparison of amino acid sequences in the neutralizing epitopes

To assess the potential efficacy of vaccination, the neutralizing epitopes 7-1ab and 7-2 of the VP7 protein, as well as the VP4 trypsin cleavage product VP8* (with 4 segments, namely 8-1, 8-2, 8-3, 8-4) were compared to the vaccine strains (Tables 1 and 2). The comparison showed that most of the isolates in the present study presented a high number of amino acid changes compared to the vaccine sequences. Thus, for VP7 the number of changes in relevant antigenic sites ranged from 2 in one G9 sequence up to 10 in a G4 isolate; epitopes 7-1 and 7-2 were affected in a similar proportion of amino acid positions. For VP8* the number of changes ranged from 0 in three P[7] up to 13 in two P[19]. All segments presented significant changes. Seven residues in 7-1 (W98, E-D100, Q104, I-V129, K291, Q201, D211), three residues in 7-2 (K-R143, S190, G264), four residues in 8-1 (D100, N-T148, T190 and Y-L193), and one residue in 8-2 (T180) were conserved among all isolates.

Regarding the sample of the vaccinated herd (F486), it differed by 2 residues (N91, Y97) and one residue (G221) in the neutralizing epitopes in 7-1 and 7-2 respectively, while it differed two residues (E146, T150) in 8-1, four residues (T113, S116, V133, T135) in 8-3 and two residues (S87 and A89) in 8-4.

Table 1. Neutralizing epitopes in the VP7 protein of the strains sequenced in this study compared to the vaccine strains Gottfried (KR052751), OSU (KR052772) and A2 (AB180971), as proposed by Aoki *et al.* (2009). The asterisks represent the same residues compared to the vaccine strains. Grey columns indicate conserved amino acids.

	7-1a													7-1b						7-2										
	87	91	94	96	97	98	99	100	104	123	125	129	130	291	201	211	212	213	238	242	143	145	146	147	148	190	217	221	264	
Gottfried (G4)	S	T	N	N	E	W	K	D	Q	N	L	I	D	K	Q	N	T	A	D	T	R	A	S	G	E	S	T	S	G	
OSU (G5)	N	T	A	T	K	W	T	E	Q	D	A	V	E	R	Q	D	I	N	D	S	K	D	G	N	L	S	T	A	G	
A2 (G9)	T	T	G	T	E	W	K	N	Q	D	A	I	D	K	Q	N	K	A	D	N	K	D	S	T	L	S	E	N	G	
RVA/Pig-wt/ESP/F35/2017/G9P[23]	*	N	*	*	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*
RVA/Pig-wt/ESP/F37/2017/G3P[7]	*	N	E	K	S	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	K	*	K	*	*	A	*	*	*	G	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F108/2017/G9P[23]	*	H	Q	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F222/2017/G9P[23]	*	H	Q	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F253/2017/G3P[7]	A	R	*	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	N	*	*	*	*	A	A	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F255/2017/G3P[7]	*	N	E	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	E	N	*	*	*	A	A	F	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F264/2017/G4P[23]	*	N	K	R	*	*	*	*	*	E	V	*	*	*	*	*	*	K	*	*	*	*	A	R	*	*	*	R	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F270/2017/G4P[23]	*	N	K	R	*	*	*	*	*	E	V	*	*	*	*	*	*	K	*	*	*	V	A	R	*	*	*	R	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F284/2017/G9P[23]	*	H	Q	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F341/2017/G9P[23]	*	H	E	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F348/2017/G9P[23]	*	N	*	*	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F376/2017/G4P[7]	*	N	K	*	*	*	*	*	*	E	V	*	*	*	*	*	*	K	*	*	*	*	*	R	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F393/2017/G9P[23]	*	H	Y	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F394/2017/G9P[23]	*	H	H	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F437/2017/G3P[19]	*	R	*	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	S	S	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F438/2017/G5P[19]	*	N	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	A	*	F	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F447/2017/G9P[23]	*	H	Q	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F448/2017/G9P[23]	*	H	E	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F451/2017/G9P[23]	*	H	E	A	Y	*	*	*	*	*	*	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F452/2017/G9P[23]	*	H	E	A	Y	*	*	*	*	*	*	K	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F456/2017/G5P[13]	*	*	E	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	V	*	*	*	*	A	*	F	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F471/2017/G3P[13]	*	R	*	*	S	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*	A	A	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F473/2017/G9P[23]	*	H	Q	A	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	*	*	R	*	*	*	E	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F486/2017/G9P[23]	*	N	*	*	Y	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	

Table 2. Neutralizing epitopes in the VP4 trypsin cleavage product VP8* of the strains sequenced in this study compared to the vaccine strains Gottfried (KR052749), OSU (KR052770) and A2 (AB180977) as proposed by Monnier et al. (2006) and Dormitzer et al. (2002). The asterisks represent the same residues compared to the vaccine strains. Grey columns indicate conserved amino acids and dashes designate stop codons.

	8-1											8-2		8-3							8-4					
	100	146	148	150	188	190	192	193	194	195	196	180	183	113	114	115	116	125	131	132	133	135	87	88	89	
Gottfried (P[6])	D	N	N	D	S	T	N	L	P	D	V	T	A	P	S	Q	D	V	E	N	S	D	I	N	K	
OSU (P[7])	D	T	T	S	Y	T	N	Y	D	T	V	T	A	Q	T	T	N	Q	E	N	T	Q	T	V	E	
A2 (P[7])	D	T	A	S	Y	A	D	Y	D	T	V	T	A	Q	A	T	N	Q	E	N	T	Q	T	V	E	
RVA/Pig-wt/ESP/F35/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F37/2017/G3P[7]	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F108/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F222/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F253/2017/G3P[7]	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F255/2017/G3P[7]	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F264/2017/G4P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	V	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F270/2017/G4P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	V	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F284/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F341/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F348/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	S	*	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F348/2017/G9P[28]	*	Y	*	N	C	*	*	*	*	A	*	*	*	A	*	P	S	S	*	*	*	S	*	D	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F376/2017/G4P[7]	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	V	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F393/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	V	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F394/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	V	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F437/2017/G3P[19]	*	D	*	E	*	*	*	*	*	E	I	*	*	N	*	E	S	N	V	*	*	N	N	S	S	
RVA/Pig-wt/ESP/F438/2017/G5P[19]	*	*	*	E	*	*	*	*	*	Y	E	I	*	*	N	*	E	S	N	V	*	*	N	N	C	S
RVA/Pig-wt/ESP/F447/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F448/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F451/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F452/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	V	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F456/2017/G5P[13]	*	S	*	T	*	*	*	*	S	*	M/I	*	*	S	Q	E	L	*	*	K	I	*	N	D	-	
RVA/Pig-wt/ESP/F471/2017/G3P[13]	*	S	*	T	*	*	S	*	S	*	I	*	*	*	Q	E	S	R	*	*	A	*	N	D	*	
RVA/Pig-wt/ESP/F473/2017/G9P[23]	*	D	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	P	*	*	V	T	S	*	A	
RVA/Pig-wt/ESP/F486/2017/G9P[23]	*	E	*	T	*	*	*	*	*	*	*	*	*	T	*	*	S	*	*	*	V	T	S	*	A	

4. Discussion

RVA is a major cause of diarrhea in young pigs. In the present work, we fully characterized using NGS the circulating quasi-species and the whole consensus sequences of 24 samples from 16 outbreaks affecting neonates, an indication of lack of immunity in the herd and compatible with the introduction of a previously unreported strain. Based on the results of the analysis of the internal gene cassette and the network analysis, the most likely scenario is that all isolates were of pig origin and had a common ancestor that was probably introduced in the population between March and May 2016. Given that most of the isolates were G9 and P[23] (Figure 2), it is tempting to speculate that the original virus belonged to this combination. A recent publication by Wenkse *et al.* (2018) reported RVA sequences from Germany and compared them with other available sequences from Europe (Midgley *et al.*, 2012; Vlasova *et al.*, 2017). The most recent porcine RVA sequences from Spain corresponded to the genotypes G9P[8], G10P[6], G4P[23] and G12P[8]. Only G4P[23] was detected in one farm. The most common combination in our set, G9P[23] was present in Germany and Belgium. Besides RVA, metagenomic analyses reported the presence of kobuvirus, astrovirus and sapovirus in several samples. These viruses are commonly found in pig faeces, both from healthy and diarrheic piglets (Brnic *et al.*, 2013; Lauritsen *et al.*, 2015; Goecke *et al.*, 2017; Jackova *et al.*, 2017; Theuns *et al.*, 2018).

It is worth noting that in spite of all the evidence for a very recent introduction of that virus, G and P genotype combinations were highly diverse, while the diversity of the genome backbone genotypes was minimal. This suggests that in a very short time a high diversification of the VP7 and VP4 genes happened. Actually, RVA strains with different G and P types were detected in three farms in our study. Also, a co-infection by two P genotypes was even found in a pig, evidencing the high frequency of reassortment events. G9P[23] genotype is either the parental strain or the predominant reassorted strain. These findings highlight the dynamic nature of the evolution of RVA. Enteric viruses are easily transmitted in naïve populations, with a fast dissemination. It is important to remind that, under the current intensive pig production systems, replacement rates are very high and

animal movements from and to farms are continuously increasing. Altogether, a highly transmissible pathogen, a naïve population, and a very high contact rate, are the ideal combination for an epidemic.

At present, there is no licensed porcine RVA vaccine available in Spain and, therefore, RVA vaccines have to be imported, mainly from USA. Certainly, these vaccines may have some use but cannot probably cover the diversity of RVA circulating in other countries. In our case, the disagreement between the amino acid sequences of the Spanish isolates and the sequence of the antigenic sites of the vaccine examined was high, and a moderate or low efficacy could be expected beforehand. This was the case of Farm 16 where sows were vaccinated. It is noteworthy that, compared with other analyses of amino acid mutations in the antigenic regions of human and porcine RVA (Zeller *et al.*, 2012; Theuns *et al.*, 2015), in VP7 many mutations were not described previously (6 out of 14 in 7-1a, 3 out of 6 in 7-1b, and 5 out of 9 in 7-2).

In summary, the present report shows an example of how a new RVA strain may disseminate rapidly in the population and of the extremely high diversification that this pathogen may have undergone in a very short period. These observations should increase the awareness for pathogen introduction. Certainly, the introduction of a new pathogen in a farm can have catastrophic consequences. The recent episodes of porcine epidemic diarrhea in the Americas illustrate that point. Besides this, the development of vaccines for new types of RVA can be useful for further control of this infection.

5. References

- Amimo, J.O., Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2013. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J. Clin. Microbiol.* 51, 1142–51.
- Aoki, S.T., Settembre, E.C., Trask, S.D., Greenberg, H.B., Harrison, S.C., Dormitzer, P.R., 2009. Structure of Rotavirus Outer-Layer Protein VP7 Bound with a Neutralizing Fab. *Science* 324, 1444–47.
- Bányai, K., Kemenesi, G., Budinski, I., Földes, F., Zana, B., Marton, S., Varga-Kugler, R., Oldal, M., Kurucz, K., Jakab, F., 2017. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect. Genet. Evol.* 48, 19–26.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–20.
- Brnic, D., Prpic, J., Keros, T., Roic, B., Staresina, V., Jemersic, L., 2013. Porcine astrovirus viremia and high genetic variability in pigs on large holdings in Croatia. *Infect. Genet. Evol.* 14, 258–64.
- Chandler-Bostock, R., Hancox, L.R., Nawaz, S., Watts, O., Iturriza-Gomara, M., Mellits, K.H., 2014. Genetic diversity of porcine group A rotavirus strains in the UK. *Vet. Mic.* 173, 27–37.
- Chang, K.O., Saif, L.J., Kim, Y., 2012. Reoviruses (Rotaviruses and Reoviruses). In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 621-34.
- Desselberger, U., 2014. Rotaviruses. *Virus Res.* 190, 75–96.
- Do, L.P., Nakagomi, T., Otaki, H., Agbemabiese, C.A., Nakagomi, O., Tsunemitsu, H., 2016. Phylogenetic inference of the porcine Rotavirus A origin of the human G1 VP7 gene. *Infect. Genet. Evol.* 40, 205–213.
- Dormitzer, P.R., Sun, Z.Y.J., Wagner, G., Harrison, S.C., 2002. The rhesus rotavirus VP4 sialic acid binding domain has a galectin fold with a novel carbohydrate binding site. *EMBO J.* 21, 885-97.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969–73.

Estes, M.K., Greenberg, H.B., 2013. Rotaviruses. In: Knipe, P., Howley, P. (Eds.), *Fields Virology*. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia, USA, 1347–95.

Goecke, N.B., Hjulsager, C.K., Kongsted, H., Boye, M., Rasmussen, S., Granberg, F., Fischer, T.K., Midgley, S.E., Rasmussen, L.D., Angen, Ø., Nielsen, J.P., Jorsal, S.E., Larsen, L.E., 2017. No evidence of enteric viral involvement in the new neonatal porcine diarrhea syndrome in Danish pigs. *BMC Vet. Res.* 13, 315.

Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41, 95–98.

