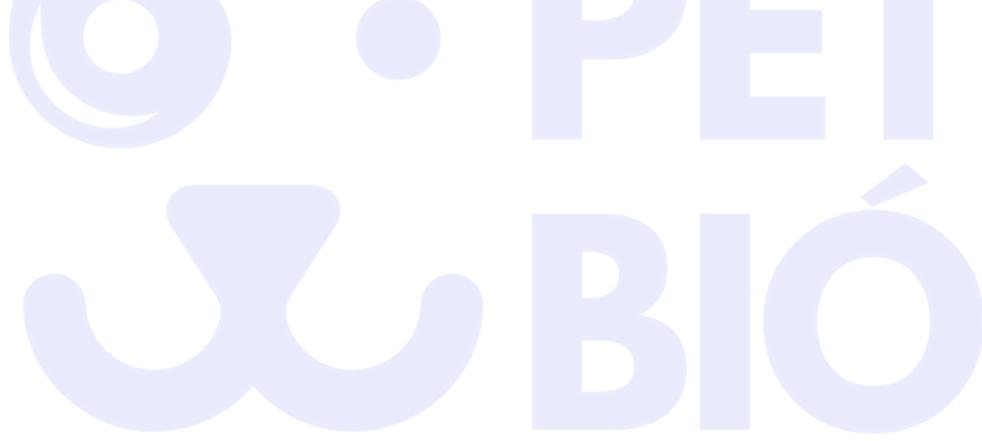


Fortebióticos

L. plantarum CECT9608 y *L. paracasei* CECT9610



DOSSIER TÉCNICO



CONTENIDO

BLOQUE TÉCNICO

01.

EQUIPO I+D+P

02.

LA FORMULA POSTBIÓTICA

03.

INDICACIONES CLÍNICAS VETERINARIAS

BOQUE CIENTÍFICO

04.

POSTBIÓTICOS: RESULTADO DE LA ACCIÓN PROBIÓTICA

05.

DEMOSTRACIÓN EN CASOS REALES

EQUIPO I+D+P

En salud animal, **no todo está inventado**. La investigación científica continúa evolucionando porque las **personas** que dedican su **talento** a descubrir nuevas **soluciones** continúan existiendo.



Investigación

PETBIÓTICOS es un proyecto desarrollado a partir de un acuerdo de asesoramiento y supervisión por parte del **Equipo investigador que dirige la Profesora D^a Beatriz Isabel Redondo** del Departamento de Producción Animal de la **Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid**.

Investigación y Desarrollo

La **innovación biotecnológica** y exclusividad en la composición de PETBIÓTICOS existe gracias al **talento y experiencia del Equipo científico de INGULADOS SL**.

ingulados



Prescripción

La misión de PETBIÓTICOS es **trasladar la investigación y la ciencia española a la consulta veterinaria**. Por ello queremos que PETBIÓTICOS sea la marca de los veterinarios innovadores, aquellos que apoyan su consejo veterinario en productos con evidencia científica y demostración clínica.

