



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

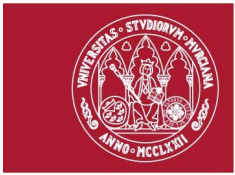
## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

Antimicrobial resistance monitoring in animal production and use of plant additives as alternatives to antimicrobials and zinc oxide

Monitorización de resistencias a los antimicrobianos en producción animal y empleo de aditivos vegetales como alternativas a los antibióticos y al óxido de zinc

**D. Jorge Rivera Gomis**  
**2022**





**D. ANTONIO BERNABÉ SALAZAR**, Catedrático de Universidad del Área de Anatomía Patológica en el Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas,

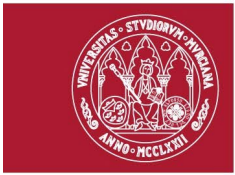
**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Monitorización de resistencias a los antimicrobianos en producción animal y empleo de aditivos vegetales como alternativas a los antibióticos y al óxido de zinc. Antimicrobial resistance monitoring in animal production and use of plant additives as alternatives to antimicrobials and zinc oxide”, realizada por D. Jorge Rivera Gomis, bajo mi inmediata tutorización, dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 11 de Noviembre de 2021

**ANTONIO BERNABÉ SALAZAR**





**Dña. MARÍA JOSÉ CUBERO PABLO**, Catedrática de Universidad del Área de Sanidad Animal en el Departamento de Sanidad Animal,

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Monitorización de resistencias a los antimicrobianos en producción animal y empleo de aditivos vegetales como alternativas a los antibióticos y al óxido de zinc. Antimicrobial resistance monitoring in animal production and use of plant additives as alternatives to antimicrobials and zinc oxide”, realizada por D. Jorge Rivera Gomis, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 11 de Noviembre de 2021

**MARÍA JOSÉ CUBERO PABLO**



Instituto Murciano de Investigación y  
Desarrollo Agrario y Medioambiental

**Dña. CRISTINA MARTÍNEZ CONESA**, Doctora en Ciencias Biológicas e Investigadora del  
Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Medioambiental (IMIDA),

**AUTORIZA:**

La presentación de la Tesis Doctoral titulada “Monitorización de resistencias a los antimicrobianos en producción animal y empleo de aditivos vegetales como alternativas a los antibióticos y al óxido de zinc. Antimicrobial resistance monitoring in animal production and use of plant additives as alternatives to antimicrobials and zinc oxide”, realizada por D. Jorge Rivera Gomis, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

Murcia, 11 de Noviembre de 2021

**CRISTINA MARTÍNEZ CONESA**

MARTINEZ CONESA, CRISTINA 11/11/2021 15:02:33

Esta es una copia auténtica imprimible de un documento electrónico administrativo archivado por la Comunidad Autónoma de Murcia, según artículo 27.3.c) de la Ley 39/2015. Los firmantes y las fechas de firma se muestran en los recuadros. Su autenticidad puede ser contrastada accediendo a la siguiente dirección: <https://sede.carm.es/verificardocumentos> e introduciendo el código seguro de verificación (CSV) CARM-0f3a16db-4218-8b6e-26c3-0050569b6280





# Índice / Index

1. AGRADECIMIENTOS .....	8
2. ABREVIACIONES .....	12
3. INTRODUCCIÓN.....	16
4. INTRODUCTION.....	24
5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	30
5.1 Introducción .....	32
5.2 Resistencias a los Antimicrobianos (RAM) y su vigilancia en aves de corral	33
5.3 Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> L.) y ajo ( <i>Allium sativum</i> ) como alternativas al óxido de zinc y antibióticos en producción porcina y avícola .....	36
6. BIBLIOGRAPHIC REVIEW .....	42
6.1 Introduction.....	44
6.2 Antimicrobial Resistance (AMR) and its surveillance in poultry .....	45
6.3 Oregano ( <i>Origanum vulgare</i> L.) and garlic ( <i>Allium sativum</i> ) as alternatives to zinc oxide and antibiotics in swine and poultry production .....	48
7. ARTÍCULOS PUBLICADOS / PUBLISHED PAPERS .....	54
7.1. Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of <i>Campylobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus</i> spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018.....	56
7.2. Antimicrobial Resistance of <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> Commensal Isolates from Laying Hen Farms in Spain. ...	58
7.3. Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets. ....	59
7.4. Aportaciones del doctorando en las publicaciones incluidas en la presente tesis. ....	60
8. RESUMEN.....	62
8.1 Objetivos .....	66
8.2 Estudio 1. Patrones de resistencia a antibióticos de categorías C y D para uso veterinario de aislados comensales de <i>Campylobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus</i> spp. de granjas de gallinas ponedoras en España durante 2018... 67	
8.3 Estudio 2. Resistencia a los antimicrobianos de aislados comensales de <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> y <i>Enterococcus faecalis</i> de granjas de gallinas de puesta en España.....	68

8.4 Estudio 3. Efectos de la Suplementación Dietética de Ajo y Aceite Esencial de Orégano en Biomarcadores del Estado Oxidativo, Estrés e Inflamación en Lechones Post-destete. ....	69
8.5 Conclusiones .....	70
9. SUMMARY.....	72
9.1 Objectives .....	76
9.2 Study 1. Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of <i>Campylobacter</i> spp., <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus</i> spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018. ....	77
9.3 Study 2. Antimicrobial Resistance of <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Escherichia coli</i> and <i>Enterococcus faecalis</i> Commensal Isolates from Laying Hen Farms in Spain. ....	78
9.4 Study 3. Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets. ....	79
9.5 Conclusions.....	80
10. CONCLUSIONES .....	82
11. CONCLUSIONS.....	86
12. REFERENCIAS / REFERENCES .....	90
13. APÉNDICES .....	106
13.1. Estancias de investigación en el extranjero .....	108
13.2. Comunicaciones a congresos internacionales derivadas de esta tesis doctoral .....	109
13.3. Publicaciones en revistas nacionales .....	110
13.4. Conferencias y Jornadas .....	111
13.5. Iniciación a la formación docente e investigadora.....	112
13.6. Contratos de colaboración en proyectos de investigación.....	114
13.7. Actividad de gestión de la investigación .....	115



**1.**

# **AGRADECIMIENTOS**



## *1. Agradecimientos*

Los trabajos que componen esta tesis se realizaron mediante el proyecto RTA 2015-00075-C04-04, a través del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (2015-2018), y el proyecto DALLAND CDTI IDI-20180830 “NATURPORKS” (2018-2021), concedido por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; y cofinanciado por fondos FEDER a través del Programa Operativo de Crecimiento Inteligente.

Jorge Rivera Gomis es beneficiario de un contrato de trabajo como Investigador Licenciado en el proyecto DALLAND CDTI IDI-20180830 “NATURPORKS” (2018-2021).

Muchísimas gracias a María José Cubero, por haberme dado la oportunidad de venir a la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia a trabajar en estos proyectos. Muchas gracias por la confianza depositada en mí y por el apoyo y disponibilidad continuos durante estos años. Ha sido un placer trabajar contigo y estoy muy agradecido de haber tenido la oportunidad de disfrutar de esta experiencia.

A Julio Otal por su inestimable ayuda durante la realización de los trabajos que componen esta tesis, muchas gracias haberme enseñado a hacer los análisis de los resultados y por el apoyo durante mi trabajo en la Facultad.

A mis Directores de tesis María José Cubero, Cristina Martínez y Antonio Bernabé por su disponibilidad, paciencia y dedicación. Muchas gracias por haberme ayudado durante este tiempo.

En relación al Proyecto RTA 2015-00075-C04-04, muchas gracias a Pablo Catalá, Director Técnico del CECAV, a María del Mar Fernández, Directora de IMPROVO, y a Ignacio Badiola, coordinador general del proyecto, por su inestimable ayuda y colaboración para realizar las actividades de investigación que permitieron obtener los dos primeros trabajos de esta tesis.

A José Antonio Tornel por su disponibilidad, implicación y papel fundamental en la realización del proyecto NATURPORKS, a DHESA por poner en marcha el proyecto y proporcionar los recursos necesarios, a Antonio Martínez Abarca y Rubén Brando por su implicación con el proyecto.

## *1. Agradecimientos*

Al personal del IMIDA, Cristina Martínez, María José Jordán y José Antonio Sotomayor por su implicación en los dos proyectos en los que se basa esta tesis y por su inestimable colaboración en estos trabajos.

A Antonio Bernabé por su apoyo y paciencia durante la ejecución del proyecto Naturporks y por su ayuda durante las actividades del Programa de Doctorado y elaboración de la tesis. A José Antonio Navarro por su ayuda en el laboratorio.

A Pedro Marín, por su ayuda fundamental en la preparación de los dos primeros trabajos de esta tesis y por su disponibilidad. A los coautores de las dos primeras publicaciones a los que no he citado ya, Elisa Escudero, María José Jordán y Sebastián Galecio, por su colaboración en los trabajos que han permitido la finalización de esta tesis.

A Camila Peres, Damián Escribano y José Cerón por su inestimable ayuda y disponibilidad para la realización del tercer trabajo de esta tesis.

A María del Carmen Gallego y a María José Cubero por haberme incluido en los proyectos de innovación docente y en la asignatura de Medicina Preventiva y Política Sanitaria. Muchas gracias por haber hecho que me sintiera como en casa.

A los profesores Antonio Contreras y Antonio Sánchez por permitirme participar en la asignatura de epidemiología y por incluirme en el proyecto de innovación docente.

A Marnie Brennan por haberme dado la oportunidad de hacer la residencia del Colegio Europeo de Sanidad Pública Veterinaria (ECVPH) y por haberme permitido realizar la colaboración con el CEVM de la Universidad de Nottingham.

A los profesores Pilar Muñoz, Juan Carlos Corrales y Christian de la Fe por su disponibilidad y compañía durante este tiempo.

A José Martínez por su apoyo, disponibilidad y ayuda en el laboratorio.

A mis compañeros Ana García-Galán y Edgar García por los buenos momentos durante los descansos y fuera del trabajo y por su amistad.

A mi familia, sobre todo a mis padres y mi hermano, por haberme apoyado y ayudado desde siempre.

A Alexandra, por estar siempre ahí para apoyarme y por ser mi inspiración para lograr mis metas.

## **2. ABREVIACIONES**



## *2. Abreviaciones*

- AEM/EMA: Agencia Europea del Medicamento.
- AEO/OEO: Aceite Esencial de Orégano.
- AM: Antimicrobiano.
- AMEG: Grupo de Expertos Ad. Hoc en Asesoramiento Antimicrobiano.
- CDTI: Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial.
- CMI/MIC: Concentración Mínima Inhibitoria.
- ECDC: Centro Europeo para la Prevención y el Control de las Enfermedades.
- EFSA: Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria.
- ESVAC: Proyecto Europeo de Vigilancia del Consumo de Antimicrobianos Veterinarios.
- FEDER: Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
- OMS/WHO: Organización Mundial de la Salud.
- PCU: Unidad de corrección de la población.
- PRAN: Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos.
- RAM/AMR: Resistencia a los Antimicrobianos.
- RTA: Programa Estatal de I+D+I orientada a los retos de la sociedad.
- UE/EU: Unión Europea.





# **3. INTRODUCCIÓN**



### 3. Introducción

La presente tesis doctoral se ha realizado en formato de compendio de publicaciones y, de acuerdo con la normativa publicada en la Resolución del Rector R-310/2015 de la Universidad de Murcia, opta a la mención de “Doctorado Internacional”. La tesis está compuesta por tres artículos publicados en revistas internacionales indexadas en la base de datos del *Journal Citation Reports* pertenecientes a la categoría *Veterinary Sciences*. Todos los artículos constituyen una unidad científica, en el marco de la investigación sobre resistencia a los antimicrobianos en producción animal y al desarrollo de productos alternativos a los antimicrobianos (AM) y al óxido de zinc (ZnO).

La mejora en el conocimiento de dichos aspectos permite establecer medidas de control y monitorización más eficaces contra el incremento de resistencias a los antimicrobianos, tanto en sanidad animal como en sanidad humana y medioambiental. En concreto, dos de estas publicaciones se han centrado en estudiar la prevalencia y caracterización de la resistencia a los antimicrobianos en aves de puesta en España. Estas investigaciones se centraron en ese sector productivo debido a la escasez de datos actuales, en contraste con otros sectores más estudiados y monitorizados a nivel español y europeo, como son la producción avícola de carne, el sector porcino o el vacuno. Esta falta de información sobre resistencias a los antibióticos en aves de puesta, justificó la realización del proyecto de investigación RTA 2015-00075-C04-04, con la Prof. María José Cubero Pablo como investigadora principal, financiado por el Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (2015-2018), del que derivan los dos primeros trabajos de esta tesis. Estas investigaciones suponen un avance hacia la correcta caracterización de las resistencias a los antimicrobianos en producción animal, que es esencial para permitir el diseño e implementación de medidas debidamente adaptadas a la situación real de cada sector productivo.

El desarrollo de métodos y productos alternativos a los antibióticos es un paso esencial para prevenir y reducir la presencia de resistencias a los antimicrobianos en producción animal. Debido al uso de antibióticos de forma generalizada para controlar brotes clínicos de enfermedades, hay una alta presencia de resistencias en producción animal, que pueden poner en peligro tanto la viabilidad de las explotaciones como la salud animal, humana y medioambiental. Dentro de este contexto, la producción porcina intensiva es uno de los principales sectores consumidores de antibióticos y productos con similares características como el ZnO. Este sector productivo tiene unas características que facilitan

### *3. Introducción*

la aparición de problemas infecciosos y digestivos desencadenados por pequeñas alteraciones del microbioma ambiental o de los animales, debido a una alta selección genética y productiva, y a un ciclo intensivo que busca el máximo rendimiento. En producción porcina, el destete de los lechones es uno de los puntos más críticos. En la prevención de problemas digestivos, por el cambio de dieta y ambiente, se usa de forma generalizada el ZnO. Debido a esto, la tercera publicación de esta tesis se centra en el estudio de productos alternativos a los antimicrobianos y al óxido de zinc (ZnO) en lechones postdestete.

Esta investigación representa un importante paso en la reducción del consumo de antibióticos y ZnO en producción animal a través del desarrollo de productos alternativos. Además, el ZnO será prohibido en la UE a partir del 26 de junio 2022, por lo que los productos alternativos son necesarios con urgencia. La financiación del trabajo se realizó mediante el proyecto DALLAND CDTI IDI-20180830 “NATURPORKS” (2018–2021), en colaboración entre la empresa Dalland Hybrid España (DHESA) y los equipos de investigación de La Universidad de Murcia y el Instituto Murciano de Investigación y Desarrollo Agrario y Alimentario (IMIDA), con la Prof. María José Cubero Pablo como investigadora principal. Este proyecto fue concedido por el Centro para el Desarrollo Tecnológico Industrial (CDTI) del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades; y cofinanciado por fondos FEDER a través del Programa Operativo de Crecimiento Inteligente. Fue reconocido en 2020 con el Premio a la Transferencia de Conocimiento de la Universidad de Murcia como un Proyecto estratégico de transferencia con gran impacto social y económico.

En explotaciones intensivas, el destete se realiza a los 21 días de edad y trae consigo frecuentes problemas digestivos, patologías y disbiosis que provocan grandes pérdidas y retraso del crecimiento. Ante la prohibición de los antibióticos como promotores del crecimiento, el uso de ZnO a dosis terapéuticas se ha generalizado en el sector porcino debido a su capacidad en la prevención de la diarrea postdestete. El ZnO a las dosis usadas es excretado con las heces de los animales y constituye un importante contaminante ambiental. Además, se ha comprobado que contribuye al aumento de las resistencias a los antibióticos.

De forma adicional a los problemas ya mencionados, la creciente preocupación de los consumidores por la seguridad alimentaria, el impacto social de la producción, el medio ambiente y el bienestar animal, unidos a la demanda de precios más bajos, hacen

### 3. Introducción

necesario que se aumente la sostenibilidad de la producción animal. Todo esto, junto a la prohibición del ZnO en 2022, ha hecho que se intensifique la búsqueda de productos alternativos.

El ajo (*Allium sativum*) y el orégano (*Origanum vulgare* L.) tienen propiedades que pueden convertirlos en sustitutos sostenibles del uso de antibióticos y aditivos como el ZnO en las dietas animales. Tanto el ajo como el orégano, se caracterizan por su gran cantidad de componentes bioactivos, como compuestos organosulfurados, polifenoles, saponinas, terpenos, fructanos y fructooligosacáridos. En estos aditivos de origen vegetal se han identificado propiedades antioxidantes, antibacterianas, antivirales, antiparasitarias, inmuno-estimuladoras, reguladoras de la homeostasis intestinal y propiedades reductoras del colesterol. Además, mejoran el valor nutricional, la estabilidad oxidativa y las propiedades sensoriales de carne y huevos de aves de corral. Los productos derivados del ajo y el orégano como aditivos en el pienso, gracias a sus propiedades, pueden ayudar a reducir la necesidad de usar antibióticos y ZnO en producción animal, ayudando a mantener los animales en un buen estado sanitario y productivo, y por lo tanto, contribuyen a prevenir patologías.

Los tres artículos que conforman esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. comensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018.

Autores: Jorge Rivera-Gomis, Pedro Marín, Julio Otal, Juan Sebastián Galecio, Cristina Martínez-Conesa, María José Cubero.

Fecha de publicación: Noviembre, 2020.

Revista: Preventive Veterinary Medicine.

Volumen: 186.

Páginas: 1-8.

Categoría del *Journal Citation Reports* (2020): *Veterinary Sciences*.

Factor de impacto (2020): 2,670.

Factor de impacto quinquenal: 2,933.