Heiman, E.M., McDonald, S.M., Barro, M., Taraporewala, Z.F., Bar-Magen, T., Patton, J.T., 2008. Group A human rotavirus genomics: evidence that gene constellations are influenced by viral protein interactions. *J. Virol.* 82, 11106–16.

Hoshino, Y., Honma, S., Jones, R.W., Ross, J., Santos, N., Gentsch, J.R., Kapikian, A.Z., Hesse, R.A., 2005. A porcine G9 rotavirus strain shares neutralization and VP7 phylogenetic sequence lineage 3 characteristics with contemporary human G9 rotavirus strains. *Virology* 332, 177–88.

ICTV, International Committee on Taxonomy of Viruses, 2017. Master Species List 2017. Retrieved from: <https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/m/msl/7185>

Jackova, A., Sliz, I., Mandelik, R., Salamunova, S., Novotny, J., Kolesarova, M., Vlasakova, M., Vilcek, S., 2017. Porcine kobuvirus 1 in healthy and diarrheic pigs: Genetic detection and characterization of virus and co-infection with rotavirus A. *Infect. Genet. Evol.* 49, 73–77.

Jing, Z., Zhang, X., Shi, H., Chen, J., Shi, D., Dong, H., Feng, L., 2017. A G3P[13] porcine group A rotavirus emerging in China is a reassortant and a natural recombinant in the VP4 gene. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, 1–12.

Kosakovsky-Pond, S.L., Posada, D., Gravenor, M.B., Woelk, C.H., Frost, S.D.W., 2006. GARD: a genetic algorithm for recombination detection. *Bioinformatics* 22, 3096–98.

Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–74.

Lauritsen, K.T., Hansen, M.S., Johnsen, C.K., Jungersen, G., Bottiger, B., 2015. Repeated examination of natural sapovirus infections in pig litters raised under experimental conditions. *Acta Vet. Scand.* 57, 60–65.

Li, H., Durbin, R., 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 489–495.

Maes, P., Matthijnssens, J., Rahman, M., Van Ranst, M., 2009. RotaC: A web-based tool for the complete genome classification of group A rotaviruses. *BMC Microbiol.* 9, 238.

Martella, V., Bányai, K., Matthijnssens, J., Buonavoglia, C., Ciarlet, M., 2010. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet. Mic.* 140, 246–55.

Martella, V., Ciarlet, M., Baselga, R., Arista, S., Elia, G., Lorusso, E., Bányai, K., Terio, V., Madio, A., Ruggeri, F.M., Falcone, E., Camero, M., Decaro, N., Buonavoglia, C., 2005. Sequence analysis of the VP7 and VP4 genes identifies a novel VP7 gene allele of porcine rotaviruses, sharing a common evolutionary origin with human G2 rotaviruses. *Virology* 337, 111–23.

Masuda, T., Tsuchiaka, S., Ashiba, T., Yamasato, H., Fukunari, K., Omatsu, T., Furuya, T., Shirai, J., Mizutani, T., Nagai, M., 2016. Development of one-step real-time reverse transcriptase-PCR-based assays for the rapid and simultaneous detection of four viruses causing porcine diarrhea. *Jap. J. Vet. Res.* 64, 5–14.

Matthijnssens, J., Van Ranst, M., 2012. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr. Opin. Virol.* 2, 426–33.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Heiman, E., Arijs, I., Delbeke, T., McDonald, S.M., Palombo, E.A., Iturriza-Gomara, M., Maes, P., Patton, J.T., Rahman, M., Van Ranst, M., 2008a. 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. *J. Virol.* 82, 3204–19.

Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Rahman, M., Attoui, H., Bányai, K., Estes, M.K., Gentsch, J.R., Iturriza-Gómara, M., Kirkwood, C.D., Martella, V., Mertens, P.P., Nakagomi, O., Patton, J.T.,

Ruggeri, F.M., Saif, L.J., Santos, N., Steyer, A., Taniguchi, K., Desselberger, U., Van Ranst, M., 2008b. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch. Virol.* 153, 1621–29.

Matthijnssens, J., Otto, P.H., Ciarlet, M., Desselberger, U., van Ranst, M., Johne, R., 2012. VP6-sequence-based cutoff values as a criterion for rotavirus species demarcation. *Arch. Virol.* 157, 1177–82.

McDonald, S.M., McKell, A.O., Rippinger, C.M., McAllen, J.K., Akopov, A., Kirkness, E.F., Payne, D.C., Edwards, K.M., Chappell, J.D., Patton, J.T., 2012. Diversity and relationships of cocirculating modern human rotaviruses revealed using large-scale comparative genomics. *J. Virol.* 86, 9148–62.

Midgley, S.E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsager, C.K., Jakab, F., Kaplon, J., Larsen, L.E., Monini, M., Poljšak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Steyer, A., Koopmans, M., Böttiger, B., 2012. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156, 238-45.

Naseer, O., Jarvis, M.C., Ciarlet, M., Marthaler, D.G., 2017. Genotypic and epitope characteristics of group A porcine rotavirus strains circulating in Canada. *Virology* 507, 53–63.

Papp, H., László, B., Jakab, F., Ganesh, B., De Grazia, S., Matthijnssens, J., Ciarlet, M., Martella, V., Bányai, K., 2013. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet. Mic.* 165, 190–99.

Pham, H.A., Carrique-Mas, J.J., Nguyen, V.C., Ngo, T.H., Nguyet, L.A., Do, T.D., Vo, B.H., Phan, V.T., Rabaa, M.A., Farrar, J., Baker, S., Bryant, J.E., 2014. The prevalence and genetic diversity of group A rotaviruses on pig farms in the Mekong Delta region of Vietnam. *Vet. Mic.* 170, 258–65.

Rambaut, A., Drummond, A.J., Xie, D., Baele, G., Suchard, M.A., 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Syst Biol.* 67, 901-04.

Teodoroff, T.A., Tsunemitsu, H., Okamoto, K., Katsuda, K., Kohmoto, M., Kawashima, K., Nakagomi, T., Nakagomi, O., 2005. Predominance of porcine rotavirus G9 in Japanese piglets with diarrhoea: Close relationship of their VP7 genes with those of recent human G9 strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1377–84.

Theuns, S., Desmarests, L.M., Heylen, E., Zeller, M., Dedeurwaerder, A., Roukaerts, I.D., Van Ranst, M., Matthijnsens, J., Nauwynck, H.J., 2014. Porcine group A rotaviruses with heterogeneous VP7 and VP4 genotype combinations can be found together with enteric bacteria on Belgian swine farms. *Vet. Mic.* 172, 23–34.

Theuns, S., Heylen, E., Zeller, M., Roukaerts, I.D., Desmarests, L.M., Van Ranst, M., Nauwynck, H.J., Matthijnsens, J., 2015. Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. *J. Virol.* 89, 1043–57.

Theuns, S., Vanmechelen, B., Bernaert, Q., Deboutte, W., Vandenhoe, M., Beller, L., Matthijnsens, J., Maes, P., Nauwynck, H.J., 2018. Nanopore sequencing as a revolutionary diagnostic tool for porcine viral enteric disease complexes identifies porcine kobuvirus as an important enteric virus. *Sci. Rep.* 8, 9830.

Vlasova, A.N., Amimo, J.O., Saif, L.J., 2017. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. *Viruses* 9, E48.

Wenske, O., Rückner, A., Piehler, D., Schwarz, B.A., Vahlenkamp, T.W., 2018. Epidemiological analysis of porcine rotavirus A genotypes in Germany. *Vet.Mic.* 214, 93–98.

Wilm, A., Aw, P.P., Bertrand, D., Yeo, G.H., Ong, S.H., Wong, C.H., Khor, C.C., Petric, R., Hibberd, M.L., Nagarajan, N., 2012. LoFreq: a sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.* 40, 11189–201.

Wood, D.E., Salzberg, S.L., 2014. Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. *Genome Biol.* 15.

Zeller, M., Patton, J.T., Heylen, E., De Coster, S., Ciarlet, M., Van Ranst, M., Matthijnsens, J., 2011. Genetic analyses reveal differences in the VP7 and VP4 antigenic epitopes between human rotaviruses circulating in Belgium and rotaviruses in Rotarix and RotaTeq. *J. Clin. Microbiol.* 50, 966–76.

ESTUDI 3: Antimicrobial resistance profiles and
characterization of *Escherichia coli* strains from cases of
neonatal diarrhea in Spanish pig farms

1. Introduction

Escherichia coli has historically been considered one of the most common agent associated with diarrhea in suckling and post-weaned piglets (Fairbrother & Gyles, 2012). There is high diversity and variants of *E. coli* strains integrating the normal gut flora, being most of them considered as not pathogenic (DebRoy & Maddox, 2001). The characterization of pathogenic *E. coli* strains is usually based on the presence of virulence factors, such as adhesins, and the toxigenic capacity of the strains (Mainil, 2013). In piglets, *E. coli* pathogenic strains can be classified in different pathotypes: enterotoxigenic (ETEC) strains releasing heat-labile LT and heat-stable Sta and Stb exotoxins, intimin (*eae*)-producing enteropathogenic (EPEC) strains, and verotoxigenic (VTEC) strains producing VT1/VT2 verotoxins (Robins-Browne *et al.*, 2016).

The routinely use of antimicrobials in livestock, and especially in the pig industry, for either 'prophylaxis' or 'metaphylaxis' represents a serious hazard for the selection of multidrug-resistant (MDR) *Enterobacteriaceae* strains (Angulo *et al.*, 2004; Burow *et al.*, 2014). In fact, the effectiveness of treatments against *E. coli* is threatened by the dramatically increase of Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) producing isolates worldwide (Livermore *et al.*, 2007; Carattoli, 2008; Kibret & Abera, 2011). The genes that codify the ESBL enzymes are usually located in plasmids and be easily transferred horizontally among different bacterial populations. Most ESBL derive from the first enzymes discovered, TEM and SHV, which confer resistance to beta-lactams such as ampicillin or amoxicillin, and more recently the CTX-M enzymes, which confer resistance to third and fourth generation cephalosporins (Randall *et al.*, 2014). Cephalosporins, along with the other beta-lactams, constitute one of the largest families of antimicrobials widely used in both human and veterinary medicine (Hasman *et al.*, 2005). On the other hand, in veterinary medicine, colistin sulfate is indicated for the treatment of *Enterobacteriaceae* infections, and has been widely used as a preventive mass-medication of colibacillosis in piglets (Rhouma *et al.*, 2016). Although colistin is one of the antimicrobial agents with the lowest rates of resistance, the emergence of the *mcr-1* plasmid in the *Enterobacteriaceae* population has resulted in the

appearance of strains with acquired resistance to this antibiotic (Boyen *et al.*, 2010; Schwarz & Johnson, 2016). In order to stop the increase of colistin-resistant strains, the European Medicines Agency established in 2016 that all EU members should restrict and reduce the use of colistin in animals for treating infections with a target level of 5 mg/PCU (EMA, 2016).

During the last decades, the importance of *E. coli* in porcine neonatal diarrhea seems to have decreased (Chan *et al.*, 2013), possibly due to the successful vaccination plans implemented in the pig farms (Kongsted *et al.*, 2018). Therefore, antimicrobial treatment might not be required in most cases of diarrhea, especially in those cases where the role of the *E. coli* is not well defined. However, the systematic mass-medication of piglets suffering from diarrheic processes is still common in many cases.

The aim of the present work was to characterize the virulence factors and to determine the genotypic and phenotypic antimicrobial resistance patterns of *E. coli* isolates from cases of neonatal diarrhea in conventional pig farms of Catalonia (Spain). Moreover, in order to assess the clinical relevance of all isolates, samples from non-diarrheic pen mates were also analyzed and compared to the clinical cases.

2. Materials and methods

2.1 Microbiological testing

A total of 122 *E. coli* isolates obtained from 24 conventional farms suffering neonatal diarrhea outbreaks during 2017 and 2018 were recovered from a previous study. All *E. coli* isolates had previously been stored at -80°C in glycerol. From the 122 isolates, 94 were obtained from diarrheic samples from 1-week-old diseased piglets and 28, from normal feces from apparently healthy pen-mates.

All isolates were re-suspended in a Brain Heart Infusion broth for 24h at 37°C, and before being cultured in standard Blood Agar (BD GmbH, Germany) and MacConkey Agar (Oxoid, United Kingdom) and aerobically incubated at 37°C during 24h. All strains were confirmed as *E. coli* using conventional biochemical tests.

2.2 Characterization of *E. coli* virulence factors and toxins

The presence of *E. coli* toxins (Sta, Stb, LT, EAST1, VT1 and VT2), fimbrial adhesins (F4, F5, F6, F18 and F41) and non-fimbrial adhesin *eae* genes were analyzed by qualitative PCR, following the protocol described by Toledo *et al.* (2012) with slight modifications. Briefly, PCR were carried out using the Biotaq DNA polymerase kit (Biotaq, Ecogen) and the primers described in Table 1. The final 25 µl mixture consisted of: 1x PCR Buffer, 0.8 mM of the dNTP mix, 3 mM of MgCl₂, 1mM of each primer and 1U of Taq Polymerase. As template, 2.5 µl of the DNA sample were used. The PCR program consisted of 5 min at 94°C, followed by 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min of annealing at 57°C and 1 min of extension at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C.