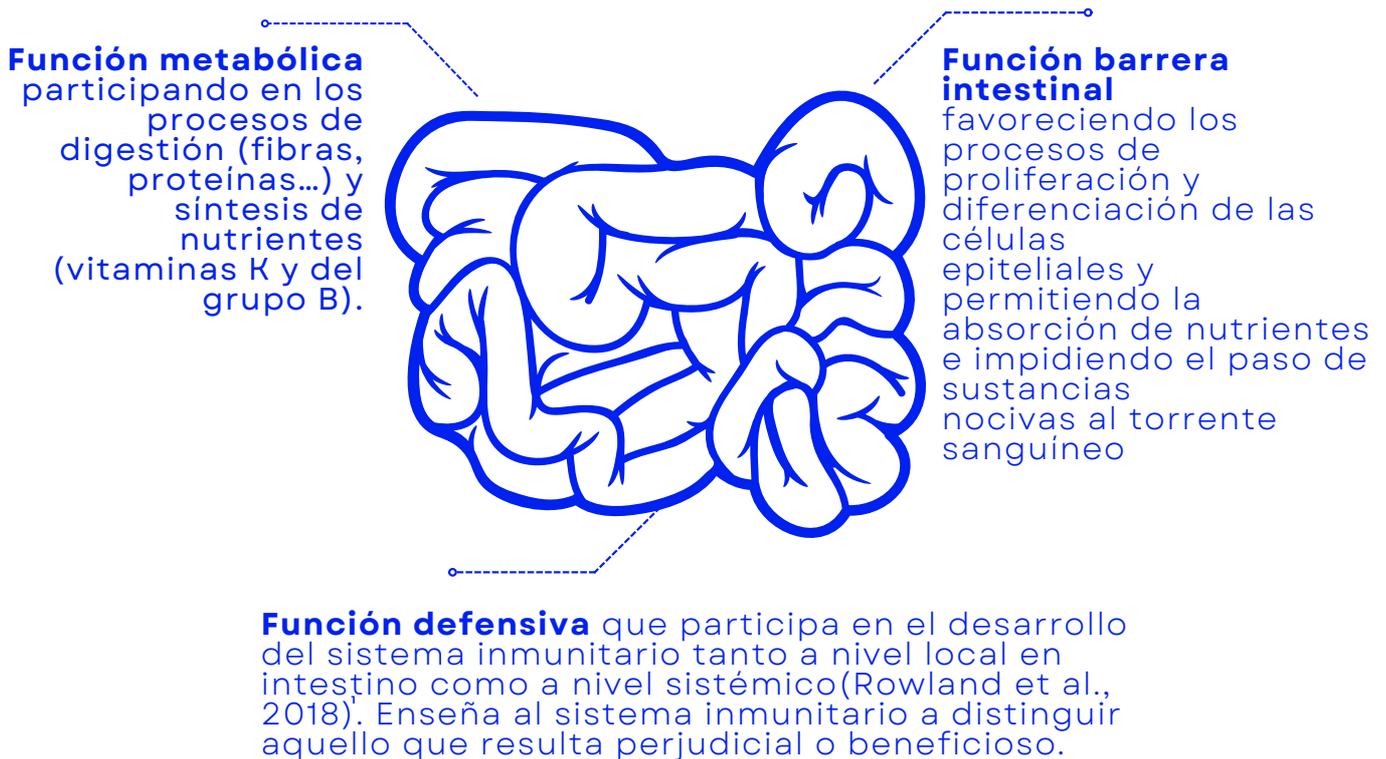
Los retos clínicos que plantea los trastornos de la microbiota ahora tienen una nueva herramienta para abordarlos: PETBIÓTICOS.

Punto de partida: la microbiota

¿Y SI LA RESPUESTA ESTÁ EN LA MICROBIOTA?

La «microbiota» es un complejo ecosistema formado por todos los microorganismos que residen de forma habitual en un organismo superior, denominado «hospedador», con el que establece una relación simbiótica. Este conjunto de microorganismos coloniza los tejidos sanos de los hospedadores participando en el desarrollo de numerosos procesos fisiológicos (Karczewski et al., 2014)¹

Los animales somos seres microbianos y dependiendo de la edad, entorno, condiciones de salud y ambientales otros factores **llegamos a tener entre 1,3 - 2,3 microorganismos por cada célula**. En el intestino se concentra en torno al 70% de todas las bacterias del organismo y allí cumplen las siguientes funciones:



Los moduladores de la microbiota son útiles para mantener o reestablecer las poblaciones microbianas en un equilibrio óptimo para el hospedador, conocido como «eubiosis», lo que garantiza el desarrollo adecuado de las funciones fisiológicas mencionadas anteriormente.

Postbióticos acción metabólica directa



Productos metabólicos bioactivos fruto de la fermentación de las bacterias ácido-lácticas vivas.

Objetivo:

Concentrar la acción probiótica en una fórmula que cause efecto directo en el organismo

FORTEBIÓTICOS®

L. plantarum CECT9608 y *L. paracasei* CECT9610

FORTEBIÓTICOS® es el primer refuerzo nutricional diseñado exclusivamente para prevenir, resolver y reforzar los casos clínicos que tienen origen y respuesta en la microbiota de nuestras mascotas. Ha sido elaborado a partir de las cepas bacterianas *Lactiplantibacillus plantarum* CECT9608 y *Lacticaseibacillus paracasei* CECT9610 de la colección BAL-INGULADOS, diseñado específicamente para mascotas.

COMPOSICIÓN | 100% POSTBIÓTICOS

Productos metabólicos bioactivos fruto de la fermentación de las bacterias ácido-lácticas vivas.
Acción metabólica directa en el organismo



CÉLULAS BACTERIANAS

Componentes estructurales principalmente de la pared celular:

- Ácidos teicoico y lipoteicoico
- Peptidoglicanos
- Polisacáridos

Objetivo: Mejora la función barrera epitelial y modula el PH.