### 3. Introducción

Posición: 27 de 146.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105222>

2. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* Commensal Isolates from Laying Hen Farms in Spain.

Autores: Jorge Rivera-Gomis, Pedro Marín, Cristina Martínez-Conesa, Julio Otal, María José Jordán, Elisa Escudero, María José Cubero.

Fecha de publicación: Abril, 2021.

Revista: Animals.

Volumen: 11.

Páginas: 1-13.

Categoría del *Journal Citation Reports* (2020): *Veterinary Sciences*.

Factor de impacto (2020): 2,752.

Factor de impacto quinquenal (2020): 2,942.

Posición: 19 de 146.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11051284>

3. Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets.

Autores: Jorge Rivera-Gomis, Camila Peres Rubio, Cristina Martínez Conesa, Julio Otal Salaverri, José Joaquín Cerón, Damián Escribano Tortosa, María José Cubero Pablo.

Fecha de publicación: Noviembre, 2020.

Revista: Animals.

Volumen: 10.

Páginas: 1-18.

Categoría del *Journal Citation Reports* (2020): *Veterinary Sciences*.

Factor de impacto (2020): 2,752.

Factor de impacto quinquenal (2020): 2,942.

### *3. Introducción*

Posición: 19 de 146.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10112093>





# **4. INTRODUCTION**



#### *4. Introduction*

This doctoral thesis has been carried out as a compendium of publications. In accordance with the regulations published in the *Resolución del Rector* R-310/2015 of the University of Murcia, it opts for the mention of “International PhD”. The thesis consists of three papers published in international journals indexed in the *Journal Citation Reports* database belonging to the *Veterinary Sciences* category. All the articles constitute a scientific unit within the framework of research on antimicrobial resistance in animal production and the development of alternative products to antimicrobials and zinc oxide (ZnO).

The improvement in the knowledge on these aspects makes it possible to establish more effective control and monitoring measures against the increase in resistance to antimicrobials, both in animal health and in human and environmental health. Specifically, two of these publications have focused on studying the prevalence and characterization of antimicrobial resistance in laying hens in Spain. These investigations focused on this productive sector due to the scarcity of current data, in contrast to other sectors more studied and monitored at the Spanish and European level, such as poultry meat production, the swine or cattle sectors. This lack of information on antibiotic resistance in laying hens justified the research project RTA 2015-00075-C04-04, with Prof. María José Cubero Pablo as main researcher, funded by the Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (2015-2018), from which the first two works of this thesis originate. These investigations represent an advance towards the correct characterization of antimicrobial resistance in animal production, which is essential to allow the design and implementation of measures properly adapted to the real situation in each productive sector.

The development of alternative products and methods to antibiotics is an essential step to prevent and reduce the presence of antimicrobial resistance in animal production. Due to the widespread use of antibiotics to control clinical outbreaks of diseases, there is a high presence of resistance in animal production, which can endanger both the viability of farms and the health of animals, humans and the environment. Within this context, one of the main sectors regarding consumption of antibiotics and products with similar characteristics such as ZnO is the intensive pig production. This productive sector has characteristics that facilitate the presence of infectious and digestive problems triggered by small alterations of the environmental or animal microbiome, due to a high genetic and productive selection, and an intensive cycle that seeks maximum performance. In pig

#### 4. Introduction

production, the weaning of piglets is one of the most critical points. In the prevention of digestive problems due to the change of diet and environment, ZnO is widely used. Due to this, the third publication of this thesis focuses on the study of alternative products to antimicrobials and zinc oxide (ZnO) in post-weaning piglets.

This research represents an important step in reducing the consumption of antibiotics and ZnO in animal production through the development of alternative products. Additionally, ZnO will be banned in the EU from June 26th, 2022, so alternative products are urgently needed. This work was funded through the project DALLAND CDTI IDI-20180830 “NATURPORKS” (2018–2021), in collaboration between the company Dalland Hybrid España (DHESA) and the research teams from the University of Murcia and the Murcia Institute of Agri-Food Research and Development (IMIDA), with Prof. María José Cubero Pablo as main researcher. This project was granted by the Center for Industrial Technological Development (CDTI) of the Ministry of Science, Innovation and Universities; and co-financed by FEDER funds through the Smart Growth Operational Program. The project was recognized in 2020 with the Knowledge Transfer Award from the University of Murcia as a strategic knowledge transfer project with great social and economic impact.

In intensive farms, weaning takes place at 21 days of age and brings with it frequent digestive problems, pathologies and dysbiosis that cause great losses and growth delays. Given the prohibition of antibiotics as growth promoters, the use of ZnO at therapeutic doses has become widespread in the pig sector due to its ability to prevent post-weaning diarrhea. ZnO at the used doses is excreted with animal feces and constitutes an important environmental pollutant. In addition, it has been shown to contribute to the increase of antibiotic resistance.

In addition to the problems already mentioned, the growing concern of consumers for food safety, the social impact of production, the environment and animal welfare, together with the demand for lower prices, make it necessary to increase the sustainability of animal production. All of this, together with the ZnO ban in 2022, has intensified the search for alternative products.

Garlic (*Allium sativum*) and oregano (*Origanum vulgare* L.) have properties that can make them sustainable substitutes for the use of antibiotics and additives such as ZnO in animal diets. Both garlic and oregano are characterized by their large amount of bioactive

#### 4. Introduction

components, such as organosulfur compounds, polyphenols, saponins, terpenes, fructans and fructooligosaccharides. In these vegetable additives there have been identified antioxidant, antibacterial, antiviral, antiparasitic, immunostimulating, intestinal homeostasis regulating and cholesterol-lowering properties. In addition, they improve the nutritional value, oxidative stability and sensory properties of poultry meat and eggs. The products derived from garlic and oregano as additives in the feed, can help reduce the need for antibiotics and ZnO in animal production thanks to their properties, thus helping to keep the animals in a good health and productive status, therefore, helping to prevent pathologies.

The three papers that form this doctoral thesis are the following:

1. Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018.

Authors: Jorge Rivera-Gomis, Pedro Marín, Julio Otal, Juan Sebastián Galecio, Cristina Martínez-Conesa, María José Cubero.

Publication date: November, 2020.

Journal: Preventive Veterinary Medicine.

Volume: 186.

Pages: 1-8.

*Journal Citation Reports Category (2020): Veterinary Sciences.*

Impact factor (2020): 2,670.

Five-year impact factor: 2,933.

Position: 27 of 146.

DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105222>

2. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* Commensal Isolates from Laying Hen Farms in Spain.

#### *4.Introduction*

Authors: Jorge Rivera-Gomis, Pedro Marín, Cristina Martínez-Conesa, Julio Otal, María José Jordán, Elisa Escudero, María José Cubero.

Publication Date: April, 2021.

Journal: Animals.

Volume: 11.

Pages: 1-13.

*Journal Citation Reports Category (2020): Veterinary Sciences.*

Impact factor (2020): 2,752.

Five-year impact factor (2020): 2,942.

Position: 19 of 146.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11051284>

3. Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets.

Authors: Jorge Rivera-Gomis, Camila Peres Rubio, Cristina Martínez Conesa, Julio Otal Salaverri, José Joaquín Cerón, Damián Escribano Tortosa, María José Cubero Pablo.

Publication date: November, 2020.

Journal: Animals.

Volume: 10.

Pages: 1-18.

*Journal Citation Reports Category (2020): Veterinary Sciences.*

Impact factor (2020): 2,752.

Five-year impact factor (2020): 2,942.

Position: 19 of 146.

DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10112093>

# **5. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**





### 5.1 Introducción

La creciente demanda de productos de origen animal ha impulsado el uso de antibióticos, desencadenando la emergencia de las resistencias a los antimicrobianos (RAM), que suponen una amenaza global para la sanidad animal y la salud pública (Mehdi *et al.*, 2018; Roth *et al.*, 2019). Esto ha motivado la puesta en marcha de estrategias para la reducción del consumo de antibióticos. En 2014, España encabezaba el consumo en la UE con 418 mg/PCU, pero en 2017 se redujo a 230 mg/PCU, y en 2019 bajó hasta 172.4 mg/PCU (ESVAC, 2021).

En la Unión Europea se han realizado diversas acciones para monitorizar y prevenir el desarrollo de RAM en producción animal (EFSA y ECDC, 2020; PRAN, 2021), sobre todo en los principales sectores productivos, aunque un análisis más específico de los diferentes sectores y especies animales es necesario para garantizar tanto la sanidad animal y la capacidad productiva, como la salud de los consumidores y la preservación del medio ambiente. Todo esto se tiene en cuenta en la Ley Europea sobre Sanidad Animal, que es aplicable desde abril de 2021 y que hace hincapié en el control de patógenos animales resistentes a los antimicrobianos (European Parliament, 2016). El Plan Nacional frente a la Resistencia a los Antibióticos (PRAN, 2021) establece las pautas en el uso de los antimicrobianos, evitando un uso rutinario o para compensar falta de higiene, la cría inadecuada de los animales o la mala gestión. Según las nuevas normativas ya comentadas, los antimicrobianos sólo deben usarse ante actos clínicos que los requieran de forma indiscutible, y deben ser recetados por un veterinario, basándose en criterios epidemiológicos y clínicos. Estos criterios incluyen la monitorización de la sensibilidad de los patógenos a los antimicrobianos mediante pruebas laboratoriales y la optimización en la selección de las familias de antibióticos, para disminuir la probabilidad de generar resistencias. Además, es obligatorio informar a la administración del consumo de antibióticos, y se prohíbe su uso metafiláctico (European Parliament, 2019).

Estos hechos, unidos a la prohibición europea del uso subterapéutico de antibióticos (UE, 2003) y la percepción de los consumidores de los efectos perjudiciales de la resistencia a los antibióticos, así como de los residuos en los productos animales y en sus desechos, con repercusión en el medio ambiente, han intensificado la búsqueda de sustitutos de los antibióticos en la producción de alimentos (Mehdi *et al.*, 2018; Suresh *et al.*, 2018; Kim y Lillehoj, 2019).

## 5.Revisión Bibliográfica

Una vía para reducir el uso de antibióticos, es su sustitución por compuestos como los fitoaditivos, que presentan propiedades beneficiosas y pueden ser incluidos en la alimentación animal sin riesgo para los consumidores. Para considerar eficaz un fitoaditivo, éste debe estimular el consumo de alimento, mejorar las secreciones de enzimas digestivas, activar el sistema inmunitario y modular la microbiota intestinal, además de tener propiedades antibacterianas, coccidiostáticas, antivirales, antioxidantes y/o antiinflamatorias (Toghyani *et al.*, 2011). Un problema frecuente al comparar estudios sobre aditivos de origen vegetal, como ajo, orégano o diferentes extractos de plantas, es que la heterogeneidad en la composición del aditivo estudiado, las características de los animales analizados, las dosis y las características del estudio pueden provocar discrepancias en los resultados (Cubero Pablo *et al.*, 2020).

### 5.2 Resistencias a los Antimicrobianos (RAM) y su vigilancia en aves de corral

La RAM es una amenaza para la salud a nivel mundial (OMS, 2021). Esta situación se ha alcanzado debido a la prescripción abusiva de antibióticos, su uso inapropiado por parte de los pacientes y el abuso de estas sustancias en producción animal (Capita y Alonso-Calleja, 2013; Van Boeckel *et al.*, 2015). La causa del uso indiscriminado de antibióticos en animales de granja es el control de enfermedades asociadas con la ganadería intensiva y también como promotores del crecimiento (Dibner y Richards, 2005; Marshall y Levy, 2011). Esta situación acelera la distribución y selección de genes de RAM en patógenos, así como en organismos comensales, y hace que estas bacterias sean un riesgo para la salud humana (Mughini-Gras *et al.*, 2019; Wegener, 2003). La Organización Mundial de la Salud (OMS) establece el concepto de "Una salud", donde la RAM es un problema ecológico, que se caracteriza por interacciones complejas, que involucran a diversas poblaciones microbianas, que afectan la salud de los humanos, los animales y el medio ambiente. Por lo tanto, tiene sentido abordar el problema de la resistencia, teniendo en cuenta esta complejidad y naturaleza ecológica, utilizando un enfoque coordinado y multisectorial (OMS, 2017, 2021; McEwen y Collignon, 2018).

Las aves de corral son una de las industrias alimentarias más extendidas a nivel mundial. Las razones principales son los costes de producción relativamente bajos y la ausencia de restricciones culturales y religiosas para su consumo (Nhung *et al.*, 2017). La UE produce alrededor de 15 millones de toneladas de carne de aves y 7,5 millones de toneladas de huevos (400 millones de gallinas ponedoras) al año (Parlamento Europeo, 2019). Diversos AM se utilizan para criar aves de corral en la mayoría de los países (Agunos *et*

## 5.Revisión Bibliográfica

al., 2012; Landoni y Albarellos, 2015), principalmente a través de la vía oral, con el objetivo de prevenir y tratar enfermedades, pero también para mejorar el crecimiento y productividad (Page y Gautier, 2012). Muchos de esos AM se consideran críticos y de gran importancia para la medicina humana (OMS, 2017, 2021). Además, la RAM en los patógenos avícolas genera pérdidas económicas, derivadas del gasto en AM ineficaces, así como pérdidas generadas por enfermedades avícolas no tratadas. Debido a esto, en la UE se prohibieron los antibióticos como promotores del crecimiento en la alimentación animal (EU Commission, 2003).

El Grupo Especial de Expertos en Asesoramiento Antimicrobiano (AMEG) de la Agencia Europea del Medicamento, ha categorizado los antibióticos en función de las posibles consecuencias para la salud pública, de la mayor resistencia a los AM cuando se usan en animales y según la necesidad de su uso en medicina veterinaria. La categorización para un uso prudente de antibióticos, pretende ser una herramienta para apoyar la toma de decisiones de los veterinarios sobre qué antibiótico usar, pero no reemplaza las pautas de tratamiento. En la categorización de AMEG, hay cuatro categorías, A (Evitar), B (Restringir), C (Precaución) y D (Prudencia), con la última categoría de riesgo más baja (EMA, 2019). La categoría D debe usarse como tratamientos de primera línea, siempre que sea posible y con prudencia, solo cuando sea médicamente necesario. Los antibióticos en la categoría C deben considerarse, solo cuando no hay antibióticos en la categoría D que puedan ser clínicamente efectivos para algunas indicaciones veterinarias. En concreto, en España se observan algunos de los consumos más altos de antibióticos en la UE, lo que justifica que se desarrollen resistencias (ECDC, 2020).

Programas de vigilancia estandarizados y continuos son necesarios para monitorizar la ocurrencia y persistencia de la RAM en los animales de producción (Wallmann, 2006; OMS, 2017, 2021; EFSA y ECDC, 2020). Generalmente se usan bacterias indicadoras para monitorizar la RAM, ya que se pueden encontrar comúnmente en animales sanos y en el ambiente. Además, estas bacterias adquieren RAM más rápido que otras bacterias comunes (Wallmann, 2006; Miranda *et al.*, 2008). *Escherichia coli* comensal, *Enterococcus* spp. y *Campylobacter* spp. se utilizan internacionalmente como bacterias indicadoras de niveles de RAM en las aves de corral, debido a su presencia común en el tracto intestinal aviar (Comisión Europea, 2013; 2020). Recientemente se actualizó el reglamento europeo sobre monitorización de resistencias, en el que hay ligeros cambios

## 5.Revisión Bibliográfica

en los rangos de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para el estudio de las resistencias, en adaptación a la situación de la RAM en la UE (EU Commission, 2020).

Respecto a las bacterias comensales usadas como indicadoras de RAM, *Campylobacter* spp. son ubicuas en diversos ambientes, pero prefieren el intestino de las aves, que colonizan como comensales. La presencia persistente de *Campylobacter* spp., que contamina el ambiente en mataderos y productos avícolas, es conocida en todo el mundo y representa la principal fuente de infecciones humanas. Además, el creciente número de notificaciones sobre resistencia a los antibióticos de *Campylobacter* spp. (a fluoroquinolonas, tetraciclina, eritromicina y gentamicina) y su aumento de virulencia están motivando un mayor control y reducción de la presencia de *Campylobacter* spp. (Marotta *et al.*, 2015; Nowaczek *et al.*, 2019). Ejemplos de los altos niveles de RAM en *Campylobacter* pueden ser el 89% de resistencia a la tetraciclina en broilers españoles detectado en 2016 (ECDC *et al.*, 2017), 61% en 2018 (EFSA y ECDC, 2020); o el 93% de resistencia al ciprofloxacino detectado en España en 2018 en *C. coli* (EFSA y ECDC, 2020). El ciprofloxacino es considerado un AM de importancia crítica para el tratamiento de la campylobacteriosis en humanos (Urdahl *et al.*, 2018; WHO, 2019).

*E. coli* es un bacilo Gram negativo habitual en el tracto digestivo de las aves, que se disemina ampliamente con las heces. En el momento del sacrificio, las cepas intestinales pueden contaminar las canales de aves de corral (Rouger *et al.*, 2017), del mismo modo, los huevos se contaminan durante la puesta (Lakhotia y Stephens, 1973; De Reu *et al.*, 2006). Además, algunas cepas son patógenos de origen alimentario, responsables de enfermedades humanas graves en todo el mundo. Numerosos estudios proporcionan evidencia de RAM significativa de aislados de *E. coli* en pollos de engorde criados en granjas, incluso sin uso registrado de AM (Miles *et al.*, 2006). En 2018 se detectó en España una resistencia al ciprofloxacino en broilers del 80%, muy superior al valor medio de la UE (56%) (EFSA y ECDC, 2020).