Reference *E. coli* strains used as positive controls were FV12048 (F4+ LT+ EAST1+), FV9722 (F5+ F41+), FV7633 (F6+), FV12047 (F18+ Sta+ Stb+) and O157-84 (*eae*+ VT1+ VT2+), kindly donated by Dr. Blanco (*E. coli* Reference Laboratory, Santiago de Compostela, Spain)

2.3 Antimicrobial resistance phenotyping analyses

Antimicrobial susceptibility of *E. coli* isolates was tested using the disk diffusion method described by Kirby-Bauer (Bauer *et al.*, 1966). Briefly, 1 to 4 colonies were suspended in 5 mL of distilled sterile water, in order to achieve a turbidity of 0.5 in 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: aminopenicillins (ampicillin, amoxicillin, amoxicillin/clavulanic acid), cephalosporins (ceftiofur, cefalexin, cefquinome, ceftriaxone), quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, flumequine), aminoglycosides (gentamicin, neomycin, streptomycin, apramycin), tetracyclines (tetracycline, doxycycline), sulfonamides (sulfonamide, sulfamethoxazole/trimethoprim), florfenicol, colistin and lincospectin.

Additionally, minimum inhibitory concentration (MIC) test was performed in order to evaluate antimicrobial susceptibility to colistin, using the broth-microdilution method, as recommended by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) in 96 well plates. *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 tested strains were considered to be resistant when their MIC value was higher than the wild type cut-off value (MIC > 2µg/mL) (Boyen *et al.*, 2010).

2.4 Genetic characterization of antimicrobial resistance genes

Molecular diagnosis of AMR genes was performed for the following ESBL genes *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{CMY1}*, *bla_{CMY2}*, and *bla_{TEM}*, Carbapenemase *bla_{OXA}* and *mcr-1* to *mcr-5* colistin-resistance genes. The primers used for this study are described in Table 2 and the PCR conditions were homogenized for all the reactions as follows: 5 min at 94°C, followed by 25 cycles of 1 min at 94°C, 1 min of annealing at 55°C and 1 min of extension at 72°C, and a final extension step of 7 min at 72°C. Positive *E. coli* strains used as positive controls were kindly provided by Dr. Migura (CReSA, Bellaterra, Spain).

Amplified PCR products were Sanger sequenced for verification at the Genomic and Bioinformatics Service of the Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona, Spain). Sequences and chromatograms were manually explored to trim bad-quality bases using the BioEdit software. The obtained sequences were aligned using Clustal Omega and blasted against those described at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) database.

2.5 Statistical analysis

The Chi-square test or Fisher exact test was used for comparison between proportions when appropriate. Statistically significant results were considered when $p < 0.05$.

Table 1. Description of the primer sequences of *E. coli* virulence factors

		Primer sequence (3'-5')	Amplified product (bp)	References
Virulence factors and toxins				
LT	F	ATTTACGGCGTTACTATCCTC	280	Olive, 1989
	R	TTTTGGTCTCGGTCAGATATG		
EAST1	F	CCATCAACACAGTATATCCGA	111	Yamamoto & Nakazawa , 1997
	R	GGTCGCGAGTGACGGCTTTGT		
Sta	F	TCTTTCCCTCTTTTAGTCAG	166	Blanco <i>et al.</i> , 2004
	R	ACAGGCAGGATTACAACAAAG		
Stb	F	GCCTATGCATCTACACAATC	279	Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994
	R	TGAGAAATGGACAATGTCCG		
VT1	F	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC	302	Blanco <i>et al.</i> , 2004
	R	CGTGGTATAGCTACTGTCACC		
VT2	F	CTTCGGTATCCTATTCCGG	516	Blanco <i>et al.</i> , 2004
	R	CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC		
F4	F	GCTGCATCTGCTGCATCTGGTATGG	792	Vu-Khac <i>et al.</i> , 2007
	R	CCACTGAGTGCTGGTAGTTACAGCC		
F5	F	TGCGACTACCAATGCTTCTG	450	Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994
	R	TATCCACCATTAGACGGAGC		
F6	F	TCTGCTCTTAAAGCTACTGG	333	Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994
	R	AACTCCACCGTTTGTATCAG		
F18	F	GTGAAAAGACTAGTGTATTATTC	510	Imberechts <i>et al.</i> , 1997
	R	CTTGTAAGTAACCGCGTAAGC		
F41	F	GAGGGACTTTCATCTTTTAG	431	Ojeniyi <i>et al.</i> , 1994
	R	AGTCCATTCCATTTATAGGC		
Eae	F	GGAACGGCAGAGGTTAATCTGCAG	375	Blanco <i>et al.</i> , 2004
	R	GGCGCTCATCATAGTCTTTC		

F: forward, R: reverse, bp: base pairs

Table 2. Description of the primer sequences of AMR genes

AMR genes		Primer sequence (3'-5')	Amplified product (bp)	References
bla_{TEM}	F	GCGGAACCCCTATTTG	963	Olesen <i>et al.</i> , 2004
	R	ACCAATGCTTAATCAGTGAG		
bla_{CTX}	F	ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC	593	Boyd <i>et al.</i> , 2004
	R	TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG		
bla_{SHV}	F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	797	Arlet <i>et al.</i> , 1997
	R	GATTTGCTGATTTGCTCGG		
bla_{CMY1}	F	ATGCAACAACGACAATCC	1085	Kim <i>et al.</i> , 1998
	R	TTGGCCAGCATGACGATG		
bla_{CMY2}	F	GCACTTAGCCACCTATACGGCAG	758	Hasman <i>et al.</i> , 2005
	R	GCTTTTCAAGAATGCGCCAGG		
bla_{OXA}	F	GCGTGGTTAAGGATGAACAG	438	Poirel <i>et al.</i> , 2011
	R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
mcr-1	F	CGGTCAGTCCGTTTGTC	309	Liu <i>et al.</i> , 2016
	R	CTTGGTCGGTCTGTAGGG		
mcr-2	F	TGTTGCTTGTGCCGATTGGA	567	Xavier <i>et al.</i> , 2016
	R	AGATGGTATTGTTGGTTGCTG		
mcr-3	F	TTGGCACTGTATTTTGCATTT	542	Yin <i>et al.</i> , 2017
	R	TTAACGAAATTGGCTGGAACA		
mcr-4	F	ATTGGGATAGTCGCCTTTTT	487	Carattoli <i>et al.</i> , 2017
	R	TTACAGCCAGAATCATTATCA		
mcr-5	F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644	Borowiak <i>et al.</i> , 2017
	R	TCATTGTGGTTGCCTTTTCTG		

F: forward, R: reverse, bp: base pairs

3. Results

3.1 Microbiological identification and characterization of *E. coli* isolates

Most of the *E. coli* isolates presented a very low prevalence of virulence factors and toxins (< 5%) regardless the clinical status, with the exception of EAST1, that was present in more than 70% of the strains (Table 3). Moreover, 74% of the strains were negative for all enterotoxins and intimin genes, being not possible to classify them into any pathotype. The most common pathotypes within the classified strains were EPEC (n=17) and ETEC (n=15) (Table 4). Diarrheic piglets had a higher frequency of ETEC (15%) and VTEC (4.3%) than non-diarrheic piglets, in which only one isolate was ETEC (3.5%), and no VTEC were found (Table 4).

Similarly, *E. coli* strains positive to F4, LT, Sta, VT1 and VT2 genes were only isolated from cases of diarrhea (Table 3).

Table 3. Comparison of virulence factors and pathogenic *E. coli* prevalence in diarrheic (n=94) and non-diarrheic (n=28) pig groups.

	Diarrheic n=94 n (%)	Non-diarrheic n=28 n (%)	OR [CI (95%)]
F4	4 (4.3)	0	-
F5	0	0	-
F6	0	0	-
F18	1 (1.1)	1 (3.5)	0.29 [0.01-4.8]
F41	3 (3.2)	1 (3.5)	0.89 [0.09-8.9]
<i>Eae</i>	11 (11.8)	6 (21.4)	0.48 [0.22-1.3]
LT	2 (2.1)	0	-
Sta	4 (4.3)	0	-
Stb	12 (12.8)	1 (3.5)	3.95 [0.49-31.8]
EAST1	66 (70.2)	24 (85.7)	0.39 [0.12-1.23]
VT1	1 (1.1)	0	-
VT2	3 (3.2)	0	-

OR: Odds ratio, CI: Confidence interval

Table 4. Description of the profiles of virulence factors production and classification of the toxigenic strains into pathotypes of *E. coli* strains.

	Diarrheic (n=94)	Non-Diarrheic (n=28)	Total (n=122)
ETEC (n=11)			
<i>Stb⁺, EAST1⁺</i>	6	1	6
<i>Stb⁺, EAST1⁺, Sta⁺</i>	1	0	1
<i>Stb⁺, EAST1⁺, Sta⁺, F4⁺</i>	2	0	2
<i>LT⁺</i>	1	0	1
<i>LT⁺, EAST1⁺</i>	1	0	1
<i>Total</i>	10 (10.6)	1 (3.5)	11 (9)
ETEC/EPEC (n=1)			
<i>Stb⁺, eae⁺, EAST1⁺, F41⁺</i>	1	0	1
<i>Total</i>	1 (1.1)	0	1 (0.8)
EPEC (n=16)			
<i>eae⁺</i>	1	0	1
<i>eae⁺, EAST1⁺</i>	7	5	12
<i>eae⁺, EAST1⁺, F41⁺</i>	1	1	2
<i>eae⁺, EAST1⁺, F18⁺</i>	1	0	1
<i>Total</i>	10 (10.6)	6 (21)	16 (13.1)
VTEC (n=1)			
<i>VT1⁺</i>	1	0	1
<i>Total</i>	1 (1.1)	0	1 (0.8)
VTEC/ETEC (n=3)			
<i>Stb⁺, VT2⁺</i>	1	0	1
<i>Stb⁺, VT2⁺, EAST1⁺</i>	1	0	1
<i>Stb⁺, VT2⁺, EAST1⁺, Sta⁺, F4⁺</i>	1	0	1
<i>Total</i>	3 (3.2)	0	3 (2.5)

3.2 Antimicrobial resistance phenotyping and genotyping

According to the results obtained by the disk diffusion method, the overall prevalence of AMR in *E. coli* isolates was very high for most of the 9 tested antimicrobial classes. The highest rates of resistance were found for the sulfonamides (87.3%), tetracyclines (87.3%) and aminopenicillins (80.1%), followed by quinolones (49%), cephalosporins (32.9%) and aminoglycosides (27.9%). By contrast, low resistance levels were observed for colistin

(6.5%) and apramycin (5.9%). Regarding the MIC results, 6 out of 122 (5%) were resistant to colistin (MIC >2 ug/mL): 5 of them had a MIC value= 4 ug/mL and one= 8 ug/mL. Comparing the colistin results obtained by disk diffusion and the MIC, no correlation was found between both methods.

Most of the strains, 97.5% (119/122), presented a multidrug-resistance (MDR) profile (≥ 3 antimicrobial categories), and 67.2% of them offered resistance up to six antibiotic classes. Moreover, 30% of the strains (37/122) showed an extensive drug-resistance (XDR) profile (>7 antimicrobial classes). Two strains presented resistance to all the tested antimicrobials except for colistin.

The comparison study between *E. coli* isolates from diarrheic and non-diarrheic samples showed statistical differences in the proportion of AMR *E. coli* isolates (Figure 1). Remarkably, piglets presenting diarrhea had higher prevalence of *E. coli* strains resistant to quinolones (ciprofloxacin, enrofloxacin, and flumequine) and aminoglycosides (gentamicin and neomycin) compared to the non-diarrheic isolates ($p < 0.05$). Isolates from non-diarrheic animals presented similar AMR profile to β -lactams, tetracyclines, sulfonamides and lincospectin to those obtained from clinical cases.

The most prevalent ESBL gene was the *bla*_{CTX-M} found in 22% (27/122) of the total samples, being 22 of them isolates from diarrheic animals. Twenty-six out of the twenty-seven CTX-M+ samples were successfully sequenced and could be classified into genotypes. The most frequent allelic variant of the *bla*_{CTX-M} gene was CTX-M-14, found in 10 samples (38.5%), followed by CTX-M-1 and CTX-M-15, found in 5 isolates each (19.2%). Three samples were classified as CTX-M-32, two as CTX-M-27, and one as CTX-M-3.

CTX-M+ strains presented a wider resistance pattern than those CTX-M-: 81.5% (22/27) of the CTX-M+ strains showed resistance to more than 10 antimicrobials, while in the case of CTX-M-, the percentage was 37.9% (36/95). Statistical differences between CTX-M+ and CTX-M- strains were found for amoxicillin-clavulanic acid, cephalosporins, quinolones and gentamicin drugs (Figure 2). All the strains were negative for the other analyzed ESBL (SHV, CMY-1, CMY-2, TEM), carbapenemase (OXA) and colistin-resistance (*mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-5*)

genes. Colistin resistance genes were detected in few cases: four strains harboured the *mcr-1* gene (3%) and one strain was positive to *mcr-4*. Only one of the *mcr-1+* strains, isolated from a diarrheic animal, exhibited phenotypic resistance to colistin in the MIC test (8 ug/mL).