ÁCIDOS GRASOS DE CADENA CORTA

20% | Producidos durante la fermentación bacteriana:

- Acetato
- Propionato
- Butirato

Objetivo: Activar comunicación intestino-cerebro.



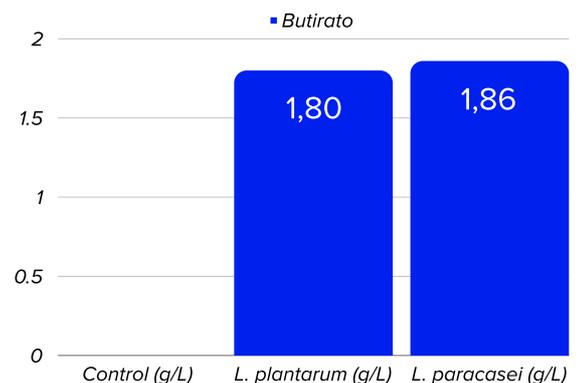
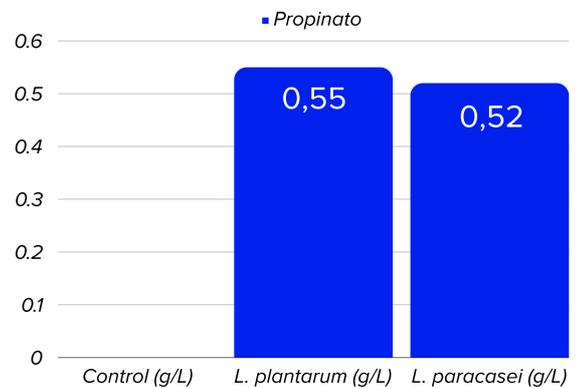
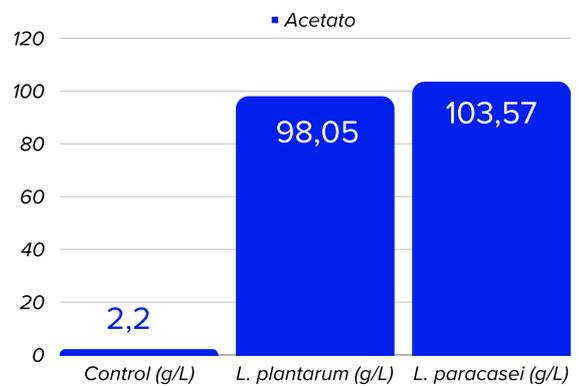
PROTEÍNAS BACTERIOCINAS

7 proteínas bacteriocinas con acción antimicrobiana:

Presentan actividad frente a cepas enteropatógenas de *E.coli*, contribuyendo a la modulación de la microbiota residente.

Objetivo: Refuerzo de la defensa natural del organismo.

COMPOSICIÓN DE AGCC



Dos presentaciones



PERRO | REFORZADO CON VITAMINA E + SELENIO
Incluye un 10% de la dosis diaria recomendada para nuestro perro.

GATO | REFORZADO CON TAURINA
Incluye un 16% de la dosis diaria recomendada para nuestro gato.

Posología



EL PODER DE UNA GOTTA

¿CÓMO APLICAMOS FORTEBIÓTICOS?

1 gota por cada KG
1 vez / día

EN SU RACIÓN DE COMIDA



600 GOTAS



Nombre: EME
Peso: 8kg
8 gotas diarias junto a la comida
Duración: 75 días

Nombre: FANTA
Peso: 20kg
20 gotas diarias junto a la comida
Duración: 30 días

Indicaciones clínicas veterinarias



La misión de FORTEBIÓTICOS es resolver un amplio espectro de casos clínicos que tienen su origen y respuesta en la microbiota intestinal.

Metabolitos y bacteriocinas enseñan al sistema inmunitario a distinguir aquello que resulta perjudicial o beneficioso para el organismo

La respuesta está en la microbiota

INDICACIONES CLÍNICAS EN CONSULTA VETERINARIA

Crónicos

Crónicos que, por las características inmunodepresoras de su enfermedad, por la recurrencia de tratamientos antibióticos o uso continuo de corticoides, presenten una microbiota debilitada y disfuncional, incapaz de asumir funciones esenciales para el organismo de nuestras mascotas.

Seniors

Seniors que en la última etapa de su ciclo de vida precisan un refuerzo en la producción de glóbulos rojos y garantizar un incremento del flujo de oxigenación del organismo con el fin de proporcionarle mayor vitalidad.

Cachorros

Cachorros en su fase de destete o proceso de vacunación, cuando todavía no tienen totalmente desarrollada su microbiota y suelen aparecer trastornos gastrointestinales frecuentes.