*Enterococcus* spp. se encuentran habitualmente en la microbiota comensal de los vertebrados terrestres. *Enterococcus* spp. se han asociado con septicemia, endocarditis y otras enfermedades en aves de corral, pero ciertas especies, como *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, son una causa importante de infecciones oportunistas en humanos. A pesar de su importancia, los datos sobre prevalencia de RAM en *Enterococcus* spp. son escasos, aunque se encuentra incluido como bacteria indicadora de RAM en la UE (EU Commission, 2013, 2020). El tratamiento de estas infecciones en humanos ha sido

## 5.Revisión Bibliográfica

complicado debido a la transmisión de enterococos RAM (Rehman *et al.*, 2018; O’Dea *et al.*, 2019). Es preocupante la creciente prevalencia de enterococos como causa de infecciones nosocomiales, junto con la resistencia clínica a antibióticos valiosos para la medicina humana. Se ha demostrado la diseminación de enterococos resistentes de animales a humanos y el intercambio de genes de resistencia entre enterococos de aves de corral y humanos (Van den Bogaard *et al.*, 2002; Donabedian *et al.*, 2006).

Las aves de corral son la principal fuente mundial de proteínas animales y uno de los sectores de la producción animal, que más consume antibióticos como promotores del crecimiento (Van Boeckel *et al.*, 2019; Van Boeckel *et al.*, 2015). El uso de aditivos vegetales para mejorar la sanidad animal, es una vía para reducir el uso de antibióticos y contribuir a la prevención y reducción de la RAM (Cubero Pablo *et al.*, 2020).

La industria avícola ha sido identificada como una fuente de bacterias RAM que causan enfermedades en los humanos, debido a la omnipresencia de la carne de pollo y los huevos en la dieta, y al uso ampliamente documentado de AM dentro del ciclo de producción avícola. La RAM representa una grave amenaza para la salud animal y pública. Los alimentos de origen animal, incluidos los huevos, tienen un papel fundamental en la transmisión de genes y cepas bacterianas resistentes a los AM.

Gran parte de nuestro conocimiento y suposiciones sobre la prevalencia y la evolución de la RAM en las aves de corral, se relacionan con cepas comensales aisladas de pollos de engorde. Sin embargo, se han realizado pocos estudios con respecto a los perfiles de RAM en bacterias comensales que circulan en gallinas ponedoras, y por lo tanto, se dispone de pocos datos. Debido a esto, la monitorización de forma específica por sector es imperativa si se pretende tomar medidas efectivas adaptadas a la situación de la RAM en producción animal.

### **5.3 Orégano (*Origanum vulgare* L.) y ajo (*Allium sativum*) como alternativas al óxido de zinc y antibióticos en producción porcina y avícola**

En producción porcina, el destete es un período crítico que condiciona el rendimiento de los animales en granjas comerciales. Prácticas como la mezcla de lechones de diferente origen, cambios en la nutrición y el ambiente, pueden afectar de forma negativa funciones endocrinas, el crecimiento y el bienestar de los lechones destetados (Moberg y Mench, 2000; Srinongkote *et al.*, 2003; Jayaraman y Nyachoti, 2017). Por lo tanto, el momento del destete es un período estresante en el que aumentan los marcadores de estrés en saliva

## 5.Revisión Bibliográfica

como el cortisol (Gupta *et al.*, 2007; Buckham Sporer *et al.*, 2008; Escribano *et al.*, 2019). También se producen cambios en marcadores de estrés oxidativo y disfunciones intestinales (Zhu *et al.*, 2012). Además, la inflamación de la mucosa, el rendimiento digestivo y la ganancia de peso se ven también afectados por el destete precoz (Pié *et al.*, 2004; Wijtten *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

Para reducir el impacto de estos problemas, la adición terapéutica de zinc, como óxido de zinc (ZnO) (de 2000 a 4000 mg/kg), ha sido ampliamente usada durante el período post-destete, ya que es efectivo reduciendo la diarrea y las disfunciones digestivas (Bonetti *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2012; Patel *et al.*, 2010; Sargeant *et al.*, 2011). El ZnO en altas dosis reduce la adhesión de *E. coli* enterotoxigénico (ETEC) K88 a células Caco-2 humanas, por lo tanto, disminuye la respuesta inmune a la infección celular. El ZnO también mejora el rendimiento post-destete y reduce los efectos de la colibacilosis post-destete, inhibiendo la secreción de cloruro estimulada por AMPc (Hoque *et al.*, 2005). Li *et al.* (2001) observaron un aumento en el grosor de la cubierta mucosa, la altura, la anchura, el coeficiente entre la altura de la vellosidad y la profundidad de la cripta y la disminución de la profundidad de la cripta en el intestino delgado de cerdos de 33 días (destetados a los 21 días), después de suplementar ZnO a una dosis de 3000 mg/kg.

Sin embargo, el uso de ZnO a niveles terapéuticos tiene serios inconvenientes, como la contaminación ambiental debido a la alta proporción excretada en las heces (Bonetti *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2012; Sargeant *et al.*, 2010) y su posible asociación con la resistencia a los antimicrobianos (Cavaco *et al.*, 2010; Cavaco *et al.*, 2011). Estos hechos han llevado a la prohibición de su uso a altas dosis desde 2022 en la UE (Standing Committee on Veterinary Medicinal Products, 2017).

Como respuesta a la problemática que rodea el uso de ZnO, y debido a su futura restricción, se están llevando a cabo investigaciones para encontrar alternativas económicas y ecológicas que puedan contribuir a la sostenibilidad y la resiliencia del sector porcino. Los extractos de plantas se usan ampliamente como aditivos alimenticios, para mejorar el rendimiento productivo de varias especies animales y, representan una alternativa potencial al ZnO debido a sus propiedades beneficiosas (Allan y Bilkei, 2005; Rossi *et al.*, 2020). Algunos de estos extractos de plantas que podrían usarse como alternativas son el orégano (*O. vulgare* L.) y el ajo (*A. sativum*).

## 5.Revisión Bibliográfica

El orégano contiene altas concentraciones de carvacrol y timol (Pandey *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2013) que han demostrado *in vitro* actividad antimicrobiana, antifúngica y antioxidante significativa (Cervato *et al.*, 2000; Dorman y Deans, 2000; Cattelan *et al.*, 2013). Además, su uso parece mejorar el rendimiento del crecimiento en cerdos destetados (Marcin *et al.*, 2006; Neill *et al.*, 2006), así como en otras especies, como corderos y pollos de engorde (Hernandez *et al.*, 2004; Bampidis *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2012). Además, Zhang *et al.* (2015) demostraron que el orégano podría reducir los niveles de cortisol en suero y aumentar la actividad enzimática antioxidante después del estrés por transporte en los cerdos. El aceite esencial de orégano (AEO) puede microencapsularse para mejorar su estabilidad, preservar los compuestos volátiles hasta que los animales lo consuman y facilitar su manejo y administración. Para este propósito se utilizan varias sustancias, como el aceite de girasol (Bakry *et al.*, 2016).

Por otro lado, el ajo (*A. sativum*) tiene varios efectos beneficiosos, tales como actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas, antioxidantes e inmunomoduladoras (Amagase *et al.*, 2001; Sallam *et al.*, 2004; Aydin *et al.*, 2005; Amagase, 2006; Li *et al.*, 2016). Los compuestos activos en el ajo son los productos de descomposición de sulfuros como la aliina, los dialilsulfuros y la alicina (Amagase *et al.*, 2001). Varios estudios han demostrado que la suplementación dietética de ajo parece mejorar la respuesta inmune y el rendimiento de crecimiento de los cerdos (Tatara *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011).

Horn *et al.* (2017) observaron que la suplementación con AEO podría mitigar parcialmente los efectos del estrés, del período posterior al destete, al reducir los niveles de cortisol en suero, produciendo un efecto positivo en el rendimiento del crecimiento, la función intestinal y el estado antioxidante. Además, un estudio en pollos también mostró una reducción del estrés por calor, debido a la suplementación dietética de ajo (Prieto y Campo, 2010). También se han descrito efectos antiinflamatorios del orégano y ajo en cerdos (Wang *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2016).

Los biomarcadores de estrés oxidativo se utilizan para evaluar el estrés en el suero de los lechones (Luo *et al.*, 2016; Buchet *et al.*, 2017). Sin embargo, en un estudio realizado por Rubio *et al.* (2019) una muestra no invasiva y relativamente libre de estrés, como la saliva, se utilizó para medir un panel de biomarcadores de estrés oxidativo en cerdos. Estos biomarcadores pueden ser usados para evaluar el efecto de aditivos nutricionales sobre el estrés oxidativo y otros parámetros en los animales estudiados.

## 5.Revisión Bibliográfica

En relación a los parámetros productivos, se han descrito efectos positivos sobre la ganancia de peso medio y sobre el consumo diario de pienso al administrar bajas dosis de ajo fermentado a los lechones (Yan y Kim, 2013; Cho *et al.*, 2020). Además, también se ha identificado una mejora en el peso corporal debido a la suplementación con ajo o productos derivados de ajo en cerdos (Tatara *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

También se han observado efectos beneficiosos del ajo en pollos, como la mejora de la palatabilidad de los piensos, estimulando el apetito (Martín *et al.*, 2015). Esto resulta en un mayor consumo de alimento y mayor ganancia de peso corporal (Revilla *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2017). El ajo en la dieta del pollo de engorde aumenta la velocidad del flujo salival y la secreción de jugo gástrico, lo que repercute en una mejor digestibilidad y mayor peso corporal (Kirubakaran *et al.*, 2016). La mejoría en el crecimiento de los pollos de engorde se atribuye a los fructoligosacáridos (FOS) del ajo, ya que ayudan a mantener los microorganismos intestinales beneficiosos y mejoran la absorción de los nutrientes (Brzóska *et al.*, 2015).

Por su parte, la alicina mejora y regenera la estructura del epitelio intestinal, y aumenta la profundidad de la cripta y la altura de las vellosidades, lo que incrementa la capacidad digestiva, a través de una mayor absorción y asimilación de nutrientes (Adibmoradi *et al.*, 2006). En pollos de engorde de producción ecológica la suplementación con 0,2% y 0,4% de ajo aumentó el peso corporal (Agulló *et al.*, 2016; Rojo *et al.*, 2016).

*A. sativum* como aditivo dietético, mejora la homeostasis del intestino, crea un ambiente intestinal favorable para los microorganismos comensales y reduce la multiplicación de patógenos, mejorando la salud y producción avícola (Kothari *et al.*, 2019; Peinado *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2015). También reduce el recuento de *E. coli*, fomentando la digestibilidad de los nutrientes y aumentando el peso las aves (Agulló *et al.*, 2016; Rojo *et al.*, 2016; Sheoran *et al.*, 2017).

En pollos de engorde los aditivos de *A. sativum* en los piensos, han mostrado poder antibacteriano y antiparasitario en la infección de *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* y *Eimeria acervulina*, debido a que reduce la invasión de enterobacterias y la capacidad de formación de biopelículas (Miralles *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2017). El extracto acuoso de ajo blanco y ajo morado (*A. sativum*) inhibió el crecimiento (CMI) de



## 5.Revisión Bibliográfica

una gran variedad de cepas de *Salmonella* spp. resistentes a múltiples fármacos y aisladas en diferentes especies animales (Huertas *et al.*, 2014).

Los fitoaditivos en los piensos mejoran la salud y el rendimiento productivo de los animales y ayudan a lograr un desarrollo sostenible de la producción. Tanto *A. sativum* como *O. vulgare* contienen una gran variedad de compuestos bioactivos (timol, carvacrol, compuestos organosulfurados, flavonoides, saponinas, fructanos, fructo-oligosacáridos, etc.) que justifican su utilidad como aditivos alimentarios para la producción animal. Tienen un efecto modulador significativo en los índices de crecimiento, metabolismo, ecosistema intestinal y respuesta inmune, especialmente en condiciones de estrés. Su aplicación estratégica en programas de alimentación ha sido escasa y se deben desarrollar procedimientos estandarizados para disponer de aditivos alimentarios, que conserven y garanticen la actividad y efectividad de sus compuestos bioactivos (Cubero Pablo *et al.*, 2020). Al mismo tiempo, el uso de estos aditivos puede ser un eficaz sustituto del uso de antibióticos y otros compuestos como el ZnO para la prevención de problemas digestivos en producción animal. Esta reducción del uso de antibióticos disminuiría el riesgo de desarrollo y mantenimiento de RAM en producción animal, que es especialmente prevalente en España (EFSA y ECDC, 2020).

La reducción del uso de antibióticos y aditivos como el ZnO es una necesidad, pero acarrea otros desafíos como el incremento de mortalidad y el empeoramiento de la rentabilidad productiva. Esto hace que sea necesario buscar alternativas al uso de estas sustancias. Las buenas prácticas en la cría de animales y la prevención de enfermedades infecciosas mediante medidas multifactoriales, como la bioseguridad efectiva y la vacunación adaptada a las enfermedades presentes en la región y fase productiva, son imprescindibles y no pueden ser reemplazadas por el uso de antibióticos. Hay una asociación positiva entre el nivel de bioseguridad interna y el mayor control de enfermedades infecciosas con un menor uso de antibióticos (Collineau *et al.*, 2017). Por lo tanto, es necesario emplear un enfoque holístico de la sanidad animal, mejorando la salud y el bienestar de los animales en la granja, en combinación con la vigilancia de enfermedades y el uso de tratamientos y aditivos nutricionales sostenibles. Esto es financieramente beneficioso y ayuda a minimizar el consumo de antibióticos y las resistencias.



# **6. BIBLIOGRAPHIC REVIEW**



### 6.1 Introduction

The growing demand for products of animal origin has increased the use of antibiotics, contributing to the emergence of Antimicrobial Resistance (AMR), which poses a global threat to animal and public health (Mehdi *et al.*, 2018; Roth *et al.*, 2019). This has motivated the implementation of strategies to reduce the consumption of antibiotics. In 2014, Spain had the highest consumption in the EU with 418 mg / PCU, but in 2017 it was reduced to 230 mg / PCU, and in 2019 it fell to 172.4 mg / PCU (ESVAC, 2021).

In the European Union, various actions have been carried out to monitor and prevent the development of resistance to antibiotics in animal production (EFSA and ECDC, 2020; PRAN, 2021), especially in the main animal production sectors, although a more specific analysis of the different sectors and animal species is necessary to guarantee both animal health and productive capacity, as well as the health of consumers and the preservation of the environment. All these aspects are taken into account in the European Animal Health Law, which has been applicable since April 2021 and emphasizes the need to control AMR animal pathogens (European Parliament, 2016). The National Plan against Antibiotic Resistance (PRAN, 2021) establishes the guidelines for the use of antimicrobials (AM), avoiding their use repetitively or to compensate for a lack of hygiene, improper animal husbandry or poor management. According to the new regulations already mentioned, AM should only be used in the face of clinical acts that indisputably require them, and they should be prescribed by the veterinarian, based on epidemiological and clinical criteria. These criteria include monitoring the sensitivity of pathogens to AM through laboratory tests and optimizing the selection of antibiotic families, to reduce the probability of generating resistance. In addition, it is mandatory to inform the administration of the consumption of antibiotics, and their metaphylactic use is prohibited (European Parliament, 2019).

These facts, together with the European ban on the subtherapeutic use of antibiotics (EU Commission, 2003) and the consumer perception of the harmful effects of antibiotic resistance, as well as the presence of residues in animal products and their waste, and the impact on the environment, have intensified the search for substitutes for antibiotics in food production (Kim & Lillehoj, 2019; Mehdi *et al.*, 2018; Suresh *et al.*, 2018).

One way to reduce the use of antibiotics to replace them by compounds such as phyto-additives, which have beneficial properties and can be included in animal feed without risk to consumers. To consider a phyto-additive effective, it must stimulate feed

## 6. Bibliographic Review

consumption, improve the secretion of digestive enzymes, activate the immune system and modulate the intestinal microbiota, in addition to having antibacterial, coccidiostatic, antiviral, antioxidant and / or anti-inflammatory properties (Toghyani *et al.*, 2011). A frequent problem when comparing studies on additives of vegetable origin, such as garlic, oregano or different plant extracts, is that the heterogeneity in the composition of the studied additive, the animals analyzed, the doses and the characteristics of the study can cause discrepancies in the results (Cubero Pablo *et al.*, 2020).

### 6.2 Antimicrobial Resistance (AMR) and its surveillance in poultry

AMR is a global health threat (WHO, 2021). This situation has been reached due to the abusive prescription of antibiotics, their inappropriate use by patients and the overuse of these substances in animal production (Capita & Alonso-Calleja, 2013; Van Boeckel *et al.*, 2015). The cause of the inappropriate use of antibiotics in farm animals is the control of diseases associated with intensive animal production and also their use as growth promoters (Dibner & Richards, 2005; Marshall & Levy, 2011). This situation accelerates the selection and distribution of AMR genes in pathogens, as well as in commensal organisms, and turns these bacteria into a risk to human health (Mughini-Gras *et al.*, 2019; Wegener, 2003). The World Health Organization (WHO) establishes the concept of "One health", by which AMR is an ecological problem characterized by complex interactions involving diverse microbial populations that affect the health of humans, animals and the environment. Therefore, it makes sense to tackle the problem of AMR using a coordinated and multisectoral approach, taking into account its complexity and ecological nature (McEwen & Collignon, 2018; WHO, 2017, 2021).