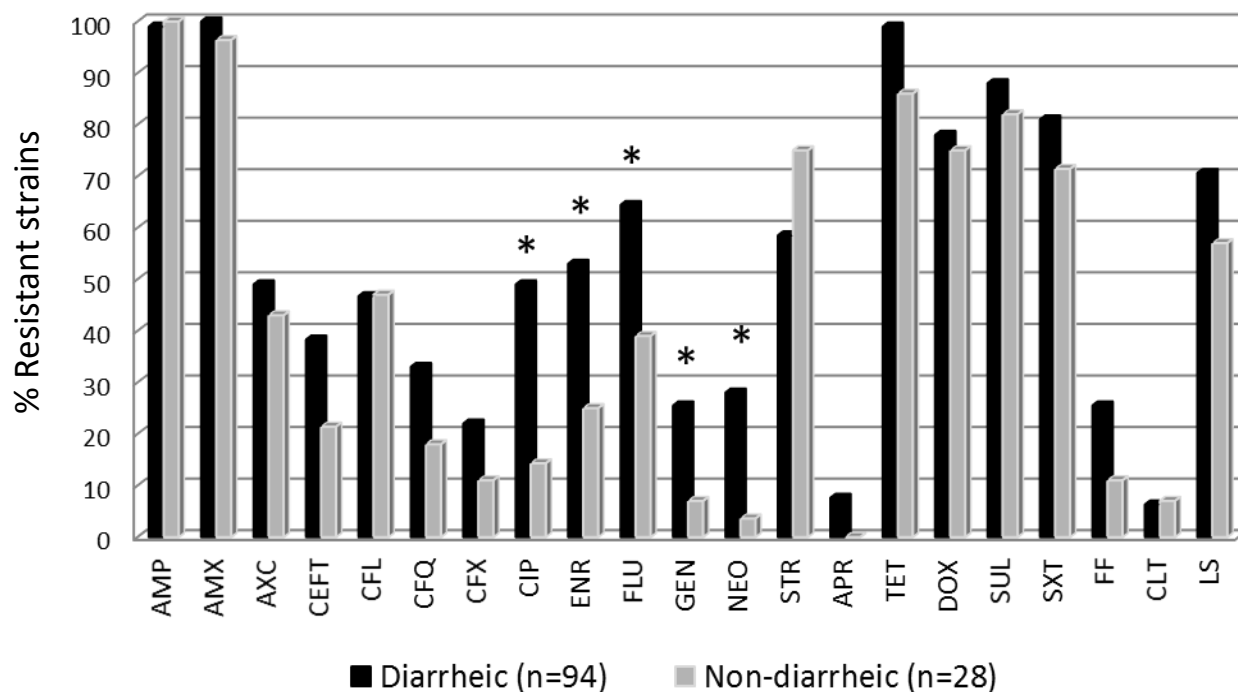


Figure 1. Antimicrobial resistance of *E. coli* strains from diarrheic and non-diarrheic groups. *Statistical differences between diarrheic and non-diarrheic animals ($p < 0.05$). AMP= Ampicillin (10 μg , BD, USA), AMX= Amoxicillin (25 μg , BD, USA), AXC= Amoxicillin/clavulanic acid (20 μg /10 μg , Oxoid, UK), CEFT= Ceftiofur (30 μg , BD, USA), CFL= Cefalexin (30 μg , Oxoid, UK), CFQ= Cefquinome (10 μg , Conda Lab, Spain), CFX= Ceftriaxone (30 μg , BD, USA), CIP= Ciprofloxacin (5 μg , BD, USA), ENR= Enrofloxacin (5 μg , BD, USA), FLU= Flumequine (30 μg , BD, USA), GEN= Gentamicin (10 μg , BD, USA), NEO= Neomycin (30 μg , BD, USA), STR= Streptomycin (10 μg , BD, USA), APR= Apramycin (15 μg , Oxoid, UK), TET= Tetracycline (30 μg , BD, USA), DOX= Doxycycline (30 μg , Oxoid, UK), SUL= sulphphonamide (300 μg , Oxoid, UK), SXT= Sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75 μg / 1.25 μg , BD, USA), FF= Florfenicol (30 μg , Oxoid, UK), CLT= Colistin (50 μg , BD, USA), LS= Lincospectin (2 μg , Oxoid, UK).

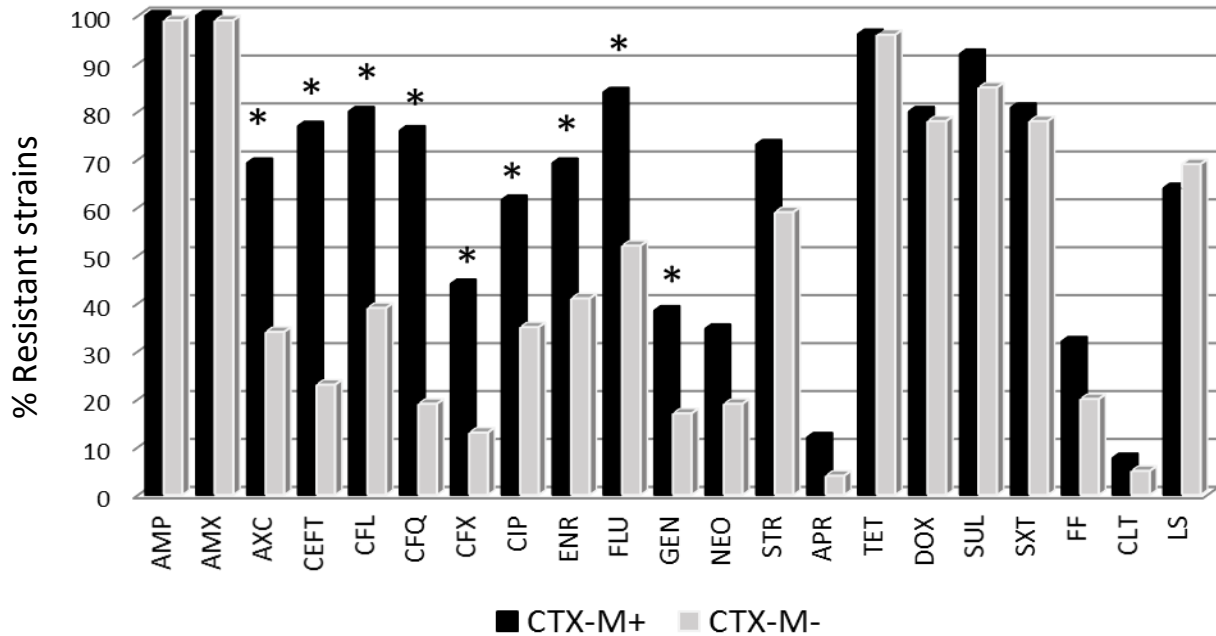


Figure 2. Percentage of *E. coli* resistant strains to different antimicrobial categories according to CTX-M gene expression. *Statistical differences between CTX-M+ (positive) and CTX-M- (negative) strains ($p < 0.05$). AMP= Ampicillin (10 μ g), AMX= Amoxicillin (25 μ g), AXC= Amoxicillin/clavulanic acid (20 μ g/10 μ g), CEFT= Ceftiofur (30 μ g), CFL= Cefalexin (30 μ g), CFQ= Cefquinome (10 μ g), CFX= Ceftriaxone (30 μ g), CIP= Ciprofloxacin (5 μ g), ENR= Enrofloxacin (5 μ g), FLU= Flumequine (30 μ g), GEN= Gentamicin (10 μ g), NEO= Neomycin (30 μ g), STR= Streptomycin (10 μ g), APR= Apramycin (15 μ g), TET= Tetracycline (30 μ g), DOX= Doxycycline (30 μ g), SUL= sulphonamide (300 μ g), SXT= Sulfamethoxazole/trimethoprim (23.75 μ g/ 1.25 μ g), FF= Florfenicol (30 μ g), CLT= Colistin (50 μ g), LS= Lincospectin (2 μ g).

4. Discussion

The aim of this work was to characterize the *E. coli* strains involved in porcine neonatal diarrhea outbreaks, by genotyping and phenotyping isolates obtained from both clinical cases of diarrhea and non-diarrheic healthy pen mates. Surprisingly, the general prevalence of strains encoding genes for virulence factors and toxins, as well as the presence of the typical *E. coli* pathotypes, were low in both pig groups and with no relationship with the diarrhea occurrence.

Merely 26% (32/122) of the strains could be classified into a specific pathotype. EPEC was the most frequent one, representing 14% of the total isolates, followed by ETEC (12%) and finally by 3% VTEC. Although the presence of EPEC is usually reported as a causative agent of diarrhea, principally in post-weaned but also in suckling pigs, the results of the present study cannot corroborate this linkage, since EPEC was also highly detected in non-diarrheic piglets: the prevalence of the intimin *eae* gene found in diarrheic was 11.8% and in non-diarrheic piglets, 21.4%. These results are in agreement with those reported in previous works, ranging from 3 to 26% in diarrheic animals and 9 to 17% in non-diarrheic animals (Martins *et al.*, 2000; Ngeleka *et al.*, 2003; Vu-Khac *et al.*, 2007). Finally, EAST1 gene was highly detected in both diarrheic (70%) and non-diarrheic groups (86%) but again with no relationship with the clinical onset. The EAST1 toxin is produced by several *E. coli* pathotypes (Savarino *et al.*, 1996), and although initially it was believed to be involved in the pathogenesis of diarrhea, most authors have concluded that this toxin may not be a virulence determinant, because it has been commonly isolated from healthy animals as well (Ruan *et al.*, 2012; Zajacova *et al.*, 2013).

However, ETEC and VTEC were more frequently isolated from diarrheic samples than from normal feces, suggesting a possible association between these pathotypes and the emergence of disease in 1-week-old piglets.

The AMR phenotypes of the *E. coli* isolates of this study showed a wide resistance to sulfonamides, tetracyclines and aminopenicillins in both diarrheic and non-diarrheic piglets. High percentages of antimicrobial resistance for amoxicillin and ceftiofur have been

previously reported in pig farms from Catalonia (Mateu & Martín, 2000). However, other studies conducted in other regions of Spain (Sáenz *et al.*, 2001) or in Ireland (Gibbons *et al.*, 2016) reported lower levels of resistance for tetracycline, sulfamethoxazole/trimethoprim, ampicillin and streptomycin. These differences could be explained taking into account that Catalonia is one of the areas with greater density of pigs in Europe, and therefore, likely subjected to a high consumption of antibiotics.

On the other hand, an interesting finding of this study was that *E. coli* isolates from diarrheic cases presented, additionally, extended AMR to quinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin and flumequine) and aminoglycosides (gentamicin and neomycin) compared to healthy pigs. These findings agree with a study performed in Ontario by Boerlin *et al.* (2005), in which they found a consistently higher frequency of resistance in diarrheic isolates as well.

The genotyping study showed that the *E. coli* strain containing the *bla*_{CTX-M} gene presented resistance to third and fourth generation cephalosporins, amoxicillin + clavulanic acid, quinolones and aminoglycosides. The relationship between ESBLs and quinolone resistance mechanisms has been documented by several authors (Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2015; Azargun *et al.*, 2018), and it has been suggested that ESBL genes and plasmid-mediated quinolone resistance are located within the same plasmid (Azargun *et al.*, 2018). Furthermore, strains harbouring the *bla*_{CTX-M} gene presented higher values of phenotypical resistance than those without this gene, mainly to all the tested beta-lactams, quinolones and gentamicin.

Regarding the genotyping of the CTX-M+ strains, all the allelic variants described in this study have previously been reported in pigs (Carattoli, 2008), except for CTX-M-27, which has only been detected in humans and aquatic organisms (Birgy *et al.*, 2017; Bollache *et al.*, 2019).

In the case of colistin, resistance was assessed using two different methods, the disk diffusion method and the MIC test, finding low concordance between both techniques. According to several authors, the disk diffusion method does not seem to be a reliable

method for testing the efficacy of colistin, due to the poor diffusion of polymyxins in agar, and therefore, the use of other alternative tests, such as MICs, is more adequate for testing the susceptibility of colistin (Landman *et al.*, 2008).

In general, the prevalence of colistin-resistant strains reported in Europe is low: 0.9% in Poland (Wasył *et al.*, 2013), 1.5% in France (Perrin-Guyomard *et al.*, 2016), 2.9% in Germany (Irrgang *et al.*, 2016), and 3.7% in Switzerland (Stannarius *et al.*, 2009). These results are in concordance with the 5% of prevalence obtained in this study using the MIC test. Nevertheless, García *et al.* (2018) have recently reported an extremely high prevalence of colistin resistance (77%) in the North-West area of Spain. Variations in animal health management, biosecurity and sanitation procedures in pig production between different regions of the same country could explain this different colistin-resistance prevalence.

Likewise, the prevalence of *E. coli* isolates harbouring the *mcr-1* gene was low (3%) in this study, in agreement with results reported in Germany (Irrgang *et al.*, 2016; Roschanski *et al.*, 2017) and Belgium (Xavier *et al.*, 2016) with prevalence below 10%. Nevertheless, prevalences of 26% and 88% have been published in studies conducted in Spain (García *et al.*, 2018) and France (Delannoy *et al.*, 2017) respectively. Only one *E. coli* isolate of this study presented the *mcr-4* gene whereas the frequency of this gene has been detected in higher percentages in Spanish pig farms, from 37%, (Carattoli *et al.*, 2017) to 73% (García *et al.*, 2018). Regarding other *mcr* genes, none of the isolates of this study was positive for *mcr-2*, *mcr-3* or *mcr-5*. The *mcr-2* gene has been detected in Belgium in porcine and bovine *E. coli* isolates (Xavier *et al.*, 2016), and *mcr-5* in 3.4% of isolates in Spain (García *et al.*, 2018). Up to date, there have been no reports of *mcr-3* in *E. coli* isolates from pigs in Europe.

In summary, the low prevalence of pathogenic *E. coli* strains in neonatal diarrhea outbreaks in Catalonia could be explained by the current vaccination protocols against specific virulence factors of *E. coli* established for the pig production in Spain. In spite of the low prevalence of these pathogenic strains, it is important to remark that ETEC and VTEC were

almost exclusively isolated from diarrheic samples. Also, *E. coli* isolated from diseased piglets showed antimicrobial multi-resistance to β -lactams, tetracyclines, sulphonamides and lincospectin extended to quinolones and aminoglycosides.

Finally, more appropriate diagnostic approaches, including genetic and phenotypic analysis of AMR profiles, should be implemented in animal health to optimize the use of antibiotics for treating diseased animals when necessary and with an effective antimicrobial agent, as the presence of highly resistant strains harbouring ESBL and *mcr* genes circulating in pig farms can represent a potential threat to animal and human health (Morales *et al.*, 2012).

5. Annex

a)

	Resistance genes			Virulence factors genes								Antimicrobial susceptibility																											
	CTX-M	mcr-1	mcr-4	F4	F18	F41	LT	Sta	Stb	eae	EAST1	VT1	VT2	AMP	AMX	AXC	CEFT	CFL	CFQ	CFX	CIP	ENR	FLU	GEN	NEO	STR	APR	TET	DOX	SUL	SXT	FF	CLT	LS					
3																																							
4																																							
5																																							
6																																							
7																																							
8																																							
9																																							
10																																							
11																																							
12																																							
13																																							
14																																							
15																																							
16																																							
17																																							
18																																							
19																																							
20																																							
21																																							
22																																							
23																																							
24																																							
25																																							
26																																							
27																																							
28																																							
29																																							
30																																							
31																																							
32																																							
33																																							
34																																							
35																																							
36																																							
37																																							
38																																							
39																																							
40																																							
41																																							
42																																							
43																																							
44																																							
45																																							
46																																							
47																																							
48																																							
49																																							
50																																							
51																																							
52																																							
53																																							
54																																							
55																																							
56																																							
57																																							
58																																							
59																																							
60																																							
61																																							
62																																							
63																																							
64																																							
65																																							
66																																							
67																																							
68																																							
69																																							
70																																							
71																																							
72																																							
73																																							
74																																							

b)

	Resistance genes			Virulence factors genes								Antimicrobial susceptibility																										
	CTX-M	mcr-1	mcr-4	F4	F18	F41	LT	Sta	Stb	eae	EAST1	VT1	VT2	AMP	AMX	AXC	CEFT	CFL	CFQ	CFX	CIP	ENR	FLU	GEN	NEO	STR	APR	TET	DOX	SUL	SXT	FF	CLT	LS				
1																																						
2																																						
3																																						
4																																						
5																																						
6																																						
7																																						
8																																						
9																																						
10																																						
11																																						
12																																						
13																																						
14																																						
15																																						
16																																						
17																																						
18																																						
19																																						
20																																						
21																																						
22																																						
23																																						
24																																						
25																																						
26																																						
27																																						
28																																						

Annex Figure. Figure showing the genotypic and phenotypic relationships between the presence of antimicrobial resistance genes, virulence factors genes and phenotypic resistance profiles in *E. coli* strains isolated from animals with diarrhea (a, n=94) and apparently healthy animals (b, n=28). AMP= Ampicillin, AMX= Amoxicillin, AXC= Amoxicillin/clavulanic acid, CEFT= Ceftiofur, CFL= Cefalexin, CFQ= Cefquinome, CFX= Ceftriaxone, CIP= Ciprofloxacin, ENR= Enrofloxacin, FLU= Flumequine, GEN= Gentamicin, NEO= Neomycin, STR= Streptomycin, APR= Apramycin, TET= Tetracycline, DOX= Doxycycline, SUL= sulphonamide, SXT= Sulphonamide/trimethoprim, FF= Florfenicol, CLT= Colistina, LS= Lincospectin.

6. Acknowledgements

Our grateful thanks to the participating veterinarians. A. Vidal was supported by a PIF grant from the Universitat Autònoma de Barcelona. L. Aguirre was supported by a Collaboration scholarship from the Ministerio de Educación, Cultura y Deporte from the Spanish government.

7. References

- Angulo, F.J., Nargund, V.N., Chiller, T.C., 2004. Evidence of an association between use of anti-microbial agents in food animals and anti-microbial resistance among bacteria isolated from humans and the human health consequences of such resistance. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* 51, 374-9.
- Arlet, G., Rouveau, M., Philippon, A., 1997. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β -lactamase. *FEMS Microbiol. Lett.* 152, 163-67.
- Azargun, R., Sadeghi, M.R., Soroush Barhaghi, M.H., Samadi Kafil, H., Yeganeh, F., Ahangar Oskouee, M., Ghotaslou, R., 2018. The prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and ESBL-production in Enterobacteriaceae isolated from urinary tract infections. *Infect. Drug Resist.* 11, 1007-14.
- Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-6.
- Birgy, A., Bidet, P., Levy, C., Sobral, E., Cohen, R., Bonacorsi, S., 2017. CTX-M-27-producing *Escherichia coli* of sequence type 131 and clade C1-M27, France. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 885.
- Blanco, M., Blanco, J.E., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, M.P., González, E.A., Bernárdez, M.I., Blanco, J., 2004. Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-xi). *J. Clin. Microbiol.* 42, 645-51.
- Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C.L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S.A., Friendship, R., Archambault, M., 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. *App. Environ. Microbiol.* 71, 6753-61.
- Bollache, L., Bardet, E., Depret, G., Motreuil, S., Neuwirth, C., Moreau, J., Hartmann, A., 2019. Dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* in freshwater fishes from a French watershed (Burgundy). *Front. Microbiol.* 9, 3239.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I., Malorny, B., 2017. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3317-24.

Boyd, D.A, Tyler, S., Christianson, S., McGeer, A., Muller, M.P., Willey, B.M., Bryce, E., Gardam, M., Nordmann, P., Mulvey, M.R., 2004. Complete nucleotide sequence of a 92-Kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48, 3758-64.

Boyen, F., Vangroenweghe, F., Butaye, P., De Graef, E., Castryck, F., Heylen, P., Vanrobaeys, M., Haesebrouck, F., 2010. Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E.coli* strains. *Vet. Mic.* 144, 359-362.

Burow, E., Simoneit, C., Tenhagen, B.A., Käsbohrer, A., 2014. Oral antimicrobials increase antimicrobial resistance. *Prev. Vet. Med.* 113, 364-75.

Carattoli, A., 2008. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 1, 117-23.

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzoti, G., Magistrali, C.F., 2017. Novel plasmid-mediated *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22.

Chan, G., Farzan, A., DeLay, J., McEwen, B., Prescott, J.F., Friendship, R.M., 2013. A retrospective study on the etiological diagnoses of diarrhea in neonatal piglets in Ontario, Canada, between 2001 and 2010. *Can. J. Vet. Res.* 77, 254-60.

DebRoy, C., Maddox, C.W., 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim. Health Res. Rev.* 2, 129-40.

Delannoy, S., Le Devendec, L., Jouy, E., Fach, P., Drider, D., Kempf, I., 2017. Characterization of colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from diseased pigs in France. *Front. Microbiol.* 8, 2278.

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

Fairbrother, J.M., Gyles, C.L., 2012. Colibacillosis. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 723-49.

García, V., García-Meniño, I., Mora, A., Flament- Simon, S.C., Díaz-Jiménez, D., Blanco, J.E., Alonso, M.P., 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). *Int. J. Antimicrob. Agents* 52, 104-08.

Gibbons, J.F., Boland, F., Egan, J., Fanning, S., Markey, B.K., Leonard, F.C., 2016. Antimicrobial resistance of faecal *Escherichia coli* isolates from pig farms with different durations of In-feed antimicrobials use. *Zoonoses Public Health* 63, 241-50.

Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I., Aarestrup, F.M., 2005. β -lactamases among extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J. Antimicrob. Chemother.* 56,115-21.

Imberechts, H., Bertschinger, H.U., Nagy, B., Deprez, P., Pohl, P., 1997. Fimbrial colonization factors F18ab and F18ac of *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea and edema disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412, 175-83.

Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B.A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Zierner, T., Thomas, K., Roesler, U., Käsbohrer, A., 2016. Prevalence of *mcr-1* in *E.coli* from livestock and food in Germany, 2010-2015. *PLoS One* 11, e0159863.

Kibret, M., Abera, B., 2011. Antimicrobial susceptibility patterns of *E.coli* from clinical sources in northeast Ethiopia. *Afr. Health Sci.* 11, 40-45.

Kim, J., Kwon, Y., Pai, H., Kim, J.W., Cho, D.T., 1998. Survey of *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence of SHV-12 and SHV-2a in Korea. *J.Clin. Microbiol.* 36, 1446-49.

Kim, M.H., Lee, H.J., Park, K.S., Suh, J.T., 2010. Molecular characteristics of extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and the prevalence of *qnr* in extended spectrum β -lactamase isolates in a tertiary care hospital in Korea. *Yonsei Med. J.* 51, 768-74.

Kongsted, H., Pedersen, K., Hjulsager, C.K., Larsen, L.E., Pedersen, K.S., Jorsal, E.J., Baekbo, P., 2018. Diarrhoea in neonatal piglets: a case control study on microbiological findings. *Porcine Health Manag.* 4, 17.

Landman, D., Georgescu, C., Martín, A., Quale, J., 2008. Polymyxins revisited. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 449-65.

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., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animal and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161-68.

Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M, Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L., Woodford, N., 2007. CTX-M: changing the face of ESBL in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 165-74.

Mainil, J., 2013. *Escherichia coli* virulence factors. *Vet. Immunopathol.* 152, 2-12.

Martins, M.F., Martinez-Rossi, N.M., Ferreira, A., Brocchi, M., Yano, T., Castro, A.F., Silveira, W.D., 2000. Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. *Vet. Microbiol.* 76, 51-59.

Mateu, E., Martín, M., 2000. Antimicrobial resistance in enteric porcine *Escherichia coli* strains in Spain. *Vet. Rec.* 146, 703-05.

Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C., Segalés, J., 2018. Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhea cases in Spain. *Porcine Health Manag.* 5, 4-5.

Morales, A.S., Fragoso de Araújo, J., de Moura Gomes, V.T., Reis Costa, A.T., dos Prazeres Rodrigues, D., Porfida Ferreira, T.S., de Lima Filsner, P.H., Felizardo, M.R., Micke Moreno, A., 2012. Colistin resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella* entérica strains solated from swine in Brazil. *ScientificWorldJournal* 2012.

Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D.M., 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. *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 242-52.

Ojeniyi, B., Ahrens, P., Meyling, A., 1994. Detection of fimbrial and toxin genes in *Escherichia coli* and their prevalence in piglets with diarrhea. The application of colony hybridization assay, polymerase chain reaction and phenotypic assays. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 41, 49-59.

Olesen, I., Hasman, H., Aarestrup, F.M., 2004. Prevalence of β -lactamases among ampicillin-resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* isolated from food animals in Denmark. *Microb. Drug Resist.* 10, 334-10.

Olive, D.M., 1989. Detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* after polymerase chain reaction amplification with a thermostable DNA polymerase. *J. Clin: Microbiol.* 27, 261-5.

Perrin-Guyomard, A., Bruneau, M., Houée, P., Deleurme, K., Legrandois, P., Poirier, C., Soumet, C., Sanders, P., 2016. Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French Livestock, 2007 to 2014. *Euro Surveill.* 21.

- Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., Nordmann, P., 2011. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 70, 119-23.
- Randall, L.P., Lemma, F., Rogers, J.P., Cheney, T.E.A., Powell, L.F., Teale, C.J., 2014. Prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* from pigs at slaughter in the UK in 2013. *J. Antimicrob. Chemother.* 69, 2947-50.
- Rhouma, M., Beaudry, F., Thériault, W., Letellier, A., 2016. Colistin in pig production: chemistry, mechanisms of antibacterial action, microbial resistance emergence and one health perspectives. *Front. Microbiol.* 7, 1789.
- Robins-Browne, R.M., Holt, K.E., Ingle, D.J., Hocking, D.M., Yang, J., Tauschek, M., 2016. Are *Escherichia coli* pathotypes still relevant in the era of whole-genome sequencing?. *Front Cell Infect. Microbiol.* 6, 141.
- Roschanski, N., Falgenhauer, L., Grobbel, M., Guenther, S., Kreienbrock, L., Imirzalioglu, C., Roesler, U., 2017. Retrospective survey of *mcr-1* and *mcr-2* in German pig-fattening farms, 2011-2012. *Int. J. Antimicrob. Agents* 50, 266-71.
- Ruan, X., Crupper, S.S., Schultz, B.D., Robertson, D.C., Zhang, Z., 2012. *Escherichia coli* expressing EAST1 toxin did not cause an increase of cAMP or cGMP levels in cells, and no diarrhea in 5-day old gnotobiotic piglets. *PLoS One* 7, e43203.
- Sáenz, Y., Zarazaga, M., Briñas, L., Lantero, M., Ruiz-Larrea, F., Torres, C., 2001. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *Int. J. Antimicrob. Agents* 18, 353-58.
- Savarino, S.J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M.K., Levine, M.M., Fasano, A., 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* 173, 1019-22.
- Schwarz, S., Johnson, A.P., 2016. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2066-70.
- Stannarius, C., Bürgi, E., Regula, G., Zychowska, M.A., Zweifel, C., Stephan, R., 2009. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from Swiss weaned pigs and sows. *Schweiz. Arch. Tierheilkd.* 151, 119-25.
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., López, C., González, E.A., Blanco, J., 2007. Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhea in Slovakia. *Vet. J.* 174, 176-87.

- Wang, Y., He, T., Han, J., Wang, J., Foley, S.L., Yang, G., Wan, S., Shen, J., Wu, C., 2012. Prevalence of ESBLs and PMQR genes in fecal *Escherichia coli* isolated from the non-human primates in six zoos in China. *Vet. Mic.* 159, 53-59.
- Wasyl, D., Hoszowski, A., Zajac, M., Szulowski, K., 2013. Antimicrobial resistance un commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Front. Microbiol.* 4, 221.
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro. Surveill.* 21.
- Yamamoto, T., Nakazawa, M., 1997. Detection and sequences of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 35, 223-27.
- Yang, Q.E., Sun, J., Li, L., Deng, H., Liu, B.T., Fang, L.X., Liao, X.P., Liu, Y.H., 2015. IncF plasmid diversity in multi-drug resistant *Escherichia coli* strains from animals in China. *Front. Microbiol.* 6, 964.
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J., Wang, Y., 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *Am. Soc. Microbiol.* 8:e00543-17.
- Zajacova, Z.S., Faldyna, M., Kulich, P., Kummer, V., Maskova, J., Alexa, P., 2013. Experimental infection of gnotobiotic piglets with *Escherichia coli* strains positive for EAST1 and AIDA. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 176-82.

PART III: DISCUSSIÓ GENERAL I
CONCLUSIONS

DISCUSSIÓ GENERAL

La diarrea neonatal és un problema comú i inevitable en les granges de porcí d'arreu del món. Molts factors, infecciosos i no-infecciosos, intervenen en l'aparició del quadre diarreic. Si bé els factors intrínsecs de la granja, com la higiene, el maneig dels animals o els aspectes nutricionals, tenen importància en les malalties gastrointestinals, la causa més desencadenant de la diarrea sol ser de naturalesa infecciosa (Holland, 1990). La interacció d'un o més patògens amb els factors ambientals i les característiques individuals de l'hoste fa que el diagnòstic i el control de la malaltia siguin complexos. Per altra banda, malgrat que un patògen sigui detectat microbiològicament o molecularment no implica que aquest estigui participant en la diarrea, ja que alguns dels patògens entèrics més freqüents poden formar part de la microbiota normal de l'animal (Baker *et al.*, 2010; Bien *et al.*, 2013; Conway & Cohen, 2015).

A Catalunya, el model de producció porcina predominant és intensiu, que té com a objectiu maximitzar la producció minimitzant els costos econòmics. L'elevada densitat d'animals dins d'una granja afavoreix el contagi de patògens entèrics, i la manca de neteja i desinfecció entre lots d'animals afavoreix també la persistència d'agents infecciosos a la granja (Neumann, 2012). A més, altres praxis habituals, com la barreja d'animals de diferents orígens o, en el cas dels garrins, de realitzar "adopcions" i canviar un garrí nounat de covada, poden facilitar la disseminació de patògens dins la granja. Com a resultat, les diarrees són freqüents en totes les edats, però tenen especial importància en garrins lactants ja que poden resultar letals.

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat avaluar quins patògens estan involucrats en brots de diarrea neonatal porcina i quins factors poden influir en la seva aparició. Els factors decisius per dur a terme aquest objectiu van ser per una banda la recollida de mostres i per l'altre disposar d'un panell de diagnòstic el més ampli possible.

Es va establir un protocol de mostreig en granges amb brots de diarrea neonatal, i es va demanar la participació de veterinaris clínics de porcí, per tal d'obtenir les mostres per l'estudi. En aquest protocol s'especificava el tipus de mostres, nombre i edat dels animals a

estudiar. A l'hora d'enviar les mostres, es va demanar al veterinari clínic que indiqués la presència o absència de diarrea en cada cas, així com també altres dades, com informació en relació al brot actual, pautes de vacunacions i tractaments antibiòtics, entre d'altres.

Quant al tipus de mostra, es van recollir femtes de cada garrí en un pot estèril o bé amb hisops rectals. Aquest tipus de mostra presenta diversos avantatges: s'obtenen de manera no invasiva, senzilla, ràpida i econòmica. Segons Gramer *et al.* (2005) per a la detecció de patògens entèrics la mostra òptima inclou el paquet intestinal, que permet un anàlisi complet tant microbiològic com histopatològic. En aquest estudi no hem disposat de cadàvers d'animals afectats per diarrea, per tant hem treballat exclusivament amb la mostra clínic de femtes. Això ens ha suposat perdre informació sobre les lesions relacionades amb els patògens detectats, però en condicions normals les diarrees no sempre produeixen letalitat i en molts dels estudis de prevalença es treballa amb mostres de femtes per fer el diagnòstic (Lippke *et al.*, 2011; Knight *et al.*, 2015; Dors *et al.*, 2016; Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018).

El mostreig a cada granja incloïa 10 animals amb diarrea i 5 animals aparentment sans. En algunes granges això no va ser possible i, o bé es van mostrejar menys animals, o bé només es van mostrejar els animals amb diarrea.

Per tal de decidir quins patògens havien de formar part del panell de diagnòstic, es va revisar a la bibliografia quins eren els agents més freqüentment involucrats en els brots de diarrea neonatal porcina (Hooper & Haelterman, 1969; Álvarez-Pérez *et al.*, 2009; Baker *et al.*, 2010; Marthaler *et al.*, 2014; Carvajal *et al.*, 2015; Luppi, 2017). Finalment, aquest panell diagnòstic va incloure els següents microorganismes: Rotavirus A, B i C (RVA, RVB, RVC), virus de la diarrea epidèmica porcina (PEDV), virus de la gastroenteritis porcina (TGEV), *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* de tipus A i C, i *Clostridium difficile*. Malgrat haver seleccionat els patògens que van ser considerats més rellevants, és cert que no és possible descartar que en algun dels brots analitzats, la causa primària no fos cap de les estudiades, sinó que es tractés d'algun altre agent infeccios o d'alguna causa no infecciosa.

Idealment, les mostres s'havien d'agafar d'animals que no haguessin rebut tractament antibiòtic per tal de no interferir en els resultats microbiològics (Harris *et al.*, 2017). No obstant, els casos sovint eren brots de diarrea recurrent que abans d'enviar les mostres s'havien intentat aturar utilitzant antibiòtics, segons indicaven els veterinaris clínics. És possible que els resultats de l'aïllament microbiològic presentin un biaix degut a la pressió dels antibiòtics utilitzats sobre la microbiota. D'altra banda, aquest factor té menys importància en el cas dels agents vírics.

En relació a les tècniques utilitzades, totes elles es van posar a punt al laboratori seguint les pautes descrites prèviament (Persson *et al.*, 2008; Van Asten *et al.*, 2009; Toledo *et al.*, 2012; Marthaler *et al.*, 2014b; Masuda *et al.*, 2016). Aquest panell va permetre agrupar el diagnòstic de diferents patògens obtenint resultats en una mitjana de 3 dies des de la recepció de les mostres. Donat que el processament microbiològic és d'entre 24-48 hores, el temps invertit en el diagnòstic es podria reduir substituint el cultiu bacterià per tècniques moleculars. No obstant, l'aïllament de les diferents soques bacterianes és indispensable per realitzar els estudis de resistència antimicrobiana que permeten donar orientacions terapèutiques. En el nostre estudi, es van realitzar antibiogrames qualitius i quantitius de 122 soques d'*E. coli* i es van poder determinar els perfils de resistència antimicrobiana.

Els patògens més prevalents van ser *C. perfringens* tipus A i rotavirus A. La toxina EAST1 d'*E. coli* també es va detectar en un 57% de les mostres de diarrea, encara que el seu rol com a causa de diarrea neonatal no està ben definit (Zajacova *et al.*, 2012). Quan es va comparar la prevalença dels agents estudiats entre els casos de diarrea i els controls de cada granja, només en el cas de rotavirus A es van observar diferències significatives entre els dos grups. Aquests resultats estan en la línia dels obtinguts recentment a Dinamarca per Kongsted *et al.* (2018), on també van trobar diferències estadístiques pel que fa a RVA entre els grups diarrea i control. Anteriorment, Halaihel *et al.* (2009) ja havien detectat diferències significatives a Espanya relacionades amb la consistència fecal dels animals estudiats, considerant que RVA es detectava fins a cinc vegades més en femtes de consistència líquida que en femtes sòlides. Malgrat aquests resultats, la detecció de RVA en garrins amb i sense diarrea és freqüent arreu (Otto *et al.*, 2015; Theuns *et al.*, 2016;

Vlasova *et al.*, 2017) i, en alguns estudis, la detecció de RVA en animals diarreics i animals aparentment sans és molt similar (Amimo *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2016).

Els resultats respecte RVA obtinguts en el primer estudi van conduir a l'estudi II, en què es van caracteritzar 24 soques d'aquest microorganisme. Aquest estudi tenia com a objectiu establir les relacions filogenètiques entre les soques de RVA aïllades i determinar si existien relacions entre els brots estudiats. Les dades obtingudes en aquest estudi van concloure que probablement s'havia produït una introducció d'una nova soca no present a Catalunya, i contra la qual els animals no tenien cap immunitat. És raonable pensar que, tenint en compte els genotips de VP4 i VP7 majoritàriament trobats en les mostres, aquesta soca inicial presentés un genotip G9P23. En un estudi conduït per Midgley *et al.*, (2012) es van genotipar soques de RVA obtingudes a Espanya entre els anys 2005 i 2006, i es va observar que el genotip de VP7 més freqüent (33%) era G9, però el més freqüent de VP4 era P8. De fet, en aquest estudi, l'única soca G9P23 s'aïlla en una granja danesa. El genotip G9P23 també ha estat detectat a Taiwan (Wu *et al.*, 2017), Tailàndia (Tuanthap *et al.*, 2019) i Bèlgica (Theuns *et al.*, 2015). Una possible teoria sobre l'origen d'aquesta soca seria precisament que hagués estat importada d'algun dels països europeus on ha estat detectada anteriorment, com ara Bèlgica o Dinamarca.

Malgrat que RVA fos l'únic agent correlacionat amb la diarrea, la co-presència d'altres microorganismes probablement juga un paper important en la majoria de brots. És important remarcar que en tots els brots analitzats es va detectar més d'un patògen. Aquest fet no és sorprenent, tenint en compte que els agents bacterians estudiats (*E. coli*, *C. perfringens* i *C. difficile*) són habitants de la microbiota normal i no totes les soques són patògenes. Tot i així, no és possible conèixer el paper que puguin tenir aquests bacteris com a patògens secundaris en els quadres de diarrea analitzats. En el cas de *C. perfringens*, detectat en tots els brots d'aquest estudi, gairebé totes les soques es classifiquen com a tipus A. L'alta prevalença de la toxina α en garrins lactants sans i la manca de lesions a nivell histopatològic descrites en la literatura (Songer *et al.*, 2005) condueixen a pensar que probablement CpA no té capacitat patogènica o, si la té, es desconeix quines són les condicions necessàries pel desenvolupament de la diarrea. Per contra, el poder patògen de

CpC està ben descrit (Autheman *et al.*, 2013) i, malgrat que en aquest estudi va ser aïllat en dues granges, actualment és poc freqüent que es donin brots de CpC a Espanya gràcies a les rutines vacunals establertes (Schäffer *et al.*, 2012). Pel que fa a *C. difficile* toxigènic, la seva capacitat de causar diarrea neonatal està ben descrita (Abt *et al.*, 2016). La prevalença per animal observada en l'estudi I de les dues toxines ha estat al voltant del 30%, tot i que el 80% de les granges analitzades ha resultat positiva. En la comparació de prevalències generals entre els grups diarrea i sans no s'han trobat diferències significatives, fet que *a priori* podria suggerir que la detecció de toxines de *C. difficile* és insuficient per a poder establir-lo com a agent causal de la diarrea. Malgrat això, en la comparativa entre casos i controls en cada granja, aquesta afirmació no és tan clara ja que, en algunes granges, sobretot en aquelles on no s'ha detectat RVA, *C. Difficile* toxigènic podria estar associat a l'aparició de diarrea. En qualsevol cas, per tal de corroborar la implicació de *C. difficile* toxigènic es requereix confirmació histopatològica.