Poultry is one of the most widespread food industries in the world. The main reasons for this are the relatively low production costs and the absence of cultural and religious restrictions on poultry products consumption (Nhung *et al.*, 2017). The EU produces around 15 million tonnes of poultry meat and 7.5 million tonnes of eggs (400 million laying hens) per year (European Parliament, 2019). Various AM are used to raise poultry in most countries (Agunos *et al.*, 2012; Landoni & Albarellos, 2015), mainly through the oral route, with the aim of preventing and treat diseases, but also to improve growth and productivity (Page & Gautier, 2012). Many of these AMs are considered critical and of great importance for human medicine (WHO, 2017, 2021). In addition, AMR in poultry pathogens generates economic losses, derived from ineffective spending on AMs, as well

## 6. Bibliographic Review

as losses generated by untreated poultry diseases. Because of this, antibiotics as growth promoters in animal feed were banned in the EU (EU Commission, 2003).

The Antimicrobial Advice Ad Hoc Expert Group (AMEG) of the European Medicines Agency (EMA) has categorized antibiotics according to the possible consequences for public health of a greater resistance when used in animals and according to the need of their use in veterinary medicine. The categorization for a prudent use of antibiotics is intended as a tool to support veterinarians' decision on which antibiotic to use, but it is not a substitute for treatment guidelines. There are four categories in the AMEG categorization, A (Avoid), B (Restrict), C (Caution) and D (Prudence), with the last being the lowest risk category (EMA, 2019). Category D should be used as first-line treatments, whenever possible and prudently, only when medically necessary. Antibiotics in category C should be considered only when there are no antibiotics in category D that can be clinically effective for some veterinary indications. Specifically, Spain has some of the highest consumption of antibiotics in the EU, which justifies the development of resistance (ECDC, 2020).

Standardized and continuous surveillance programs are necessary to monitor the occurrence and persistence of AMR in production animals (EFSA & ECDC, 2020; Wallmann, 2006; WHO, 2017, 2021). Indicator bacteria are generally used to monitor AMR, as they can be commonly found in healthy animals and in the environment. Furthermore, these bacteria acquire AMR faster than other common bacteria (Miranda *et al.*, 2008; Wallmann, 2006). Commensal *Escherichia coli*, *Enterococcus* spp. and *Campylobacter* spp. are used internationally as indicator bacteria for AMR levels in poultry, due to their common presence in the avian intestinal tract (EU Commission, 2013, 2020). The European regulation on resistance monitoring was recently updated. In the new regulation there are slight changes in the ranges of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for the study of resistance, in adaptation to the situation of AMR in the EU (EU Commission, 2020).

Regarding commensal bacteria used as AMR indicators, *Campylobacter* spp. are ubiquitous in various environments, but prefer the intestines of birds, which they colonize as commensals. The persistent presence of *Campylobacter* spp. that contaminates slaughterhouses and poultry products is known throughout the world and represents the main source of human infections. In addition, the increasing number of reports on antibiotic resistance of *Campylobacter* spp. (to fluoroquinolones, tetracycline,

## 6. Bibliographic Review

erythromycin and gentamicin) and their increased virulence are motivating greater control and reduction of the presence of *Campylobacter* spp. (Marotta *et al.*, 2015; Nowaczek *et al.*, 2019). Some examples of the high levels of AMR in *Campylobacter* can be the 89% resistance to tetracycline in Spanish broilers detected in 2016 (ECDC *et al.*, 2017), 61% in 2018 (EFSA & ECDC, 2020); or 93% resistance to ciprofloxacin detected in Spain in 2018 in *C. coli* (EFSA & ECDC, 2020). Ciprofloxacin is considered a critically important AM for the treatment of campylobacteriosis in humans (Urdahl *et al.*, 2018; WHO, 2019).

*E. coli* is a Gram negative bacillus common in the digestive tract of birds, which is widely disseminated with feces. At the time of slaughter, intestinal strains can contaminate poultry carcasses (Rouger *et al.*, 2017), in the same way, eggs become contaminated during laying (De Reu *et al.*, 2006; Lakhotia & Stephens, 1973). In addition, some strains are foodborne pathogens responsible for serious human disease throughout the world. Numerous studies provide evidence of significant AMR from *E. coli* isolates from farm-raised broilers, even without registered use of AM (Miles *et al.*, 2006). In 2018, 80% resistance to ciprofloxacin was detected in broilers in Spain, which was much higher than the EU average value (56%) (EFSA & ECDC, 2020).

*Enterococcus* spp. are commonly found in the commensal microbiota of terrestrial vertebrates. *Enterococcus* spp. have been associated with septicemia, endocarditis, and other diseases in poultry, but certain species, such as *Enterococcus faecalis* and *E. faecium*, are an important cause of opportunistic infections in humans. Despite their importance, the data on the prevalence of AMR in *Enterococcus* spp. are scarce, although it is included as an AMR indicator bacteria in the EU (EU Commission, 2013, 2020). The treatment of these infections in humans has been complicated due to the transmission of AMR enterococci (O'Dea *et al.*, 2019; Rehman *et al.*, 2018). The increasing prevalence of enterococci as a cause of nosocomial infections, along with clinical resistance to antibiotics of value to human medicine, is worrisome. The spread of resistant enterococci from animals to humans and the exchange of resistance genes between poultry and human enterococci has been demonstrated (Donabedian *et al.*, 2006; Van den Bogaard *et al.*, 2002).

Poultry is the world's main source of animal protein and one of the sectors of animal production that consumes the most antibiotics as growth promoters (Van Boeckel *et al.*, 2019; Van Boeckel *et al.*, 2015). The use of plant additives to improve animal health is a



## 6. Bibliographic Review

way to reduce the use of antibiotics and contribute to the prevention and reduction of AMR (Cubero Pablo *et al.*, 2020).

The poultry industry has been identified as a source of AMR bacteria that cause disease in humans, due to the wide presence of chicken meat and eggs in the diet, and the widely documented use of AMs within the poultry production cycle. AMR represents a serious threat to animal and public health. Foods of animal origin, including eggs, play a fundamental role in the transmission of genes and bacterial strains resistant to AMs.

Much of our knowledge and assumptions about the prevalence and evolution of AMR in poultry relate to commensal strains isolated from broilers. However, few studies have been performed regarding AMR profiles in commensal bacteria circulating in laying hens, and therefore little data are available. Because of this, sector-specific monitoring is imperative if effective measures adapted to the situation of AMR in animal production are to be taken.

### **6.3 Oregano (*Origanum vulgare* L.) and garlic (*Allium sativum*) as alternatives to zinc oxide and antibiotics in swine and poultry production**

In pig production, weaning is a critical period that highly influences the performance of animals in commercial farms. Practices such as mixing piglets of different origins, changes in nutrition and the environment, can negatively affect endocrine functions, growth and welfare of weaned piglets (Jayaraman & Nyachoti, 2017; Moberg & Mench, 2000; Srinongkote *et al.*, 2003b). Therefore, the time of weaning is a stressful period in which stress markers in saliva, such as cortisol, increase (Gupta *et al.*, 2007; Buckham Sporer *et al.*, 2008; Escribano *et al.*, 2019). Changes also occur in markers of oxidative stress and intestinal dysfunctions (Zhu *et al.*, 2012). Furthermore, mucosal inflammation, digestive performance and weight gain are also affected by early weaning (Pié *et al.*, 2004; Wijtten *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012).

To reduce the impact of these problems, the therapeutic addition of zinc, as ZnO (2000 to 4000 mg / kg), has been widely used during the post-weaning period, as it is effective in reducing diarrhea and digestive dysfunctions (Patel *et al.*, 2010; Sargeant, *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2013; Bonetti *et al.*, 2021). ZnO in high doses reduces the adhesion of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) K88 to human Caco-2 cells, and therefore, it decreases the immune response to cellular infection. ZnO also improves post-weaning performance and reduces the effects of post-weaning colibacillosis, inhibiting cAMP-

## 6. Bibliographic Review

stimulated chloride secretion (Hoque *et al.*, 2005). Li *et al.* (2001) observed an increase in thickness of the mucous cover, villi height, width, coefficient between height of the villi and depth of the crypt, and decrease of the depth of the crypt in the small intestine of pigs 33 days old (weaned at 21 days), after supplementing ZnO at a dose of 3000 mg / kg.

However, the use of ZnO at therapeutic levels has serious drawbacks, such as environmental contamination due to the high proportion excreted in faeces (Bonetti *et al.*, 2021; Kim *et al.*, 2012; Sargeant *et al.*, 2010) and its possible association with AMR (Cavaco *et al.*, 2010; 2011). These facts have led to the ban on its use at high doses from 2022 in the EU (Standing Committee on Veterinary Medicinal Products, 2017).

In response to the problems surrounding the use of ZnO, and due to its future restriction, research is being carried out to find economic and ecological alternatives, to contribute to the sustainability and resilience of the pig sector. Plant extracts are widely used as food additives to improve the productive performance of various animal species and represent a potential alternative to ZnO due to their properties (Allan & Bilkei, 2005; Rossi *et al.*, 2020). Some of these plant extracts that could be used as alternatives are oregano (*O. vulgare* L.) and garlic (*A. sativum*).

Oregano contains high concentrations of carvacrol and thymol (Pandey *et al.*, 2003; Teixeira *et al.*, 2013) that have demonstrated significant antimicrobial, antifungal and antioxidant activity in vitro (Cervato *et al.*, 2000; Dorman and Deans, 2000; Cattelan *et al.*, 2013). Furthermore, its use appears to improve growth performance in weaned pigs (Marcin *et al.*, 2006; Neill *et al.*, 2006), as well as in other species, such as lambs and broilers (Bampidis *et al.*, 2005; Hernandez *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2012). Furthermore, Zhang *et al.* (2015) showed that oregano could reduce serum cortisol levels and increase antioxidant enzyme activity after transport stress in pigs. Oregano Essential Oil (OEO) can be microencapsulated to improve its stability, preserve volatile compounds until consumed by animals, and ease handling and administration. Various materials are used for this purpose, such as sunflower oil (Bakry *et al.*, 2016).

On the other hand, garlic (*A. sativum*) has several beneficial effects, such as antibacterial, antiviral, antifungal, antioxidant and immunomodulatory activities (Amagase *et al.*, 2001; Sallam *et al.*, 2004; Aydin *et al.*, 2005; Amagase, 2006; Li *et al.*, 2016). The active compounds in garlic are the products of decomposition of sulfides such as alliin,

## 6. Bibliographic Review

diallylsulfides, and allicin (Amagase *et al.*, 2001; Cubero Pablo *et al.*, 2020). Several studies have shown that dietary garlic supplementation appears to improve the immune response and growth performance of pigs (Huang *et al.*, 2011; Tatara *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011). Horn *et al.* (2017) observed that supplementation with OEO could partially mitigate the effects of stress during the post-weaning period, by reducing serum cortisol levels, producing a positive effect on growth performance, intestinal function and antioxidant status. In addition, a study in chickens also showed a reduction in heat stress due to dietary garlic supplementation (Prieto & Campo, 2010). Anti-inflammatory effects of oregano and garlic have also been described in pigs (Wang *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2016).

Biomarkers of oxidative stress are used to assess stress in piglet serum (Buchet *et al.*, 2017; Luo *et al.*, 2016). However, in a study by Rubio *et al.* (2019), a non-invasive and relatively stress-free sample, such as saliva, was used to measure a panel of oxidative stress biomarkers in pigs. These biomarkers can be used to evaluate the effect of nutritional additives on oxidative stress and other parameters in the studied animals.

In relation to productive parameters, positive effects on average weight gain and on daily feed consumption have been described when low doses of fermented garlic are administered to piglets (Yan & Kim, 2013; Cho *et al.*, 2020). Furthermore, an improvement in body weight due to supplementation with garlic or garlic derived products has also been identified in pigs (Liu *et al.*, 2014; Tatara *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2011).

Also, beneficial effects of garlic in chickens have been observed, such as improvement in the palatability of feed that stimulates the appetite (Martín *et al.*, 2015). This results in higher food consumption and greater body weight gain (Revilla *et al.*, 2015; Rahman *et al.*, 2017). Garlic in the diet of broilers increases the speed of salivary flow and gastric juice secretion, which results in better digestibility and higher body weight (Kirubakaran *et al.*, 2016). The improvement in growth of broilers is attributed to the fructoligosaccharides (FOS) in garlic, since they help to maintain beneficial intestinal microorganisms and improve the absorption of nutrients (Brzóška *et al.*, 2015).

Allicin improves and regenerates the structure of the intestinal epithelium, and increases the depth of the crypt and the height of the villi, which increases digestive capacity through greater absorption and assimilation of nutrients (Adibmoradi *et al.*, 2006). In

## 6. Bibliographic Review

organically produced broilers, supplementation with 0.2% and 0.4% garlic increased body weight (Agulló *et al.*, 2016; Rojo *et al.*, 2016).

*A. sativum* as a dietary additive, improves intestinal homeostasis, creates a favorable intestinal environment for commensal microorganisms and reduces the multiplication of pathogens, improving poultry health and production (Kothari *et al.*, 2019; Peinado *et al.*, 2013; Ruiz *et al.*, 2015). It also reduces the *E. coli* count, promoting nutrient digestibility and increasing bird weight (Agulló *et al.*, 2016; Rojo *et al.*, 2016; Sheoran *et al.*, 2017).

In broilers, *A. sativum* additives in feed have shown antibacterial and antiparasitic effects in the infection by *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium perfringens* and *Eimeria acervulina*, due to the fact that they reduce the invasion of Enterobacteriaceae and the ability to form biofilms (Miralles *et al.*, 2014; Salem *et al.*, 2017). The aqueous extract of white garlic and purple garlic (*A. sativum*) inhibited the growth (MIC) of a wide variety of strains of *Salmonella* spp. resistant to multiple drugs and isolated in different animal species (Huertas *et al.*, 2014).

The addition of phyto-additives to feed improve the health and productive performance of animals and help achieve a sustainable development of the production. Both *A. sativum* and *O. vulgare* contain a wide variety of bioactive compounds (thymol, carvacrol, organosulfur compounds, flavonoids, saponins, fructans, fructo-oligosaccharides, etc.) that justify their usefulness as feed additives for animal production. They have a significant modulating effect on growth rates, metabolism, the intestinal ecosystem and immune response, especially under stress conditions. Their strategic application in feeding programs has been scarce, and standardized procedures must be developed to preserve and guarantee the activity and effectiveness of the bioactive compounds of these feed additives. At the same time, the use of these additives can be an effective substitute for the use of antibiotics and other compounds such as ZnO for the prevention of digestive problems in animal production. This reduction in the use of antibiotics would decrease the risk of development and maintenance of AMR in animal production, which is especially prevalent in Spain (EFSA & ECDC, 2020).

The reduction of the use of antibiotics and additives such as ZnO is a necessity, but it brings other challenges such as increased mortality and the decrease in profitability of animal production. This makes it necessary to look for alternatives to the use of these substances. Good practices in animal husbandry and the prevention of infectious diseases

## *6. Bibliographic Review*

through multifactorial measures, such as effective biosecurity and vaccination adapted to the diseases present in the region and in the production phase, are indispensable and cannot be replaced by the use of antibiotics. There is a positive association between the level of internal biosecurity and greater control of infectious diseases with less use of antibiotics (Collineau *et al.*, 2017). Therefore, it is necessary to employ a holistic approach to animal health, improving the health and welfare of animals on the farm, in combination with disease surveillance and the use of sustainable nutritional additives and treatments. This is financially beneficial and helps to minimize antibiotic use and resistance.



# **7. ARTÍCULOS**

**PUBLICADOS /**

**PUBLISHED PAPERS**





**7.1. Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018.**

- Revista: Preventive Veterinary Medicine
- Abstract: Antimicrobial Resistance (AMR) is a global threat for human and animal health. Few studies have been carried out on laying hens. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial susceptibility of commensal *Campylobacter* spp., *E. coli*, and *Enterococcus* spp. isolates in Spanish laying hens in 2018. Samples were collected from 39 laying hen farms. The microorganisms of interest were isolated and confirmed by PCR. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to antimicrobials of C and D categories were determined. 195 *E. coli*, 195 *Enterococcus* spp. and 25 *Campylobacter* spp. isolates were obtained. *E. coli* isolates showed high resistance to D category antimicrobials (sulfamethoxazole 76.41 %, tetracycline 62.05 %, trimethoprim 50.77 %, ampicillin 30.77 %) and lower resistance to C category (azithromycin 30.26 %, gentamicin 12.31 %, chloramphenicol 4.62 %). A 10.26 % of *E. coli* isolates were susceptible to all antimicrobials tested, Multi Drug Resistance (MDR) to 3 antimicrobial families was found in 23.08 % of the isolates and 13.85 % were MDR to 4 families, being Erythromycin-Sulfamethoxazole-Tetracycline the most common resistance profile (10.77 %). *Enterococcus* spp. showed very high resistance to D category tetracycline (78.47 %) and C category erythromycin (76.42 %). The 11.79 % of *Enterococcus* spp. isolates were susceptible to all antimicrobials and 53.33 % were resistant to 2 families, being Erythromycin-Tetracycline the most common AMR profile (51.79 %). Regarding *Campylobacter* spp., resistance to tetracycline (48 %) was higher than resistance to C category antimicrobials (erythromycin 28 %, streptomycin 24 %, gentamicin 16 %). There was a 52 % sensitivity to all tested antimicrobials and 24 % showed MDR to aminoglycosides, macrolides and tetracyclines (Gentamicin-Streptomycin-Erythromycin-Tetracycline MDR profile). Novel data on AMR in laying hen commensal isolates in Spain was provided. High

## *7.Artículos Publicados / Published Papers*

resistance to several antimicrobials was found, especially to key drugs for the treatment of zoonosis, which represents a public health risk. Better surveillance and careful regulation of antimicrobial use is required in laying hen production.