Escherichia coli, i principalment les soques enterotoxigèniques (ETEC), s'ha definit sempre com un dels causants habituals de diarrea en garrins, encara que l'aplicació de vacunes dirigides sobretot a les fimbries d'*E. coli* administrades a les truges n'ha disminuït la incidència notablement (Dubreuil *et al.*, 2016). En aquest estudi, la prevalença d'*E. coli* patogènic ha estat del 26%, superior respecte als estudis publicats en els últims anys per diversos autors (Larsson *et al.*, 2015; Mesonero-Escuredo *et al.*, 2018). Tot i que el percentatge d'ETEC (12%) i *E. coli* verotoxigènic (VTEC) (4%) ha estat baix, aquests patotips s'han aïllat gairebé exclusivament d'animals amb diarrea. En canvi, *E. coli* enteropatogènic (EPEC) s'ha trobat tant en animals amb diarrea com en sans i no s'ha trobat cap relació causal amb l'aparició de diarrea. També contrasta que el patotipus aïllat amb més freqüència ha estat precisament EPEC. EPEC es descriu amb major freqüència en diarrees d'animals deslletats (Luppi, 2017), tot i que ha estat descrit en alguna ocasió com a causant de diarrees neonatals (Alustiza *et al.*, 2012). Cal remarcar que la detecció del gen de la intimina, que determina el patotipus EPEC, en els animals d'aquest estudi no implica que EPEC els estigui causant diarrea, donat que el gen es troba tant en animals diarreics com

sans. En general, la presència de gens de virulència en una soca no implica que la soca en qüestió sigui patògena, sinó que té el potencial per ser-ho (Relman, 2003).

La detecció dels coronavirus entèrics analitzats ha estat baixa. El virus de la diarrea epidèmica porcina (PEDV) va provocar brots de diarrea neonatal arreu d'Europa durant la següent dècada dels 80. A partir dels anys 90, el nombre de brots de diarrea ocasionats pel PEDV va disminuir i, des d'aleshores, sols s'han produït casos puntuals a Europa (Carvajal *et al.*, 2015). Per contra, a l'Àsia, els brots de diarrea causats per PEDV són freqüents i provocats per soques que cursen amb més virulència que les europees. A Amèrica, s'han detectat dos tipus de soques: un primer grup, semblant a les soques asiàtiques, que provoquen brots de diarrea severes, i un segon tipus, que ocasiona brots més lleus (Carvajal *et al.*, 2015). El 2014 es van produir brots puntuals de diarrea per PEDV a Alemanya, França i Bèlgica, entre altres països, que presentaven una particularitat respecte els anteriors, i és que, en aquests casos, estaven ocasionats per soques de PEDV similars a les soques americanes de baixa virulència. Només a Ucraïna s'han detectat soques de PEDV considerades altament virulentes (Lee, 2015).

El PEDV ha estat detectat en només cinc de les mostres analitzades, provinents de quatre granges diferents, en què podríem considerar que el virus es manté de forma endèmica a nivells molt baixos, ja que només s'ha detectat en un o dos animals. Tot i això, tenint en compte la possible entrada de soques virulentes provinents d'Àsia i Amèrica, seria interessant analitzar les seqüències de les soques d'aquest estudi.

L'altre coronavirus implicat en les diarrees neonatals porcines és el virus de la gastroenteritis transmissible. Actualment és molt infreqüent trobar brots de diarrea per aquest virus, des de l'aparició als anys 80 d'una variant, el coronavirus respiratori porcí (PRCV), amb el que es va observar la reducció dels casos de TGE, probablement per immunitat creuada entre els dos virus.

Pel que fa a la detecció de TGEV, la PCR utilitzada en aquest estudi no permet diferenciar entre aquest virus i el PRCV, i per tant aquests resultats s'haurien de verificar.

Per altra banda, en aquelles granges on no s'ha observat que RVA sigui l'agent causal del brot de diarrea s'hi ha trobat altres agents etiològics que podrien estar provocant la diarrea, com *E. coli* patogènic, *C. difficile* toxigènic o altres rotavirus.

Finalment, l'objectiu del tercer estudi d'aquesta tesi va ser la caracterització de resistències antimicrobianes en soques d'*E. coli* obtingudes del primer estudi, tant a nivell fenotípic com genotípic. L'augment de les resistències antimicrobianes es considera una amenaça a la salut pública: l'any 2007 es van estimar a Europa 400.000 infeccions i 25.000 persones mortes causades per les bacteries multiresistents (AMR) més freqüents (ECDC/EMEA, 2009), i es preveu que l'any 2050, el nombre de morts per aquesta causa pot arribar a 10 milions de persones (de Kraker *et al.*, 2016).

Els resultats obtinguts en l'estudi III indiquen un alt percentatge de resistència a diverses famílies d'antimicrobians. Es van estudiar els perfils de resistència front a 21 antibiòtics diferents. El criteri d'elecció dels antibiòtics a testar van ser tres: que s'utilitzessin en veterinària, que estiguessin indicats per infeccions gastrointestinals i que presentessin activitat contra *E. coli*. Els resultats fenotípics de resistència obtinguts mitjançant el mètode qualitatiu de difusió de disc van mostrar alts nivells de resistència de les soques d'*E. coli* a famílies d'antibiòtics utilitzades habitualment en veterinària i medicina humana, com les sulfonamides, les tetraciclins i les aminopenicil·lins. A nivell genotípic, es van analitzar determinats gens de resistència als beta-lactàmics i a la colistina. L'elecció dels gens de resistència als beta-lactàmics a analitzar es va fer basant-nos en aquells descrits en la bibliografia com a rellevants en porcí (Shin *et al.*, 2017; Biasino *et al.*, 2018). Es van triar els gens *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CMY} (incloent les variants CMY-1 i CMY-2) i *bla*_{OXA}. Pel que fa a la colistina, es va investigar la presència de les 5 variants del gen *mcr* documentades fins al moment, malgrat que alguna d'aquestes variants no ha estat mai detectada en l'espècie porcina.

Quant als beta-lactàmics, l'únic gen detectat en l'estudi va ser *bla*_{CTX-M}, del qual els genotips més freqüents van ser CTX-M-14 seguit de CTX-M-1 i CTX-M-15 i finalment, altres genotips (CTX-M-3, CTX-M-27 i CTX-M-32). Tots els genotips anteriors s'han descrit en porcs, segons

una revisió de Carattoli (2008), excepte CTX-M-27, que havia estat descrits en humans i en peixos d'aigua dolça (Birgy *et al.*, 2017; Bollache *et al.*, 2019). Pel que fa als altres gens, no es va detectar cap mostra positiva a SHV, TEM, CMY1, CMY2 ni a OXA. Els gens SHV i TEM han estat detectats amb relativa freqüència en aïllats d'*E. coli* provinents d'animals de producció, especialment d'aus (Liakopoulos *et al.*, 2016).

Un fet rellevant ha estat la co-resistència fenotípica que presenten les soques portadores de bla_{CTX-M} a altres famílies d'antimicrobians, especialment a les quinolones. Fins l'actualitat, s'han detectat una gran quantitat de gens relacionats amb la resistència a la gran majoria de famílies d'antimicrobians. Si bé ens hem centrat en la presència de beta-lactamases d'espectre estès (BLEE), la gran majoria dels aïllats analitzats en l'estudi III presentaven resistència a antimicrobians de tres o més famílies. No és inusual que els microorganismes productors de BLEE presentin resistències a altres famílies d'antimicrobians, ja que els gens de resistència als beta-lactàmics i a altres antibiòtics es troben sovint al plasmidi (Pakzad *et al.*, 2011; Zurfluh *et al.*, 2014).

L'últim punt rellevant del tercer estudi va ser la detecció del gen de resistència a la colistina *mcr-1*. La família d'antimicrobians de les polimixines, entre elles la colistina, s'utilitza molt freqüentment en medicina veterinària, especialment pel tractament de diarrees causades per enterobactèries en animals joves. En medicina humana, degut als efectes nefrotòxics i neurotòxics, no és tan habitual. Malauradament, l'augment en els últims anys de bacteris multi-resistents han fet que la colistina s'utilitzi de forma parenteral en aquells casos en què les opcions de tractament són limitades (Skov & Monnet, 2016; Forde *et al.*, 2018). Les polimixines tenien l'avantatge que presentaven nivells de resistència molt baixos, ja que l'únic mecanisme de resistència conegut per a aquest grup d'antibiòtics depenia de mutacions puntuals en gens concrets de l'ADN cromosòmic. L'any 2015, Liu *et al.* (2016) van descobrir un gen, *mcr-1*, que conferia resistència a la colistina. Aquest gen es localitza en un plasmidi, de manera que es transmet de manera eficient en poblacions bacterianes. Estudis posteriors han reportat la presència de *mcr-1* en soques bacterianes a tot el món (Skov & Monnet, 2016; Ellem *et al.*, 2017). Posteriorment, s'han

descriu altres gens de resistència a la colistina (*mcr-2* a *mcr-5*) (Xavier *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2017; Carattoli *et al.*, 2017; Borowiak *et al.*, 2017)

La prevalença de soques d'*E. coli* portadores dels gens *mcr* en l'estudi III va ser baixa, però és tanmateix preocupant: malgrat que només una de les quatre soques *mcr-1*⁺ presentava resistència fenotípica a la colistina, aquests microorganismes són capaços de transmetre, a través d'un plasmidi, els gens de resistència a altres poblacions de bacteris.

La detecció d'aquestes soques multi-resistents en animals de producció, portadores de gens de resistència, indiquen que aquests animals poden constituir un risc per a la salut humana en cas que aquestes soques arribin a la cadena alimentària.

En conjunt, els resultats d'aquesta tesi poden contribuir a aportar informació sobre la importància que prenen determinats agents infecciosos en els brots de diarrea neonatal presents a Catalunya

Tenint en compte els resultats obtinguts en els estudis que formen part d'aquesta tesi, i tot i que l'estudi de brots de diarrea neonatal és complex a nivell de diagnòstic, aquestes observacions es podrien complementar, en un futur, amb investigacions enfocades a portar informació a diferents nivells, com ara la presència i interacció de patògens a nivells de granja, l'efectivitat de les pautes de vacunació o l'eficiència dels tractaments amb la finalitat de posar a punt un protocol d'actuació adequat en cas de brot de diarrea neonatal

CONCLUSIONS

1. En tots els brots de diarrea neonatal porcina estudiats es va detectar més d'un patògen, sent la combinació més freqüent la co-infecció rotavirus A, *C. difficile*, *E. coli* i *C. perfringens* tipus A. La majoria d'aquests agents infecciosos però, es van detectar tant en animals malalts com en sans.
2. Rotavirus A va ser detectat com l'agent causal més probable en la majoria dels brots de diarrea neonatal a Catalunya entre 2017 i 2018.
3. En els pocs casos on RVA no es va poder identificar com a agent causal de la diarrea, *E. coli* patogènics (ETEC i VTEC), *C. difficile* toxigènic o altres rotavirus podrien ser la causa del brot.
4. En el diagnòstic dels brots de diarrea neonatal s'ha d'incloure el mostreig d'animals amb diarrea i sense, i enfocat a un panell d'agents etiològics el més ampli possible.
5. La detecció d'un mateix genotip de RVA a la majoria de granges positives a aquest virus analitzades, i el fet que totes elles derivin d'una mateixa branca filogenètica suggereix una introducció l'any 2016 d'una soca fins aleshores inexistent a Catalunya amb una ràpida disseminació entre la població porcina.
6. Les soques d'*Escherichia coli* aïllades de la femta dels garrins estudiats presenten un fenotip de multi-resistència antimicrobiana front a la majoria de famílies d'antimicrobians utilitzades de forma habitual en la clínica porcina. Els aïllats obtinguts de mostres de garrins amb diarrea presentaven un nivell de resistència ampliat a les quinolones i als aminoglicòsids respecte dels animals sans.
7. Els gens de resistència transmissibles front a beta-lactàmics i a colistina, es poden trobar en soques d'*E. coli* aïllades tant d'animals amb diarrea com sense en una mateixa granja. Per tant, la presència d'aquestes soques resistents no està relacionada necessàriament a l'aparició de malaltia però són un bon indicador de l'estat de les resistències antimicrobianes.

BIBLIOGRAFIA DISCUSSIÓ

Abt, M.C., McKenney, P.T., Pamer, E.G., 2016. Clostridium difficile colitis: pathogenesis and host defence. *Nat. Rev. Microbiol.* 14, 609-20.

Álvarez-Pérez, S., Blanco, J.L., Bouza, E., Alba, P., Gibert, X., Maldonado, J., Garcia, M.E., 2009. Prevalence of Clostridium difficile in diarrhoeic and non-diarrhoeic piglets. *Vet. Microbiol.* 137,302-5.