- URL: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2020.105222>

**7.2. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* Commensal Isolates from Laying Hen Farms in Spain.**

- Revista: Animals
- Abstract: Antimicrobial resistance (AMR) is a global threat for human and animal health. Few studies have been carried out in laying hens. We evaluated the antimicrobial susceptibility of commensal *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus faecalis* isolates in Spanish laying hens in 2018. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was used to identify any AMR of the studied isolates by means of a broth microdilution method. *C. jejuni* was highly resistant to the B category antimicrobials, and 52% of the isolates were susceptible to all the antimicrobials tested. *E. coli* showed medium and high percentages of resistance to the B and A antibiotic categories, respectively, and 33.33% of the isolates were susceptible to all antimicrobials. The *E. faecalis* resistance to A category antimicrobials was variable, and 4.62% of the isolates were susceptible to all antimicrobials. In our work, novel data on AMR in laying hen commensal isolates in Spain is provided, and the AMR levels differ from those reported for poultry in the EU. A high resistance to key drugs for human medicine was found, representing a public health risk.
- URL: <https://doi.org/10.3390/ani11051284>

### **7.3. Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets.**

- Revista: *Animals*
- Abstract: The effects of two different concentrations of micro capsuled oregano essential oil (OEO) and purple garlic powder on biomarkers of oxidative status, stress, and inflammation, as well as on average daily gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR), were evaluated in piglets during the postweaning period. The trial was carried out with 300 crossbred pigs of 21 days of age fed with different concentrations of OEO and purple garlic powder and ZnO. Saliva and serum samples were taken to evaluate a panel of biomarkers of oxidative status, stress, and inflammation. OEO and garlic powder at 0.4% did not produce significant changes in C-reactive protein (CRP) and cortisol and yielded higher levels of the antioxidant biomarker CUPRAC in serum than higher doses ( $p < 0.01$ ); they yielded a better ADG than the control and ZnO diets. OEO and garlic powder at higher concentrations than 0.4% showed higher concentrations of CRP ( $p < 0.05$ ). Overall, doses of OEO and garlic powder at 0.4% did not lead to inflammation, stress, or negative changes in oxidative biomarkers in piglets during the postweaning period and gave better productive performance than the control and ZnO diets. High doses of OEO and garlic powder were ineffective and could negatively affect the animals. Therefore, our results highlight the importance of the dose used when OEO or garlic are supplemented to piglets.
- URL: <https://doi.org/10.3390/ani10112093>

#### 7.4. Aportaciones del doctorando en las publicaciones incluidas en la presente tesis.

D. Jorge Rivera Gomis, doctorando del Grupo de Investigación E095-06 “Resistencia Antimicrobiana en Sanidad Animal” del Departamento de Sanidad Animal de la Universidad de Murcia, expone que su aportación en los siguientes artículos ha sido:

- Rivera-Gomis, Jorge, Marín, P., Otal, J., Galecio, J. S., Martínez-Conesa, C., & Cubero, M. J. (2021). Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018. *Preventive Veterinary Medicine*, 186(105222), 1–8.
  - Análisis de datos, obtención de resultados, redacción, edición y revisión del artículo.
- Rivera-Gomis, J., Marín, P., Martínez-Conesa, C., Otal, J., Jordán, M. J., Escudero, E., & Cubero, M. J. (2021). Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* commensal isolates from laying hen farms in Spain. *Animals*, 11(5).
  - Análisis de datos, obtención de resultados, redacción, edición y revisión del artículo.
- Rivera-Gomis, J., Rubio, C. P., Conesa, C. M., Salaverri, J. O., Cerón, J. J., Tortosa, D. E., & Pablo, M. J. C. (2020). Effects of dietary supplementation of garlic and oregano essential oil on biomarkers of oxidative status, stress and inflammation in postweaning piglets. *Animals*, 10(11), 1–17.
  - Toma de muestras, análisis de datos, obtención de resultados, redacción, edición y revisión del artículo.



# **8. RESUMEN**





La presente tesis doctoral se ha realizado en formato de compendio de publicaciones y está compuesta por tres artículos publicados en revistas internacionales (Q1). Todos los artículos constituyen una unidad científica, en el marco de la investigación sobre resistencia a los antimicrobianos en producción animal y al desarrollo de productos alternativos a los antimicrobianos y al óxido de zinc (ZnO).

Dos de las publicaciones se centraron en estudiar la presencia y caracterización de la resistencia a los antimicrobianos en bacterias comensales, presentes en granjas de aves de puesta en España. Esto se debió a la escasez de datos actuales en gallinas ponedoras, en contraste con otros sectores más estudiados y monitorizados a nivel español y europeo, como la producción avícola de carne. Durante la realización de estos trabajos, se estudió la resistencia a los antibióticos según las categorías establecidas por la Agencia Europea del Medicamento (EMA), prestando especial atención a la resistencia a antibióticos de especial importancia para medicina humana, con un enfoque de “Una Salud”.

El primer estudio trató sobre la resistencia a antibióticos de categorías C y D en *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. comensales en granjas de gallinas ponedoras españolas, que se determinó mediante la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se encontraron altos valores de resistencia a diversos antibióticos, incluyendo algunos de importancia para el tratamiento de zoonosis. Se encontraron valores de resistencia particularmente altos para la tetraciclina, familia tetraciclinas, de la categoría D, y para la eritromicina, familia macrólidos, de la categoría C.

El segundo estudio, se centró en la resistencia de *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* a antimicrobianos de las categorías A y B mediante determinación de la CMI. Se encontraron niveles de resistencia altos a medicamentos de importancia para medicina humana, y los niveles detectados fueron diferentes de los datos disponibles para aves de corral en España y en la UE. Hubo valores especialmente preocupantes para ciprofloxacino y ácido nalidíxico, familia quinolonas, de la categoría B, y para la tigeciclina, familia gliciliclinas, de la categoría A.

De los resultados de estos dos primeros trabajos se puede concluir que las granjas de gallinas ponedoras en España presentan niveles altos de resistencias a todas las categorías de antibióticos (A, B, C y D), incluyendo los usados en medicina humana. Esto supone un riesgo para la salud pública desde el punto de vista de “Una Salud”. Además, las

## 8. Resumen

diferencias encontradas entre la información previamente disponible y estos resultados, hacen evidente que son necesarios métodos de muestreo y monitorización más detallados para el sector de las gallinas ponedoras. Estas investigaciones suponen un avance hacia la correcta caracterización de las resistencias a los antimicrobianos en producción animal, que es esencial para permitir el diseño e implementación de medidas apropiadas, con el objetivo de prevenir el aumento de las resistencias y preservar la eficacia de los antimicrobianos.

En producción animal, el desarrollo de métodos y productos alternativos a los antibióticos es un paso esencial para prevenir y reducir la presencia de resistencias a los antimicrobianos. La producción porcina intensiva es uno de los principales sectores consumidores de antibióticos y productos con similares características como el ZnO. El destete de los lechones es uno de los puntos más críticos del ciclo productivo, y para prevenir problemas digestivos se suele usar el ZnO, que provoca graves problemas de contaminación ambiental y contribuye al aumento de las resistencias a los antimicrobianos.

En la tercera publicación de esta tesis, se estudiaron los efectos de suplementar moltura de ajo morado (*A. sativum*) y aceite esencial de orégano (*O. vulgare* L.) microencapsulado, sobre biomarcadores del estado oxidativo, estrés e inflamación, así como sobre la ganancia media diaria y el índice de conversión, en comparación con el ZnO y la dieta control, en lechones destetados. Las dosis de aceite esencial de orégano microencapsulado y moltura de ajo al 0,4% no provocaron inflamación, estrés o cambios negativos en los biomarcadores oxidativos en los lechones, y dieron un mejor rendimiento productivo que las dietas control y ZnO.

Estos resultados reflejan que los productos derivados del ajo y del orégano como aditivos en el pienso, gracias a sus propiedades beneficiosas, pueden contribuir a reducir la necesidad de usar antibióticos y ZnO en producción animal, permitiendo mantener los animales en un buen estado sanitario y productivo. Esto ayuda a reducir el uso de antimicrobianos y ZnO, contribuyendo a la sostenibilidad de la producción animal y a la protección de la salud animal, humana y medioambiental dentro de un contexto de “Una Salud”.

### 8.1 Objetivos

**PRIMERO:** Identificar a nivel nacional los niveles de resistencia a las distintas clases de antimicrobianos en bacterias comensales de gallinas de puesta, ya que es un sector para el que existe poca información, con respecto a las aves de carne y otros sectores de producción animal.

**SEGUNDO:** Generar información que permita establecer medidas dirigidas a reducir la resistencia a los antibióticos, principalmente para los de importancia en medicina humana. Esta información es valiosa para dirigir las medidas contra las resistencias a los antimicrobianos de forma específica, permitiendo tomar decisiones informadas y efectivas.

**TERCERO:** Poner en práctica el enfoque de “Una Salud”, ya que el estudio de las resistencias a los antimicrobianos es de importancia tanto para la producción y sanidad animal como para la salud pública y el medio ambiente.

**CUARTO:** Determinar, a nivel de granja comercial, el potencial del aceite esencial de orégano micro encapsulado y la moltura de ajo morado, como alternativas naturales al uso de óxido de zinc y al uso de antibióticos en ganadería porcina tras el destete. Identificar las concentraciones a las que son efectivos, sobre parámetros productivos y biomarcadores del estado oxidativo, el estrés y la inflamación.

**QUINTO:** Desarrollar un nuevo sistema de alimentación con compuestos activos naturales (aceite esencial de orégano micro encapsulado y/o moltura de ajo morado) para reducir o evitar el uso de óxido de zinc y antibióticos en el ganado porcino.

## **8.2 Estudio 1. Patrones de resistencia a antibióticos de categorías C y D para uso veterinario de aislados comensales de *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* y *Enterococcus* spp. de granjas de gallinas ponedoras en España durante 2018.**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza mundial para la salud humana y animal. Se han realizado pocos estudios sobre gallinas ponedoras. El objetivo de este trabajo fue evaluar la susceptibilidad a los antimicrobianos de *Campylobacter* spp., *E. coli* y *Enterococcus* spp. aislados en granjas de gallinas ponedoras españolas en 2018. Se recolectaron muestras de 39 granjas de gallinas ponedoras. Los microorganismos de interés se aislaron y confirmaron mediante PCR. Se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) de los antimicrobianos de las categorías C y D. Se obtuvieron los siguientes aislamientos: 195 *E. coli*, 195 *Enterococcus* spp. y 25 *Campylobacter* spp. Los aislados de *E. coli* mostraron una alta resistencia a los antimicrobianos de categoría D (sulfametoxazol 76,41%, tetraciclina 62,05%, trimetoprima 50,77%, ampicilina 30,77%) y menor resistencia a la categoría C (azitromicina 30,26%, gentamicina 12,31%, cloranfenicol 4,62%). Un 10,26% de los aislamientos de *E. coli* fueron susceptibles a todos los antimicrobianos testados, se encontró resistencia a múltiples AM (MRAM) a 3 familias de antimicrobianos en el 23,08% de los aislamientos, y 13,85% fueron MRAM a 4 familias, siendo Eritromicina-Sulfametoxazol-Tetraciclina el perfil de resistencia más común (10,77%). *Enterococcus* spp. mostraron una resistencia muy alta a la tetraciclina, de categoría D, (78,47%) y a la eritromicina, de categoría C, (76,42%). El 11,79% de *Enterococcus* spp. aislados fueron susceptibles a todos los antimicrobianos, y el 53,33% fueron resistentes a 2 familias, siendo Eritromicina-Tetraciclina el perfil de RAM más común (51,79%). Con respecto a *Campylobacter* spp., la resistencia a la tetraciclina (48%) fue mayor que la resistencia a los antimicrobianos de categoría C (eritromicina 28%, estreptomina 24%, gentamicina 16%). Hubo una sensibilidad a todos los antimicrobianos probados del 52%, y el 24% mostró MRAM a aminoglucósidos, macrólidos y tetraciclinas (perfil MRAM de Gentamicina-Estreptomina-Eritromicina-Tetraciclina). Con este trabajo se proporcionaron nuevos datos sobre la resistencia a los antimicrobianos en bacterias comensales aisladas de gallinas ponedoras en España. Se encontró alta resistencia a varios antimicrobianos, especialmente a medicamentos clave para el tratamiento de las zoonosis, lo que representa un riesgo para la salud pública. Se requiere una mejor vigilancia y una regulación cuidadosa del uso de antimicrobianos en la producción de gallinas ponedoras.

### **8.3 Estudio 2. Resistencia a los antimicrobianos de aislados comensales de *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* de granjas de gallinas de puesta en España.**

La resistencia a los antimicrobianos (RAM) es una amenaza mundial para la salud humana y animal. Se han realizado pocos estudios en gallinas ponedoras. En este trabajo se evaluó la susceptibilidad a los antimicrobianos de aislamientos comensales de *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* en gallinas ponedoras españolas en 2018. Se utilizó la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) para identificar cualquier RAM de los aislados estudiados mediante un método de microdilución en caldo. *C. jejuni* fue altamente resistente a los antimicrobianos de categoría B, y el 52% de los aislamientos fueron susceptibles a todos los antimicrobianos probados. *E. coli* mostró porcentajes medios y altos de resistencia a las categorías de antibióticos B y A, respectivamente, y el 33,33% de los aislamientos fueron susceptibles a todos los antimicrobianos. La resistencia de *E. faecalis* a los antimicrobianos de categoría A fue variable, y el 4,62% de los aislados fueron susceptibles a todos los antimicrobianos. En este trabajo, se proporcionan datos novedosos sobre RAM en aislados comensales de gallinas ponedoras en España, y los niveles de RAM difieren de los reportados para aves de corral en la UE. Se encontró una alta resistencia a medicamentos clave para la medicina humana, lo que representa un riesgo para la salud pública.

#### **8.4 Estudio 3. Efectos de la Suplementación Dietética de Ajo y Aceite Esencial de Orégano en Biomarcadores del Estado Oxidativo, Estrés e Inflamación en Lechones Post-destete.**

Se evaluaron los efectos de dos concentraciones diferentes de Aceite Esencial de Orégano micro-encapsulado (OEO) y ajo morado en polvo sobre biomarcadores del estado oxidativo, estrés e inflamación, así como sobre la Ganancia Media Diaria (GMD) y el Índice de Conversión (IC) en lechones post-destete. El ensayo se realizó con 300 cerdos híbridos de 21 días de edad alimentados con diferentes concentraciones de AEO, ajo morado en polvo y óxido de zinc (ZnO). Se tomaron muestras de saliva y suero para evaluar un panel de biomarcadores de estado oxidativo, estrés e inflamación. El AEO y el ajo en polvo al 0,4% no produjeron cambios significativos en Proteína C Reactiva (PCR) y cortisol, y produjeron niveles más altos del biomarcador antioxidante CUPRAC en suero que dosis más altas de estos aditivos ( $p < 0,01$ ); también dieron una mejor GMD que las dietas control y ZnO. El AEO y el ajo en polvo a concentraciones superiores al 0,4% mostraron concentraciones superiores de PCR ( $p < 0,05$ ). En general, las dosis de AEO y ajo en polvo al 0,4% no provocaron inflamación, estrés o cambios negativos en los biomarcadores oxidativos en lechones durante el período post-destete, y dieron un mejor rendimiento productivo que las dietas control y ZnO. Las dosis altas de AEO y ajo en polvo fueron ineficaces, y podrían afectar negativamente a los animales. Por tanto, nuestros resultados resaltan la importancia de la dosis utilizada cuando se suplementan AEO o ajo a lechones.

## 8.5 Conclusiones

**PRIMERA:** Las granjas españolas de gallinas ponedoras estudiadas presentan niveles preocupantes de resistencias antimicrobianas, para todas las categorías de antibióticos (A, B, C y D) según la clasificación para uso veterinario establecida por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Las opciones de tratamiento a nivel de granja podrían verse gravemente afectadas por la resistencia a los antimicrobianos y esto debe tenerse en cuenta al elegir el antimicrobiano y la dosis necesaria para tratar patologías en gallinas ponedoras.

**SEGUNDA:** Las cepas de *E. coli*, *Campylobacter* spp. y *Enterococcus* spp. que se encuentran en gallinas ponedoras representan una fuente de resistencias a los antimicrobianos para antibióticos utilizados en medicina humana, que podría alcanzar microorganismos patógenos que afectan a las personas, como *E. coli* patógeno, *Campylobacter* spp. y *Enterococcus* spp. Esto es importante desde la perspectiva de la Salud Pública y desde el enfoque de “Una Salud”.

**TERCERA:** Se necesita un método de muestreo y monitorización más detallado del sector de las gallinas ponedoras, tanto en España como a nivel de la UE. Los hallazgos en gallinas ponedoras fueron diferentes de la información disponible para el sector avícola de carne. Por lo tanto, se necesita una mayor representatividad de este sector en los programas contra las resistencias a los antibióticos, como el programa español PRAN (2022-2025), para implementar medidas de manera efectiva, ya que existe el riesgo de transmisión de resistencias a los antimicrobianos a los seres humanos desde las granjas de gallinas ponedoras a través del consumo de huevos, el contacto directo y la propagación ambiental de material genético y bacterias resistentes.

**CUARTA:** En producción porcina, la moltura de ajo morado y el aceite esencial de orégano micro-encapsulado son una herramienta útil para evitar el uso de ZnO en la dieta de los lechones. Estos aditivos mejoran el estado general de los animales, al reducir los niveles de biomarcadores relacionados con procesos inflamatorios y estrés, y mejoran el rendimiento productivo, respecto a los alimentados con ZnO o la dieta control. Al representar una alternativa al ZnO y reducir la necesidad de usar antimicrobianos, el uso de moltura de ajo morado y aceite esencial de orégano microencapsulado en producción animal contribuye a reducir la resistencia a los antimicrobianos.