Alustiza, F.E., Picco, N.Y., Bellingeri, R.V., Terzolo, H.R., Vivas, A.B., 2012. Frequency of virulence genes of Escherichia coli among newborn piglets from an intensive pig farm in Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 44, 250-54.

Amimo, J.O., Vlasova, A.N., Saif, L.J., 2013. Detection and genetic diversity of porcine group A rotaviruses in historic (2004) and recent (2011 and 2012) swine fecal samples in Ohio: predominance of the G9P[13] genotype in nursing piglets. *J. Clin. Microbiol.* 51,1142-51.

Autheman, D., Wyder, M., Popoff, M., D'Herde, K., Christen, S., Posthaus, H., 2013. Clostridium perfringens beta-toxin induces necrostatin-inhibitable, calpain-dependent necrosis in primary porcine endothelial cells. *PloS One*, 8, e64644.

Baker, A.A., Davis, E., Rehberger, T., Rosener, D., 2010. Prevalence and diversity of toxigenic Clostridium perfringens and Clostridium difficile among swine herds in the midwest. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2961-67.

Biasino, W., De Zutter, L., Garcia-Graells, C., Uyttendaele, M., Botteldoorn, N., Gowda, T., Van Damme, I., 2018. Quantification, distribution and diversity of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli on freshly slaughtered pig carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 281, 32-35.

Bien, J., Palagani, V., Bozko, P., 2013. The intestinal microbiota dysbiosis and Clostridium difficile infection: is there a relationship with inflammatory bowel disease? *Therap. Adv. Gastroenterol.* 6, 53-68.

Birgy, A., Bidet, P., Levy, C., Sobral, E., Cohen, R., Bonacorsi, S., 2017. CTX-M-27-producing Escherichia coli of sequence type 131 and clade C1-M27, France. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 885.

Bollache, L., Bardet, E., Depret, G., Motreuil, S., Neuwirth, C., Moreau, J., Hartmann, A., 2019. Dissemination of CTX-M-producing Escherichia coli in freshwater fishes from a French watershed (Burgundy). *Front. Microbiol.* 9, 3239.

Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I., Malorny, B., 2017. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *J. Antimicrob. Chemother.* 72, 3317-24.

Carattoli A., 2008. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin. Microbiol. Infect.* 14 Suppl 1, 117-23.

Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A., Pezzoti, G., Magistrali, C.F., 2017. Novel plasmid-mediated *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro Surveill.* 22.

Carvajal, A., Argüello, H., Martínez-Lobo, F.J., Costillas, S., Miranda, R., de Nova P.J.G., Rubio, P., 2015. Porcine epidemic diarrhoea: new insights into an old disease. *Porcine Health Manag.* 1, 12.

Conway, T., Cohen, P.S., 2015. Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Metabolism in the Gut. *Microbiol. Spectr.* 3.

Dors, A., Czyżewska-Dors, E., Wasyl, D., Pomorska-Mól, M., 2016. Prevalence and factors associated with the occurrence of bacterial enteropathogens in suckling piglets in farrow-to-finish herds. *Vet. Rec.* 179, 598.

Dubreuil, J.D., Isaacson, R.E., Schifferli, D.M., 2016. Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal. Plus* 7.

ECDC/EMA, European Centre for Disease Prevention and Control/ European Medicines Agency, 2009. The bacterial challenge: time to react. A call to narrow the gap between multidrug-resistant bacteria in the EU and the development of new antibacterial agents. Stockholm, Sweden. ECDC.

Ellem, J.A., Ginn, A.N., Chen, S.C., Ferguson, J., Partridge, S.R., Iredell, J.R., 2017. Locally acquired *mcr-1* in *Escherichia coli*, Australia, 2011 and 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1160-63.

Forde, B.M., Zowawi, H.M., Harris, P.N.A., Roberts, L., Ibrahim, E., Shaikh, N., Deshmukh, A., Sid Ahmed, M.A., Al Maslamani, M., Cottrell, K., Trembizki, E., Sundac, L., Yu, H.H., Li, J., Schembri, M.A., Whiley, D.M., Paterson, D.L., Beatson, S.A., 2018. Discovery of *mcr-1*-mediated colistin resistance in a highly virulent *Escherichia coli* lineage. *mSphere.* 3.

Gramer, M., Rossow, K., Torrison, J.A., 2005. A guide to porcine sample submission and diagnostic tests. University of Minnesota Veterinary Diagnostic Laboratory.

Halaihel, N., Masía, R.M., Fernández-Jiménez, M., Ribes, J.M., Montava, R., De Blas, I., Gironés, O., Alonso, J.L., Buesa, J., 2010. Enteric calicivirus and rotavirus infections in domestic pigs. *Epidemiol. Infect.* 138, 542-48.

Harris, A.M., Bramley, A.M., Jain, S., Arnold, S.R., Ampofo, K., Self, W.H., Williams, D.J., Anderson, E.J., Grijalva, C.G., McCullers, J.A., Pavia, A.T., Wunderink, R.G., Edwards, K.M., Winchell, J.M., Hicks, L.A., 2017. Influence of antibiotics on the detection of bacteria by culture-Based and culture-independent diagnostic tests in patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *Open. Forum Infect. Dis.* 4.

Holland, R.E., 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. *Clin. Microbiol. Rev.* 3, 345-75.

Hooper, B.E., Haelterman, E.O., 1969. Lesions of the gastrointestinal tract of pigs infected with transmissible gastroenteritis. *Can. J. Comp. Med.* 33, 29-36.

Knight, D.R., Squire, M.M., Riley, T.V., 2015. Nationwide surveillance study of *Clostridium difficile* in Australian neonatal pigs shows high prevalence and heterogeneity of PCR ribotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 119-23.

Kongsted, H., Pedersen, K., Hjulsager, 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. *Porcine Health Manag.* 4,17.

de Kraker, M.E., Stewardson, A.J., Harbarth, S., 2016. Will 10 Million People Die a Year due to Antimicrobial Resistance by 2050? *PLoS Med.* 13:e1002184.

Larsson, J., Aspán, A., Lindberg, R., Grandon, R., Båverud, V., Fall, N., Jacobson, M., 2015. Pathological and bacteriological characterization of neonatal porcine diarrhoea of uncertain aetiology. *J. Med. Microbiol.* 64, 916-26.

Lee, C., 2015. Porcine epidemic diarrhea virus: An emerging and re-emerging epizootic swine virus. *Viol. J.* 12, 193.

Liakopoulos, A., Mevius, D., Ceccarelli, D., 2016. A Review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front. Microbiol.* 7, 1374.

Lippke, R.T., Borowski, S.M., Marques, S.M.T., Paesi, S.O., Almeida, L.L., Moreno, A.M., Zlotowski, P., Corbellini, L.G., Barcellos, D.E.S.N., 2011. Matched case-control study evaluating the frequency of the main agents associated with neonatal diarrhea in piglets. *Pesq. Vet. Bras.* 31, 505-10.

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., Shen, J., 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animal and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16, 161-68.

Luppi, A., 2017. Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance. *Porcine Health Manag.* 3, 16.

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.

Masuda, T., Tsuchiaka, S., Ashiba, T., Yamasato, H., Fukunari, K., Omatsu, T., Furuya, T., Shirai, J., Mizutani, T., Nagai, M., 2016. Development of one-step real-time reverse transcriptase-PCR-based assays for the rapid and simultaneous detection of four viruses causing porcine diarrhea. *Jpn. J. Vet. Res.* 64, 5-14.

Mesonero-Escuredo, S., Strutzberg-Minder, K., Casanovas, C., Segalés, J., 2018. Viral and bacterial investigations on the aetiology of recurrent pig neonatal diarrhea cases in Spain. *Porcine Health Manag.* 5, 4-5.

Midgley, S.E., Bányai, K., Buesa, J., Halaihel, N., Hjulsager, C.K., Jakab, F., Kaplon, J., Larsen, L.E., Monini, M., Poljšak-Prijatelj, M., Pothier, P., Ruggeri, F.M., Steyer, A., Koopmans, M., Böttiger, B., 2012. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet. Microbiol.* 156, 238-45.

Neumann, E.J., 2012. Disease transmission and biosecurity. In: Zimmerman, J.J., Karriker, L.A., Ramirez, A., Schwartz, K.J., Stevenson, G.W. (eds.), *Diseases of swine*. Hoboken, USA. Wiley-Blackwell, 923-37.

Otto, P.H., Rosenhain, S., Elschner, M.C., Hotzel, H., Machnowska, P., Trojnar, E., Hoffmann, K., Johne, R., 2015. Detection of rotavirus species A, B and C in domestic mammalian animals with diarrhea and genotyping of bovine species A rotavirus strains. *Vet. Microbiol.* 179, 168-76.

Pakzad, I., Ghafourian, S., Taherikalani, M., Sadeghifard, N., Abtahi, H., Rahbar, M., Mansory Jamshidi, N., 2011. qnr prevalence in extended spectrum Beta-lactamases (ESBLs) and none-ESBLs producing *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in central of Iran. *Iran J. Basic Med. Sci.* 14, 458-64.

Persson, S., Torpdahl, M., Olsen, K.E., 2008. New multiplex PCR method for the detection of *Clostridium difficile* toxin A (tcdA) and toxin B (tcdB) and the binary toxin (cdtA/cdtB) genes applied to a Danish strain collection. *Clin. Microbiol. Infect.* 14, 1057-64.

Relman, D.A., 2003. Appendix C: Pathogen discovery, detection and diagnostics. In: Smolinski, M.S., Hamburg, M.A., Lederberg, J. (eds.), *Microbial threats to health: emergence, detection and response*. Washington, D.C., USA. The National Academies Press, 313-29.

Ruiz, V.L., Bersano, J.G., Carvalho, A.F., Catroxo, M.H., Chiebao, D.P., Gregori, F., Miyashiro, S., Nassar, A.F., Oliveira, T.M., Ogata, R.A., Scarcelli, E.P., Tonietti, P.O., 2016. Case-control study of pathogens involved in piglet diarrhea. *BMC Res. Notes* 9, 22.

Schäfer, K., Wyder, M., Gobeli, S., Candi, A., Doherr, M.G., Zehnder, B., Zimmermann, W., Posthaus, H., 2012. Detection of *Clostridium perfringens* type C in pig herds following disease outbreak and subsequent vaccination. *Vet. Rec.* 171, 503.

Shin, S.W., Jung, M., Won, H.G., Belaynehe, K.M., Yoon, I.J., Yoo, H.S., 2017. Characteristics of transmissible CTX-M- and CMY-Type β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* isolates collected from pig and chicken farms in South Korea. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 1716-23.

Skov, R.L., Monnet, D.L., 2016. Plasmid-mediated colistin resistance (mcr-1 gene): three months later, the story unfolds. *Euro Surveill.* 21:30155.

Songer, J.G., Uzal, F.A., 2005. Clostridial enteric infections in pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 17, 528-36.

Theuns, S., Heylen, E., Zeller, M., Roukaerts, I.D., Desmarests, L.M., Van Ranst, M., Nauwynck, H.J., Matthijnsens, J., 2015. Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. *J. Virol.* 89, 1043-57.

Theuns, S., Vyt, P., Desmarests, L.M.B., Roukaerts, I.D.M., Heylen, E., Zeller, M., Matthijnsens, J., Nauwynck, H.J., 2016. Presence and characterization of pig group A and C rotaviruses in feces of Belgian diarrheic suckling piglets. *Virus Res.* 213, 172-83.

Toledo, A., Gómez, D., Cruz, C., Carreón, R., López, J., Giono, S., Castro, A.M., 2012. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from piglets in the suckling and weaning period in Mexico. *J. Med. Virol.* 61, 148-56.

Tuanthap, S., Vongpunsawad, S., Luengyosuechakul, S., Sakkaew, P., Theamboonlers, A., Amonsin, A., Poovorawan, Y., 2019. Genome constellations of 24 porcine rotavirus group A

strains circulating on commercial Thai swine farms between 2011 and 2016. PLoS One. 2019 14:e0211002.

Van Asten, A.J., van der Wiel, C.W., Nikolaou, G., Houwers, D.J., Gröne, A., 2009. A multiplex PCR for toxin typing of *Clostridium perfringens* isolates. Vet. Microbiol. 136, 411-12.

Vlasova, A.N., Amimo, J.O., Saif, L.J., 2017. Porcine Rotaviruses: Epidemiology, Immune Responses and Control Strategies. Viruses 9, E48.

Wu, F.T., Bányai, K., Jiang, B., Liu, L.T., Marton, S., Huang, Y.C., Huang, L.M., Liao, M.H., Hsiung, C.A., 2017. Novel G9 rotavirus strains co-circulate in children and pigs, Taiwan. Sci. Rep. 7:40731.

Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., Malhotra-Kumar, S., 2016. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. Euro. Surveill. 21.

Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., Zhang, R., Walsh, T.R., Shen, J., Wang, Y., 2017. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. Am. Soc. Microbiol. 8:e00543-17.

Zajacova, Z.S., Konstantinova, L., 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. Vet. Microbiol. 154, 369-75.

Zurfluh, K., Abgottspon, H., Hächler, H., Nüesch-Inderbilen, M., Stephan, R., 2014. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. PLoS One. 9:e95864.