# 9. SUMMARY



## 9. Summary

This PhD thesis has been written as a compendium of publications and is composed of three papers published in international journals (Q1). All the publications form a scientific unit within the framework of research on antimicrobial resistance in animal production and the development of alternative products to antimicrobials and zinc oxide (ZnO).

Two of the publications studied the presence and characterization of antimicrobial resistance in commensal bacteria in laying hens farms in Spain. These studies were carried out due to the scarcity of current data on laying hens, in contrast to other sectors more studied and monitored at the Spanish and European level, such as broiler production. In these studies, resistance to antibiotics was studied according to the categories established by the European Medicines Agency (EMA), paying special attention to antibiotics of special importance for human medicine, with a "One Health" approach.

The first study dealt with resistance to category C and D antibiotics in commensal *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. in Spanish laying hen farms, which was determined by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). High values of resistance to various antibiotics were found, including some important for the treatment of zoonoses. Particularly high resistance values were found for tetracycline, tetracyclines family, from category D, and for erythromycin, macrolides family, from category C.

The second study focused on the resistance of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* to antimicrobial categories A and B by determining the MIC. High levels of resistance were found to important drugs for human medicine, and the results were different from the data available for poultry in Spain and in the EU. There were values particularly concerning for ciprofloxacin and nalidixic acid, quinolone family, from category B, and for tigecycline, glycylcyclines family, from category A.

From the results of these two studies, it can be concluded that laying hen farms in Spain have high levels of resistance to all categories of antimicrobials (A, B, C and D), including those used in human medicine. This poses a risk to public health from a "One Health" perspective. Furthermore, the differences found between the information previously available and these results, evidence that more detailed sampling and monitoring methods are necessary for the laying hen sector. These investigations represent a step towards the correct characterization of antimicrobial resistance in animal production, which is essential to make possible the design and implementation of appropriate measures, with

## 9. Summary

the aim of preventing the increase in resistance and preserving the efficacy of antimicrobials.

The development of methods and products alternative to antibiotics is an essential step to prevent and reduce the presence of antimicrobial resistance in animal production. Intensive pig production is one of the main consumer sectors for antibiotics and products with similar characteristics such as ZnO. Weaning is one of the most critical points in the pig production cycle, and ZnO is often used to prevent digestive problems, which causes serious environmental pollution and contributes to the increase of resistance to antimicrobials. Due to these negative consequences, ZnO will be banned in the EU from June 2022.

In the third publication of this thesis, the effects of supplementing purple garlic (*A. sativum*) powder and micro-encapsulated oregano (*O. vulgare* L.) essential oil were studied on biomarkers of oxidative status, stress and inflammation, as well as on the average daily gain and the feed conversion index, compared to ZnO and the control diet, in weaned piglets. The doses of micro-encapsulated oregano essential oil and 0.4% garlic powder did not cause inflammation, stress or negative changes in oxidative biomarkers in piglets, and gave a better productive performance than the control and ZnO diets.

These results show that the products derived from garlic and oregano as feed additives, thanks to their beneficial properties, can allow to reduce the need of using antibiotics and ZnO in animal production, since they contribute to keep the animals in good sanitary and productive conditions. This helps to reduce the use of antimicrobials and ZnO, contributing to the sustainability of animal production and the protection of animal, human and environmental health within a “One Health” context.

### 9.1 Objectives

**FIRST:** To identify nationally the levels of resistance to the different classes of antimicrobials in commensal bacteria from laying hens, since it is a sector for which there is little information, in comparison with meat poultry and other sectors of animal production.

**SECOND:** To generate information that allows to establish measures directed to reduce resistance to antibiotics, mainly aimed at those of importance for human medicine. This information is valuable for targeting antimicrobial resistance measures specifically, making it possible to take informed and effective decisions.

**THIRD:** To put into practice the “One Health” approach, since the study of antimicrobial resistance is important for animal production and health, for public health and for the environment.

**FOURTH:** To determine, at the commercial farm level, the potential of micro-encapsulated oregano essential oil and purple garlic powder as natural alternatives to the use of zinc oxide and antibiotics in pig farming after weaning. To identify the concentrations at which they are effective, on productive parameters and biomarkers of oxidative status, stress and inflammation.

**FIFTH:** To develop a new feeding system with natural active compounds (micro-encapsulated oregano essential oil and / or purple garlic powder) to reduce or avoid the use of zinc oxide and antibiotics in pigs.

**9.2 Study 1. Resistance patterns to C and D antibiotic categories for veterinary use of *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. commensal isolates from laying hen farms in Spain during 2018.**

Antimicrobial Resistance (AMR) is a global threat for human and animal health. Few studies have been carried out on laying hens. The aim of this work was to evaluate the antimicrobial susceptibility of commensal *Campylobacter* spp., *E. coli*, and *Enterococcus* spp. isolates in Spanish laying hens in 2018. Samples were collected from 39 laying hen farms. The microorganisms of interest were isolated and confirmed by PCR. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) to antimicrobials of C and D categories were determined. 195 *E. coli*, 195 *Enterococcus* spp. and 25 *Campylobacter* spp. isolates were obtained. *E. coli* isolates showed high resistance to D category antimicrobials (sulfamethoxazole 76.41 %, tetracycline 62.05 %, trimethoprim 50.77 %, ampicillin 30.77 %) and lower resistance to C category (azithromycin 30.26 %, gentamicin 12.31 %, chloramphenicol 4.62 %). A 10.26 % of *E. coli* isolates were susceptible to all antimicrobials tested, Multi Drug Resistance (MDR) to 3 antimicrobial families was found in 23.08 % of the isolates and 13.85 % were MDR to 4 families, being Erythromycin-Sulfamethoxazole-Tetracycline the most common resistance profile (10.77 %). *Enterococcus* spp. showed very high resistance to D category tetracycline (78.47 %) and C category erythromycin (76.42 %). The 11.79 % of *Enterococcus* spp. isolates were susceptible to all antimicrobials and 53.33 % were resistant to 2 families, being Erythromycin-Tetracycline the most common AMR profile (51.79 %). Regarding *Campylobacter* spp., resistance to tetracycline (48 %) was higher than resistance to C category antimicrobials (erythromycin 28 %, streptomycin 24 %, gentamicin 16 %). There was a 52 % sensitivity to all tested antimicrobials and 24 % showed MDR to aminoglycosides, macrolides and tetracyclines (Gentamicin-Streptomycin-Erythromycin-Tetracycline MDR profile). Novel data on AMR in laying hen commensal isolates in Spain was provided. High resistance to several antimicrobials was found, especially to key drugs for the treatment of zoonosis, which represents a public health risk. Better surveillance and careful regulation of antimicrobial use is required in laying hen production.

### **9.3 Study 2. Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis* Commensal Isolates from Laying Hen Farms in Spain.**

Antimicrobial resistance (AMR) is a global threat for human and animal health. Few studies have been carried out in laying hens. We evaluated the antimicrobial susceptibility of commensal *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, and *Enterococcus faecalis* isolates in Spanish laying hens in 2018. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was used to identify any AMR of the studied isolates by means of a broth microdilution method. *C. jejuni* was highly resistant to the B category antimicrobials, and 52% of the isolates were susceptible to all the antimicrobials tested. *E. coli* showed medium and high percentages of resistance to the B and A antibiotic categories, respectively, and 33.33% of the isolates were susceptible to all antimicrobials. The *E. faecalis* resistance to A category antimicrobials was variable, and 4.62% of the isolates were susceptible to all antimicrobials. In our work, novel data on AMR in laying hen commensal isolates in Spain is provided, and the AMR levels differ from those reported for poultry in the EU. A high resistance to key drugs for human medicine was found, representing a public health risk.

#### **9.4 Study 3. Effects of Dietary Supplementation of Garlic and Oregano Essential Oil on Biomarkers of Oxidative Status, Stress and Inflammation in Postweaning Piglets.**

The effects of two different concentrations of micro capsuled oregano essential oil (OEO) and purple garlic powder on biomarkers of oxidative status, stress, and inflammation, as well as on average daily gain (ADG) and feed conversion ratio (FCR), were evaluated in piglets during the postweaning period. The trial was carried out with 300 crossbred pigs of 21 days of age fed with different concentrations of OEO and purple garlic powder and ZnO. Saliva and serum samples were taken to evaluate a panel of biomarkers of oxidative status, stress, and inflammation. OEO and garlic powder at 0.4% did not produce significant changes in C-reactive protein (CRP) and cortisol and yielded higher levels of the antioxidant biomarker CUPRAC in serum than higher doses ( $p < 0.01$ ); they yielded a better ADG than the control and ZnO diets. OEO and garlic powder at higher concentrations than 0.4% showed higher concentrations of CRP ( $p < 0.05$ ). Overall, doses of OEO and garlic powder at 0.4% did not lead to inflammation, stress, or negative changes in oxidative biomarkers in piglets during the postweaning period and gave better productive performance than the control and ZnO diets. High doses of OEO and garlic powder were ineffective and could negatively affect the animals. Therefore, our results highlight the importance of the dose used when OEO or garlic are supplemented to piglets.



## 9.5 Conclusions

**FIRST:** The Spanish laying hen farms studied presented worrisome levels of antimicrobial resistance (AMR), for all categories of antibiotics (A, B, C and D) according to the classification for veterinary use established by the European Medicines Agency (EMA). Treatment options at the farm level could be seriously affected by AMR and this should be taken into account when choosing the antimicrobial and the dose necessary to treat pathologies in laying hens.

**SECOND:** The strains of *E. coli*, *Campylobacter* spp. and *Enterococcus* spp. found in laying hens represent a source of AMR for antibiotics used in human medicine, which could reach pathogenic microorganisms that affect people, such as pathogenic *E. coli*, *Campylobacter* spp. and *Enterococcus* spp.. This is important from a Public Health perspective and from a “One Health” approach.

**THIRD:** A more detailed sampling and monitoring method is needed for the laying hen sector, both in Spain and at the EU level. The findings in laying hens differed from the information available for the meat poultry sector. Therefore, a better representation of this sector is needed in programs against antibiotic resistance, such as the Spanish PRAN program (2022-2025), to be able to implement measures effectively. There is a risk of transmission of AMR to humans from laying hen farms through the consumption of eggs, direct contact, and environmental spread of resistant bacteria and genetic material.

**FOURTH:** In swine production, purple garlic powder and micro-encapsulated oregano essential oil are a useful tool to avoid the use of ZnO in piglet diets. These additives improve the general condition of the animals, by reducing the levels of biomarkers related to inflammatory processes and stress, and improve the productive performance, compared to those fed with ZnO or the control diet. The use of purple garlic powder and micro-encapsulated oregano essential oil in animal production contributes to the reduction of AMR by representing an alternative to ZnO and reducing the need of antimicrobial use.



# 10. CONCLUSIONES



## 10. Conclusiones

**PRIMERA:** Las granjas españolas de gallinas ponedoras estudiadas presentan niveles preocupantes de resistencias antimicrobianas, para todas las categorías de antibióticos (A, B, C y D) según la clasificación para uso veterinario establecida por la Agencia Europea del Medicamento (EMA). Las opciones de tratamiento a nivel de granja podrían verse gravemente afectadas por la resistencia a los antimicrobianos y esto debe tenerse en cuenta al elegir el antimicrobiano y la dosis necesaria para tratar patologías en gallinas ponedoras.

**SEGUNDA:** Las cepas de *E. coli*, *Campylobacter* spp. y *Enterococcus* spp. que se encuentran en gallinas ponedoras representan una fuente de resistencias a los antimicrobianos para antibióticos utilizados en medicina humana, que podría alcanzar microorganismos patógenos que afectan a las personas, como *E. coli* patógeno, *Campylobacter* spp. y *Enterococcus* spp. Esto es importante desde la perspectiva de la Salud Pública y desde el enfoque de “Una Salud”.

**TERCERA:** Se necesita un método de muestreo y monitorización más detallado del sector de las gallinas ponedoras, tanto en España como a nivel de la UE. Los hallazgos en gallinas ponedoras fueron diferentes de la información disponible para el sector avícola de carne. Por lo tanto, se necesita una mayor representatividad de este sector en los programas contra las resistencias a los antibióticos, como el programa español PRAN (2022-2025), para implementar medidas de manera efectiva, ya que existe el riesgo de transmisión de resistencias a los antimicrobianos a los seres humanos desde las granjas de gallinas ponedoras a través del consumo de huevos, el contacto directo y la propagación ambiental de material genético y bacterias resistentes.

**CUARTA:** En producción porcina, la moltura de ajo morado y el aceite esencial de orégano micro-encapsulado son una herramienta útil para evitar el uso de ZnO en la dieta de los lechones. Estos aditivos mejoran el estado general de los animales, al reducir los niveles de biomarcadores relacionados con procesos inflamatorios y estrés, y mejoran el rendimiento productivo, respecto a los alimentados con ZnO o la dieta control. Al representar una alternativa al ZnO y reducir la necesidad de usar antimicrobianos, el uso de moltura de ajo morado y aceite esencial de orégano microencapsulado en producción animal contribuye a reducir la resistencia a los antimicrobianos.



# 11. CONCLUSIONS





## 11. Conclusions

**FIRST:** The Spanish laying hen farms studied presented worrisome levels of antimicrobial resistance, for all categories of antibiotics (A, B, C and D) according to the classification for veterinary use established by the European Medicines Agency. Treatment options at the farm level could be seriously affected by antimicrobial resistance and this should be taken into account when choosing the antimicrobial and the dose necessary to treat pathologies in laying hens.

**SECOND:** The strains of *E. coli*, *Campylobacter* spp. and *Enterococcus* spp. found in laying hens represent a source of antimicrobial resistance for antibiotics used in human medicine, which could reach pathogenic microorganisms that affect people, such as pathogenic *E. coli*, *Campylobacter* spp. and *Enterococcus* spp.. This is important from a Public Health perspective and from a “One Health” approach.

**THIRD:** A more detailed sampling and monitoring method is needed for the laying hen sector, both in Spain and at the EU level. The findings in laying hens differed from the information available for the meat poultry sector. Therefore, a better representation of this sector is needed in programs against antibiotic resistance, such as the Spanish PRAN program (2022-2025), to be able to implement measures effectively. There is a risk of transmission of antimicrobial resistance to humans from laying hen farms through the consumption of eggs, direct contact, and environmental spread of resistant bacteria and genetic material.

**FOURTH:** In swine production, purple garlic powder and micro-encapsulated oregano essential oil are a useful tool to avoid the use of ZnO in piglet diets. These additives improve the general condition of the animals, by reducing the levels of biomarkers related to inflammatory processes and stress, and improve the productive performance, compared to those fed with ZnO or the control diet. The use of purple garlic powder and micro-encapsulated oregano essential oil in animal production contributes to the reduction of antimicrobial resistance by representing an alternative to ZnO and reducing the need of antimicrobial use.



# **12. REFERENCIAS / REFERENCES**



## 12. Referencias / References

- Adibmoradi, M., Navidshad, B., Seifdavati, J., & Royan, M. (2006). Effect of dietary garlic meal on histological structure of small intestine in broiler chickens. *The Journal of Poultry Science*, 43(4), 378–383.
- Agulló, V., Miralles, A., Bernabé, A., & Cubero, M. J. (2016). Efectos sanitarios y productivos del ajo morado en avicultura industrial y ecológica. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 32, 75–125.
- Agunos, A., Léger, D., & Carson, C. (2012). Review of antimicrobial therapy of selected bacterial diseases in broiler chickens in Canada. *The Canadian Veterinary Journal*, 53(12), 1289.
- Allan, P., & Bilkei, G. (2005). Oregano improves reproductive performance of sows. *Theriogenology*, 63(3), 716–721.
- Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *The Journal of Nutrition*, 136(3), 716S-725S.
- Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of Nutrition*, 131(3), 955S-962S.
- Aydin, S., Başaran, A. A., & Başaran, N. (2005). Modulating effects of thyme and its major ingredients on oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(4), 1299–1305.  
<https://doi.org/10.1021/jf0402375>
- Bakry, A. M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M. Y., Mousa, A., & Liang, L. (2016). Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 15(1), 143–182.
- Bampidis, V. A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., Christaki, E., Spais, A. B., & Chatzopoulou, P. S. (2005). Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 121(3–4), 285–295.
- Bonetti, A., Tugnoli, B., Piva, A., & Grilli, E. (2021). Towards zero zinc oxide: Feeding strategies to manage post-weaning diarrhea in piglets. *Animals*, 11(3), 1–24.

## 12.Referencias / References

<https://doi.org/10.3390/ani11030642>

- Brzóska, F., Śliwiński, B., Michalik-Rutkowska, O., & Śliwa, J. (2015). The effect of garlic (*Allium sativum* L.) on growth performance, mortality rate, meat and blood parameters in broilers. *Annals of Animal Science*, *15*(4), 961–975.
- Buchet, A., Belloc, C., Leblanc-Maridor, M. M., & Merlot, E. (2017). Effects of age and weaning conditions on blood indicators of oxidative status in pigs. *PLoS ONE*, *12*(5), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178487>
- Buckham Sporer, K. R., Weber, P. S. D., Burton, J. L., Earley, B., & Crowe, M. A. (2008). Transportation of young beef bulls alters circulating physiological parameters that may be effective biomarkers of stress. *Journal of Animal Science*, *86*(6), 1325–1334.
- Capita, R., & Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *53*(1), 11–48. <https://doi.org/10.1080/10408398.2010.519837>
- Cattelan, M. G., de Castilhos, M. B. M., Sales, P. J. P., & Hoffmann, F. L. (2013). Antibacterial activity of oregano essential oil against foodborne pathogens. *Nutrition and Food Science*, *43*(2), 169–174. <https://doi.org/10.1108/00346651311313544>
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Aarestrup, F. M., Wagenaar, J. A., Graveland, H., Veldman, K., Mevius, D., Fetsch, A., Tenhagen, B. A., & Porrero, M. C. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Veterinary Microbiology*, *150*(3–4), 344–348.
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Stegger, M., Andersen, P. S., Skov, R., Fluit, A. C., Ito, T., & Aarestrup, F. M. (2010). Cloning and occurrence of *czrC*, a gene conferring cadmium and zinc resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *54*(9), 3605–3608.
- Cervato, G., Carabelli, M., Gervasio, S., Cittera, A., Cazzola, R., & Cestaro, B. (2000). Antioxidant properties of oregano (*Origanum vulgare*) leaf extracts. *Journal of Food Biochemistry*, *24*(6), 453–465.
- Cho, J., Liu, S., & Kim, I. H. (2020). Effects of dietary Korean aged garlic extract by

## 12. Referencias / References

- Leuconostoc mesenteroides KCCM35046 on growth performance, digestibility, blood profiles, gas emissions and microbiotain weanling pigs. *Canadian Journal of Animal Science*, 100, 462–469.
- Collineau, L., Rojo-Gimeno, C., Léger, A., Backhans, A., Loesken, S., Nielsen, E. O., Postma, M., Emanuelson, U., Beilage, E. G., Sjölund, M., Belloc, C., & Krebs, S. (2017). Herd-specific interventions to reduce antimicrobial usage in pig production without jeopardising technical and economic performance. *Preventive Veterinary Medicine*, 144, 167–178. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2017.05.023>
- Cubero Pablo, M. J., Rivera Gomis, J., Otal Salaverri, J., Bernabé Salazar, A., & Martín Atance, P. (2020). El ajo es un eficaz sustituto al uso de antibióticos para la alimentación avícola. *Albéitar*, 238, 16–18.
- De Reu, K., Grijspeerdt, K., Heyndrickx, M., Uyttendaele, M., Debevere, J., & Herman, L. (2006). Bacterial shell contamination in the egg collection chains of different housing systems for laying hens. *British Poultry Science*, 47(2), 163–172. <https://doi.org/10.1080/00071660600610773>
- Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry Science*, 84(4), 634–643. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>
- Donabedian, S. M., Perri, M. B., Vager, D., Hershberger, E., Malani, P., Simjee, S., Chow, J., Vergis, E. N., Muder, R. R., & Gay, K. (2006). Quinupristin-dalfopristin resistance in *Enterococcus faecium* isolates from humans, farm animals, and grocery store meat in the United States. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(9), 3361–3365.
- Dorman, H. J. D., & Deans, S. G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology*, 88(2), 308–316.
- ECDC. (2020). *Antimicrobial resistance surveillance in the EU/EEA (EARS-Net). Annual Epidemiological Report for 2019*.
- ECDC, EFSA, & EMA. (2017). ECDC/EFSA/EMA second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals:

## 12.Referencias / References

- Joint Interagency Antimicrobial Consumption and Resistan. *EFSA Journal*, 15(7), e04872.
- EFSA, & ECDC. (2020). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal*, 18(3), e06007.
- EMA. (2019). *EMA/CVMP/CHMP/682198/2017 Categorisation of antibiotics in the European Union. Answer to the request from the European Commission for updating the scientific advice on the impact on public health and animal health of the use of antibiotics in animals.* (pp. 1–73). European Medicines Agency London, UK.
- Escribano, D., Ko, H. L., Chong, Q., Llonch, L., Manteca, X., & Llonch, P. (2019). Salivary biomarkers to monitor stress due to aggression after weaning in piglets. *Research in Veterinary Science*, 123(October 2018), 178–183.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2019.01.014>
- ESVAC. (2021). *No Title*. <https://www.ema.europa.eu/en/veterinary-regulatory/overview/antimicrobial-resistance/european-surveillance-veterinary-antimicrobial-consumption-esvac#annual-report-on-sales-of-veterinary-antibiotics-section>
- EU Commission. (2003). Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union L*, 268, 29–43.
- EU Commission. (2013). Commission implementing decision 2013/652/EU of 12 November 2013 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria. *Official Journal of the European Union L*, 303, 26–39.
- EU Commission. (2020). Commission Implementing Decision (EU) 2020/1729 of 17 November 2020 on the monitoring and reporting of antimicrobial resistance in zoonotic and commensal bacteria and repealing Implementing Decision 2013/652/EU. *Official Journal of the European Union L*, 387, 8–21.
- European Parliament. (2016). Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on transmissible animal diseases and



## 12.Referencias / References

- amending and repealing certain acts in the area of animal health ('Animal Health Law'). *Official Journal of the European Union L*, 84, 1–208.
- European Parliament. (2019). Regulation (EU) 2019/6 of the European Parliament and of the Council of 11 December 2018 on veterinary medicinal products and repealing Directive 2001/82/EC. *Official Journal of the European Union L*, 4, 43–167.
- Gupta, S., Earley, B., & Crowe, M. A. (2007). Effect of 12-hour road transportation on physiological, immunological and haematological parameters in bulls housed at different space allowances. *The Veterinary Journal*, 173(3), 605–616.
- Hernandez, F., Madrid, J., Garcia, V., Orengo, J., & Megias, M. D. (2004). Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. *Poultry Science*, 83(2), 169–174.
- Hong, J.-C., Steiner, T., Aufy, A., & Lien, T.-F. (2012). Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. *Livestock Science*, 144(3), 253–262.
- Hoque, K. M., Rajendran, V. M., & Binder, H. J. (2005). Zinc inhibits cAMP-stimulated Cl secretion via basolateral K-channel blockade in rat ileum. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 288(5), G956–G963.
- Horn, N., Miller, G., Ajuwon, K. M., & Adeola, O. (2017). Ability of garlic-derived diallyl disulfide and diallyl trisulfide supplemented by oral gavage to mitigate effects of an acute postweaning feed and water deprivation event in nursery pigs. *Journal of Animal Science*, 95(8), 3579. <https://doi.org/10.2527/jas2017.1545>
- Hu, C., Song, J., Li, Y., Luan, Z., & Zhu, K. (2013). Diosmectite–zinc oxide composite improves intestinal barrier function, modulates expression of pro-inflammatory cytokines and tight junction protein in early weaned pigs. *British Journal of Nutrition*, 110(4), 681–688.
- Huang, R. H., Qiu, X. S., Shi, F. X., Hughes, C. L., Lu, Z. F., & Zhu, W. Y. (2011). Effects of dietary allicin on health and growth performance of weanling piglets and reduction in attractiveness of faeces to flies. *Animal*, 5(2), 304–311.

## 12. Referencias / References

- Huertas, B., De Frutos, C., Astorga, R., Martín, P., Miralles, A., & Cubero, M. J. (2014). Sensibilidad in vitro de cepas de Salmonella spp. frente al extracto acuoso de ajo blanco y ajo morado (*Allium sativum*). *Resúmenes Del XIX Simposio Anual de Asociación de Veterinarios Especialistas En Diagnóstico Laboratorial (AVEDILA) 13-14 November*.
- Jayaraman, B., & Nyachoti, C. M. (2017). Husbandry practices and gut health outcomes in weaned piglets: A review. *Animal Nutrition*, 3(3), 205–211. <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.002>
- Kim, J. C., Hansen, C. F., Mullan, B. P., & Pluske, J. R. (2012). Nutrition and pathology of weaner pigs: nutritional strategies to support barrier function in the gastrointestinal tract. *Animal Feed Science and Technology*, 173(1–2), 3–16.
- Kim, W. H., & Lillehoj, H. S. (2019). Immunity, immunomodulation, and antibiotic alternatives to maximize the genetic potential of poultry for growth and disease response. *Animal Feed Science and Technology*, 250, 41–50.
- Kirubakaran, A., Moorthy, M., Chitra, R., & Prabakar, G. (2016). Influence of combinations of fenugreek, garlic, and black pepper powder on production traits of the broilers. *Veterinary World*, 9(5), 470.
- Kothari, D., Lee, W.-D., Niu, K.-M., & Kim, S.-K. (2019). The Genus *Allium* as Poultry Feed Additive: A Review. *Animals*, 9(12), 1032.
- Lakhotia, R. L., & Stephens, J. F. (1973). Drug resistance and R factors among enterobacteria isolated from eggs. *Poultry Science*, 52(5), 1955–1962.
- Landoni, M. F., & Albarellos, G. (2015). The use of antimicrobial agents in broiler chickens. *The Veterinary Journal*, 205(1), 21–27.
- Li, B. T., Van Kessel, A. G., Caine, W. R., Huang, S. X., & Kirkwood, R. N. (2001). Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and feces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. *Canadian Journal of Animal Science*, 81(4), 511–516.
- Li, W.-R., Shi, Q.-S., Dai, H.-Q., Liang, Q., Xie, X.-B., Huang, X.-M., Zhao, G.-Z., & Zhang, L.-X. (2016). Antifungal activity, kinetics and molecular mechanism of action of garlic oil against *Candida albicans*. *Scientific Reports*, 6, 22805.

## 12.Referencias / References

- Liu, Y., Song, M., Che, T. M., Lee, J. J., Bravo, D., Maddox, C. W., & Pettigrew, J. E. (2014). Dietary plant extracts modulate gene expression profiles in ileal mucosa of weaned pigs after an *Escherichia coli* infection. *Journal of Animal Science*, *92*(5), 2050–2062.
- Luo, Z., Zhu, W., Guo, Q., Luo, W., Zhang, J., Xu, W., & Xu, J. (2016). Weaning Induced Hepatic Oxidative Stress, Apoptosis, and Aminotransferases through MAPK Signaling Pathways in Piglets. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/4768541>
- Marcin, A., Lauková, A., & Mati, R. (2006). Comparison of the effects of *Enterococcus faecium* and aromatic oils from sage and oregano on growth performance and diarrhoeal diseases of weaned pigs. *Biologia*, *61*(6), 789–795.
- Marotta, F., Garofolo, G., Di Donato, G., Aprea, G., Platone, I., Cianciavichia, S., Alessiani, A., & Di Giannatale, E. (2015). Population diversity of *Campylobacter jejuni* in poultry and its dynamic of contamination in chicken meat. *BioMed Research International*, *2015*, 1–10.
- Marshall, B. M., & Levy, S. B. (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, *24*(4), 718–733.
- Martín, P., Miralles, A., Otaol, J., Palacios, C., Alvarez, S., Revilla, I., León, L., & Cubero, M. J. (2015). Efecto sobre el crecimiento de pollos en producción ecológica de la incorporación en la dieta de moltura de ajo (*ZooAllium®*). *AIDA XVI Jornadas Sobre Producción Animal, Tomo I*, 266–268.
- McEwen, S. A., & Collignon, P. J. (2018). Antimicrobial resistance: a one health perspective. *Microbiology Spectrum*, *6*(2), 521–547.
- Mehdi, Y., Létourneau-Montminy, M.-P., Gaucher, M.-L., Chorfi, Y., Suresh, G., Rouissi, T., Brar, S. K., Côté, C., Ramirez, A. A., & Godbout, S. (2018). Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Animal Nutrition*, *4*(2), 170–178.
- Miles, T. D., McLaughlin, W., & Brown, P. D. (2006). Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from broiler chickens and humans. *BMC Veterinary Research*, *2*(1), 7.

## 12. Referencias / References

- Miralles, A., Otal, J., Palacios, C., Martín, P., León, L., & Cubero, M. J. (2014). Evaluación in vivo de la actividad antibacteriana y promotora del crecimiento de la moltura de ajo (ZooAllium) en pollos ecológicos. *Resúmenes Del XIX Simposio Anual de Asociación de Veterinarios Especialistas En Diagnóstico Laboratorial (AVEDILA) 13-14 November*.
- Miranda, J. M., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Barros-Velázquez, J., Cepeda, A., & Franco, C. M. (2008). Evolution of resistance in poultry intestinal *Escherichia coli* during three commonly used antimicrobial therapeutic treatments in poultry. *Poultry Science*, *87*(8), 1643–1648.
- Moberg, G. P., & Mench, J. A. (2000). *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI.  
<https://doi.org/10.1079/9780851993591.0000>
- Mughini-Gras, L., Dorado-García, A., van Duijkeren, E., van den Bunt, G., Dierikx, C. M., Bonten, M. J. M., Bootsma, M. C. J., Schmitt, H., Hald, T., Evers, E. G., Mevius, D. J., & Heederik, D. J. J. (2019). Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing  $\beta$ -lactam antibiotic resistance genes: a population-based modelling study. *The Lancet Planetary Health*, *3*(8), e357–e369. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(19\)30130-5](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(19)30130-5)
- Neill, C. R., Nelssen, J. L., Tokach, M. D., Goodband, R. D., DeRouchey, J. M., Dritz, S. S., Groesbeck, C. N., & Brown, K. R. (2006). Effects of oregano oil on growth performance of nursery pigs. *Journal of Swine Health and Production*, *14*(6), 312–316.
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., & Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial resistance in bacterial poultry pathogens: a review. *Frontiers in Veterinary Science*, *4*, 126.
- Nowaczek, A., Urban-Chmiel, R., Dec, M., Puchalski, A., Stępień-Pyśniak, D., Marek, A., & Pyzik, E. (2019). *Campylobacter* spp. and bacteriophages from broiler chickens: Characterization of antibiotic susceptibility profiles and lytic bacteriophages. *Microbiology Open*, *8*(7), e00784.
- O’Dea, M., Sahibzada, S., Jordan, D., Laird, T., Lee, T., Hewson, K., Pang, S., Abraham, R., Coombs, G. W., & Harris, T. (2019). Genomic, antimicrobial

## 12.Referencias / References

- resistance, and public health insights into *Enterococcus* spp. from Australian chickens. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(8), e00319-19.
- Page, S. W., & Gautier, P. (2012). Use of antimicrobial agents in livestock. *Revue Scientifique et Technique-OIE*, 31(1), 145.
- Pandey, A. K., Rai, M. K., & Acharya, D. (2003). Chemical composition and antimycotic activity of the essential oils of corn mint (*Mentha arvensis*) and lemon grass (*Cymbopogon flexuosus*) against human pathogenic fungi. *Pharmaceutical Biology*, 41(6), 421–425.
- Patel, A., Mamtani, M., Dibley, M. J., Badhoniya, N., & Kulkarni, H. (2010). Therapeutic value of zinc supplementation in acute and persistent diarrhea: a systematic review. *PLoS One*, 5(4), 1–10.
- Peinado, M. J., Ruiz, R., Echávarri, A., Aranda-Olmedo, I., & Rubio, L. A. (2013). Garlic derivative PTS-O modulates intestinal microbiota composition and improves digestibility in growing broiler chickens. *Animal Feed Science and Technology*, 181(1–4), 87–92.
- Pié, S., Lallès, J. P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B., & Oswald, I. P. (2004). Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *The Journal of Nutrition*, 134(3), 641–647.  
<https://doi.org/10.1093/jn/134.3.641>
- PRAN programme. (2021). <http://resistenciaantibioticos.es/en>
- Prieto, M. T., & Campo, J. L. (2010). Effect of heat and several additives related to stress levels on fluctuating asymmetry, heterophil: lymphocyte ratio, and tonic immobility duration in White Leghorn chicks. *Poultry Science*, 89(10), 2071–2077.
- Rahman, S., Khan, S., Chand, N., Sadique, U., & Khan, R. U. (2017). In vivo effects of *Allium cepa* L. on the selected gut microflora and intestinal histomorphology in broiler. *Acta Histochemica*, 119(5), 446–450.
- Rehman, M. A., Yin, X., Zaheer, R., Goji, N., Amoako, K. K., McAllister, T., Pritchard, J., Topp, E., & Diarra, M. S. (2018). Genotypes and phenotypes of *Enterococci* isolated from broiler chickens. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2, 83.
- Revilla, I., Martín, P., Miralles, A., Otal, J., Palacios, C., Alvarez, S., León, L., &

## 12. Referencias / References

- Cubero, M. J. (2015). Modificación de la calidad de la carne de pollo de producción ecológica debida a la adición de moltura de ajo (ZooAllium®). *AIDA XVI Jornadas Sobre Producción Animal, Tomo II*, 702–704.
- Rojo, E., Miralles, A., Bernabé, A., & Cubero, M. J. (2016). Efecto del ajo morado en el rendimiento productivo y en la salud intestinal de pollos de engorde en producción industrial y ecológica. *Anales de Veterinaria de Murcia*, 32, 101–103.
- Rossi, B., Toschi, A., Piva, A., & Grilli, E. (2020). Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutrition Research Reviews*, 33(2), 218–234. <https://doi.org/10.1017/S0954422420000013>
- Roth, N., Käsbohrer, A., Mayrhofer, S., Zitz, U., Hofacre, C., & Domig, K. J. (2019). The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview. *Poultry Science*, 98(4), 1791–1804.
- Rouger, A., Tresse, O., & Zagorec, M. (2017). Bacterial contaminants of poultry meat: Sources, species, and dynamics. *Microorganisms*, 5(3), 1–16. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5030050>
- Rubio, C. P., Mainau, E., Cerón, J. J., Contreras-Aguilar, M. D., Martínez-Subiela, S., Navarro, E., Tecles, F., Manteca, X., & Escribano, D. (2019). Biomarkers of oxidative stress in saliva in pigs: Analytical validation and changes in lactation. *BMC Veterinary Research*, 15(1), 144. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1875-z>
- Ruiz, R., Peinado, M. J., Aranda-Olmedo, I., Abecia, L., Suárez-Pereira, E., Ortiz Mellet, C., Garcia Fernandez, J. M., & Rubio, L. A. (2015). Effects of feed additives on ileal mucosa-associated microbiota composition of broiler chickens. *Journal of Animal Science*, 93(7), 3410–3420.
- Salem, W. M., El-Hamed, D. M. W. S., Sayed, W., & Elamary, R. (2017). Alterations in virulence and antibiotic resistant genes of multidrug-resistant *Salmonella* serovars isolated from poultry: The bactericidal efficacy of *Allium sativum*. *Microbial Pathogenesis*, 108, 91–100.
- Sallam, K. I., Ishioroshi, M., & Samejima, K. (2004). Antioxidant and antimicrobial effects of garlic in chicken sausage. *LWT - Food Science and Technology*, 37(8),

## 12.Referencias / References

- 849–855. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.04.001>
- Sargeant, H. R., McDowall, K. J., Miller, H. M., & Shaw, M.-A. (2010). Dietary zinc oxide affects the expression of genes associated with inflammation: transcriptome analysis in piglets challenged with ETEC K88. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *137*(1–2), 120–129.
- Sargeant, H. R., Miller, H. M., & Shaw, M.-A. (2011). Inflammatory response of porcine epithelial IPEC J2 cells to enterotoxigenic E. coli infection is modulated by zinc supplementation. *Molecular Immunology*, *48*(15–16), 2113–2121.
- Sheoran, N., Kumar, R., Kumar, A., Batra, K., Sihag, S., Maan, S., & Maan, N. S. (2017). Nutrigenomic evaluation of garlic (*Allium sativum*) and holy basil (*Ocimum sanctum*) leaf powder supplementation on growth performance and immune characteristics in broilers. *Veterinary World*, *10*(1), 121.
- Srinongkote, S., Smriga, M., Nakagawa, K., & Toride, Y. (2003a). A diet fortified with L-lysine and L-arginine reduces plasma cortisol and blocks anxiogenic response to transportation in pigs. *Nutritional Neuroscience*, *6*(5), 283–289.  
<https://doi.org/10.1080/10284150310001614661>
- Srinongkote, S., Smriga, M., Nakagawa, K., & Toride, Y. (2003b). A diet fortified with L-lysine and L-arginine reduces plasma cortisol and blocks anxiogenic response to transportation in pigs. *Nutritional Neuroscience*, *6*(5), 283–289.
- Standing Committee on Veterinary Medicinal Products., (2017). (2017). *Brussels, 26.6.2017 C(2017) 4529 final*. [https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170626136754/dec\\_136754\\_en.pdf](https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/2017/20170626136754/dec_136754_en.pdf)
- Suresh, G., Das, R. K., Kaur Brar, S., Rouissi, T., Avalos Ramirez, A., Chorfi, Y., & Godbout, S. (2018). Alternatives to antibiotics in poultry feed: molecular perspectives. *Critical Reviews in Microbiology*, *44*(3), 318–335.
- Tatara, M. R., Sliwa, E., Dudek, K., Gawron, A., Piersiak, T., Dobrowolski, P., Mosiewicz, J., Siwicki, A., & Studzinski, T. (2008). Aged garlic extract and allicin improve performance and gastrointestinal tract development of piglets reared in artificial sow. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, *15*(1), 63–69.
- Teixeira, B., Marques, A., Ramos, C., Serrano, C., Matos, O., Neng, N. R., Nogueira, J.

## 12.Referencias / References

- M. F., Saraiva, J. A., & Nunes, M. L. (2013). Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(11), 2707–2714.  
<https://doi.org/10.1002/jsfa.6089>
- Toghyani, M., Toghyani, M., Gheisari, A., Ghalamkari, G., & Eghbalsaied, S. (2011). Evaluation of cinnamon and garlic as antibiotic growth promoter substitutions on performance, immune responses, serum biochemical and haematological parameters in broiler chicks. *Livestock Science*, *138*(1–3), 167–173.
- Urdahl, A.M., Norstrom, M., Bergsjø, B., and Grøntvedt, C. A. (2018). *The surveillance programme for methicillin resistant Staphylococcus aureus in pigs in Norway 2017. Surveillance programmes for terrestrial and aquatic animals in Norway. Annual Report 2017.*
- Van Boeckel, T.P., Pires, J., Silvester, R., Zhao, C., Song, J., Criscuolo, N. G., Gilbert, M., Bonhoeffer, S., & Laxminarayan, R. (2019). Global trends in antimicrobial resistance in animals in low and middle income countries. *Science*, *365*(6459).  
<https://doi.org/10.1126/science.aaw1944>
- Van Boeckel, Thomas P, Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., Teillant, A., & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *112*(18), 5649–5654.
- Van den Bogaard, A. E., Hazen, M., Hoyer, M., Oostenbach, P., & Stobberingh, E. E. (2002). Effects of Flavophospholipol on Resistance in Fecal *Escherichia coli* and *Enterococci* of Fattening Pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *46*(1), 110–118.
- Wallmann, J. (2006). Monitoring of antimicrobial resistance in pathogenic bacteria from livestock animals. *International Journal of Medical Microbiology*, *296*, 81–86.
- Wang, J. P., Yoo, J. S., Jang, H. D., Lee, J. H., Cho, J. H., & Kim, I. H. (2011). Effect of dietary fermented garlic by *Weissella koreensis* powder on growth performance, blood characteristics, and immune response of growing pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science*, *89*(7), 2123–2131.  
<https://doi.org/10.2527/jas.2010-3186>



## 12. Referencias / References

- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 439–445.
- WHO. (2017). *World Health Organization Critically Important Antimicrobials for Human Medicine—5th Revision*. World Health Organization.
- WHO. (2019). *Critically important antimicrobials for human medicine: 6th revision*. World Health Organization.
- WHO. (2021). *Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System (GLASS) Report: 2021*. World Health Organization.
- Wijtten, P. J. A., van der Meulen, J., & Verstegen, M. W. A. (2011). Intestinal barrier function and absorption in pigs after weaning: a review. *British Journal of Nutrition*, 105(7), 967–981.
- Yan, L., & Kim, I. H. (2013). Effects of dietary supplementation of fermented garlic powder on growth performance, apparent total tract digestibility, blood characteristics and faecal microbial concentration in weanling pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(3), 457–464.
- Zhang, T., Zhou, Y. F., Zou, Y., Hu, X. M., Zheng, L. F., Wei, H. K., Giannenas, I., Jin, L. Z., Peng, J., & Jiang, S. W. (2015a). Effects of dietary oregano essential oil supplementation on the stress response, antioxidative capacity, and HSPs mRNA expression of transported pigs. *Livestock Science*, 180, 143–149.
- Zhang, T., Zhou, Y. F., Zou, Y., Hu, X. M., Zheng, L. F., Wei, H. K., Giannenas, I., Jin, L. Z., Peng, J., & Jiang, S. W. (2015b). Effects of dietary oregano essential oil supplementation on the stress response, antioxidative capacity, and HSPs mRNA expression of transported pigs. *Livestock Science*, 180, 143–149.  
<https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2015.05.037>
- Zhu, H., Jia, Z., Misra, H., & Li, Y. R. (2012). Oxidative stress and redox signaling mechanisms of alcoholic liver disease: updated experimental and clinical evidence. *Journal of Digestive Diseases*, 13(3), 133–142.
- Zou, Y., Xiang, Q., Wang, J., Peng, J., & Wei, H. (2016). Oregano essential oil improves intestinal morphology and expression of tight junction proteins associated with modulation of selected intestinal bacteria and immune status in a

## *12.Referencias / References*

pig model. *BioMed Research International*, 2016.

<https://doi.org/10.1155/2016/5436738>

# 13. APÉNDICES



### 13.1. Estancias de investigación en el extranjero

Estancia:

- Centro de investigación y Departamento de destino: The University of Nottingham (Reino Unido), School of Veterinary Medicine and Science, Centre for Evidence-based Veterinary Medicine (CEVM).
- Fechas de estancia: 20/04/2021 - 23/07/2021 (3 meses).
- Investigador Responsable: Dr. Marnie Brennan
- Objetivos científicos:
  - Adquisición de competencias en la realización de revisiones bibliográficas estructuradas mediante la asistencia a clases sobre Medicina Veterinaria Basada en la Evidencia (EVM), a reuniones mensuales del equipo de investigación del CEVM y a un curso impartido por Dr. Marnie Brennan sobre búsqueda bibliográfica, preguntas PICO, creación y evaluación crítica de bibliografía.
  - Realización de una BestBET.

### 13.2. Comunicaciones a congresos internacionales derivadas de esta tesis doctoral

- **Rivera-Gomis, J.,** Martínez, C., Otal, J., Jordán, M.J., Sotomayor, J.A. & Cubero, M.J. (2020) *E. coli* antimicrobial resistance in Spanish laying hens farms in 2018. SVEPM 2020 Conference, 12th May-16th June 2020, Online.
- **Rivera-Gomis, J.,** Marín, P., Martínez, C., Otal, J., Jordán, M.J., Escudero, E. & Cubero, M.J. (2021) *Enterococcus faecalis* antimicrobial resistance to antibiotics of high public health risk in Spanish laying hens farms in 2018. SVEPM 2021 Conference, 24th-26th March 2021, Online.
- **Rivera-Gomis, J.,** Cubero, M.J. & Gallego, M.C. (2021) Aprendizaje de la comunicación en sanidad animal a través de la fake new radiofónica: las alertas sanitarias veterinarias. I Congreso Internacional de Calidad e Innovación Docente en Ciencias de la Salud, 20th-21st April 2021, Online.

### 13.3. Publicaciones en revistas nacionales

- Cubero Pablo, M.J., **Rivera Gomis, J.**, Otal Salaverri, J., Bernabé Salazar, A. & Martín Atance, P. (2020) El ajo es un eficaz sustituto al uso de antibióticos para la alimentación avícola. *Albétar*, 238, 16-18.
- **Rivera Gomis J.** & Cubero Pablo, M.J. (2019) Entrevista sobre el proyecto “Nueva estrategia alimentaria natural para minimizar el uso de antibióticos en ganado porcino” Parte 1. *Portal Veterinaria*, online, 11 de abril 2019. <https://www.portalveterinaria.com/articulo.php?id=30905&anteprema=1>
- **Rivera Gomis J.** & Cubero Pablo, M.J. (2019) Entrevista sobre el proyecto “Nueva estrategia alimentaria natural para minimizar el uso de antibióticos en ganado porcino” Parte 2. *Portal Veterinaria*, online, 12 de abril 2019. <https://www.portalveterinaria.com/porcino/actualidad/30906/nuestro-proyecto-establecera-un-proceso-de-alimentacion-porcina-innovador-con-productos-naturales.html>
- Martínez Conesa, C., Tornel, J.A., **Rivera Gomis, J.**, Cubero Pablo, M.J. (2021) El IMIDA y la UMU logran minimizar el uso de antibióticos en cerdos con una alimentación basada en compuestos activos naturales. Actualidad Informativa Región de Murcia 21 de julio 2021. [www.carm.es](http://www.carm.es)

#### 13.4. Conferencias y Jornadas

- **Rivera-Gomis, J.** (2021) Medicina Preventiva en Apicultura. Dentro de la *Venia Docendi* en la Asignatura de Medicina Preventiva y Política Sanitaria. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 29 de noviembre 2021, Murcia.
- **Rivera-Gomis, J.**, Cubero, M.J. & Gallego, M.C. (2021) Participatory teaching methodologies for a common goal. One Health and Sustainable Development Goals as a possible horizon for the future veterinarian”. ICEAS II Conference, 7-8 de junio 2021, Online.
- **Rivera-Gomis, J.**, Martínez Conesa, C., Bernabé Salazar, A., Cubero Pablo, M.J. (2020) Uso de aditivos vegetales como alternativas al uso de antibióticos y monitorización de resistencias a los antimicrobianos en producción animal. Workshop “Estado del arte de la investigación propuesta para la tesis doctoral”, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 18 de septiembre 2020, Murcia.
- **Rivera-Gomis, J.** (2020) Política Sanitaria en Apicultura. Dentro de la *Venia Docendi* en la Asignatura de Medicina Preventiva y Política Sanitaria. Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, 30 de noviembre 2020, Murcia.
- **Rivera-Gomis, J.** (2019) La Listeriosis como problema de Salud Pública en relación con aves exóticas de compañía. I Jornada de Sostenibilidad y Salud Pública, 28 de octubre 2019, Facultad de Veterinaria, Universidad de Murcia, Murcia. <https://tv.um.es/video?id=141008>
- **Rivera-Gomis, J.** formó parte del Comité Organizador y participó como moderador en la I Jornada de Sostenibilidad y Salud Pública celebrada en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia el 28 de octubre de 2019.



### 13.5. Iniciación a la formación docente e investigadora

- Participación en actividades docentes en Asignaturas del Grado en Veterinaria mediante la *Venia Docendi*, impartiendo un total de 60 horas por curso académico durante los cursos 2019/2020, 2020/2021 y 2021/2022 en las asignaturas de Medicina Preventiva y Política Sanitaria, Epidemiología, Zoonosis y Salud Pública, Enfermedades Infecciosas I, Enfermedades Infecciosas II y Ecopatología de la Fauna Silvestre.
- Colaboración en docencia teórica y práctica sobre uso de Sistemas de Información Geográfica (SIG) en Epidemiología Veterinaria y colaboración en preparación de materiales docentes en el marco de la *Venia Docendi*.
- Colaboración en docencia teórica y práctica sobre enfermedades infecciosas de las abejas en la asignatura de enfermedades infecciosas en el marco de la *Venia Docendi*.
- Participación en el Proyecto de Innovación Docente “17 sustainable development goals and one health. Sostenibilización curricular, a través de metodologías participativas, en el contexto de las zoonosis transmitidas por animales de compañía”, en la Modalidad: “Metodologías colaborativas y participativas para el alumnado”. Investigadora Principal María del Carmen Gallego, participantes María José Cubero Pablo y Jorge Rivera Gomis. Curso 2019/2020.
- Realización de los siguientes Proyectos de Innovación Docente (Modalidad B) en el Grado en Veterinaria:
  - Aprendizaje en Sanidad Animal mediante trabajo colaborativo consistente en la elaboración de fake news radiofónicas, análisis, discusión crítica y reelaboración de la noticia correcta sobre alertas sanitarias veterinarias. Curso 2020/2021. En la Modalidad: “Metodologías colaborativas y participativas para el alumnado”.
  - Uso de Sistemas de Información Geográfica para la docencia en Sanidad Animal y Salud Pública. Curso 2021/2022. En la línea “Implantación de enseñanza no presencial o semipresencial en estudios de grado, máster o doctorado”.
- Tutorización de estudiantes de Bachillerato dentro del Proyecto IDIES (VII Edición) para la realización del proyecto “Nueva estrategia alimentaria natural para minimizar el uso de antibióticos en ganado porcino”.

### 13. Apéndices

- Tutorización de estudiantes del Grado Superior en Laboratorio Clínico y Biomédico, especialidad en anatomía patológica, del Centro de Formación Profesional Cesur Murcia, y del Centro de Formación Profesional Ramón y Cajal (Murcia), durante 400 horas.
- Tutorización de estudiantes del Grado Superior en Laboratorio Clínico y Biomédico, especialidad en análisis clínicos, del Centro de Formación Profesional Miguel de Cervantes (Murcia), durante 400 horas.
- Co-tutorizó los siguientes Trabajos de Fin de Grado en la Titulación de Veterinaria:
  - Carolina Oliver Marín (2020) Vigilancia de resistencias antibióticas en cepas comensales de *Escherichia coli* de explotaciones avícolas de puesta en 2018. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, Murcia.
  - Nuria Muñoz Chillerón (2020) Vigilancia de resistencias antibióticas de cepas comensales de *Enterococcus* spp. en explotaciones avícolas de puesta en 2018. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, Murcia.
  - Lucía Navarro Fernández (2021) Mejora de las vellosidades intestinales de lechones en fase de recría, suplementando el pienso con aceite esencial de orégano y moltura de ajo morado. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, Murcia.
  - Paula Ortega Requena (2021) Evaluación de la salud intestinal en lechones de recría alimentados con nutracéuticos (*Allium sativum* y *Origanum vulgare* L.) como alternativa al uso del óxido de zinc. Facultad de Veterinaria de la Universidad de Murcia, Murcia.
- Pertenencia al Grupo de Investigación E095-06 “Resistencia Antimicrobiana en Sanidad Animal”.
- Pertenencia al Grupo de Innovación Docente 118 “Vigilancia Sanitaria Veterinaria”.
- Pertenencia al Grupo de Transferencia del Conocimiento “One Health”.

### **13.6. Contratos de colaboración en proyectos de investigación**

- Contrato de trabajo como Investigador Licenciado desde el 25/03/2019 hasta el 31/12/2021 a cargo del proyecto DALLAND CDTI IDI-20180830 “NATURPORKS” (2018-2021) “Evaluación del uso de plantas medicinales como alternativa a los antibióticos en la producción porcina”, seleccionado en concurso público convocado por resolución rectoral R-152/2019 de 8 de febrero. El proyecto fue premiado en 2019 como “Proyecto estratégico de transferencia con gran impacto social y económico” por la Universidad de Murcia, a través del Vicerrectorado de Transferencia y Divulgación Científica y del Consejo Social.

### 13.7. Actividad de gestión de la investigación

- Co-Guest-editor para para la edición especial “Wildlife Disease Threats” de la revista científica “Animals” (Basel).  
[https://www.mdpi.com/journal/animals/special\\_issues/Wildlife\\_Disease\\_Threats](https://www.mdpi.com/journal/animals/special_issues/Wildlife_Disease_Threats)
- Revisión de artículos para revistas científicas:
  - Veterinary Research Communications, ISSN: 0165-7380, 1 artículo revisado, 2021.
  - Preventive Veterinary Medicine, ISSN: 0167-5877, 1 artículo revisado, 2021.