Disbiosis

Casos de disbiosis de cualquier grado, diarreas o falta de apetito a cualquier edad.

Antibióticos

Mascotas en cualquier etapa que precisan tratamiento antibiótico puntual para tratar cualquier infección o como consecuencia de haberse sometido a un proceso quirúrgico (esterilización, limpieza bucal u otras cirugías), y necesitan minimizar, regenerar y evitar el impacto negativo que la medicación tiene sobre la microbiota.

PETBIÓTICOS, por su composición 100% postbiótica, está diseñado para entregar al organismo los metabolitos y nutrientes que recibiría en condiciones óptimas de su microbiota, favoreciendo la colonización natural de la microbiota innata del organismo de nuestras mascotas. Prevenir | Curar | Reforzar

Postbióticos: resultado acción probiótica



Los avances científicos y nuevos descubrimientos en torno a la microbiota facilitan una asistencia sanitaria desde nuevas perspectivas.

Abordar los casos clínicos relacionados con el sistema inmunitario y patógenos que dañan el organismo a través de la microbiota, requieren nuevos productos con resultados demostrados.

POSTBIÓTICOS

Son productos metabólicos bioactivos y solubles, secretados por bacterias vivas y liberados durante la fermentación a partir de la lisis de la membrana celular bacteriana. Su **composición** incluye:

Metabolitos:

Enzimas, péptidos, proteínas, exopolisacáridos, ácidos orgánicos y lípidos (AGCC).

Componentes estructurales de la pared celular bacteriana:

Ácidos teicoico y lipoteicoico, peptidoglicano, proteínas de la capa superficial bacteriana y otros polisacáridos.

(Aguilar-Toalá et al., 2018a; Wegh et al., 2019)²

ORIGEN | BÁCTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS DESCUBIERTAS Y PATENTADAS POR INGULADOS

INGULADOS dispone de una colección de Bacterias Ácido Lácticas (BAL-INGULADOS), aisladas de microbiota de animales sanos, caracterizadas genéticamente y seleccionadas por sus propiedades inmunomoduladoras y antimicrobianas. Dichas cepas están registradas para uso restringido en la Colección Española de Cultivos Tipo y reúnen los requisitos para ser incluidas en productos de alimentación según la Qualified Presumption of Safety (QPS) establecido por la European Food Safety Authority (EFSA).



Rosario Cerrato (Directora) y Pedro Fernández (CEO) | INGULADOS

Un objetivo

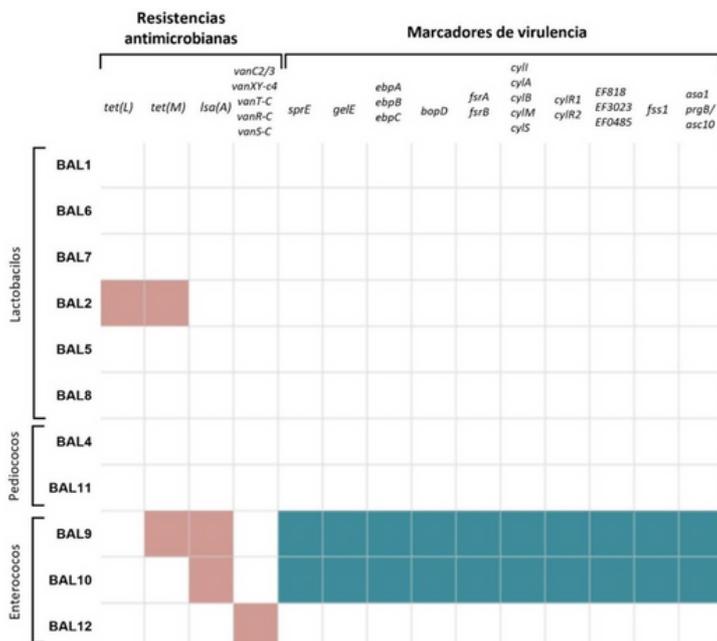
INGULADOS ES LA EMPRESA DE INVESTIGACIÓN VETERINARIA QUE HA DADO EL SALTO A LA PRODUCCIÓN DE **ALTERNATIVA A LOS ANTIBIÓTICOS**

SELLO DE EXCELENCIA de la Unión Europea a la línea de investigación sobre alternativas a antibióticos.



PERFIL DE SEGURIDAD

Los aislados de lactobacilos **carecen de genes de resistencia y virulencia.**



La mayoría de las especies de lactobacilos, comúnmente utilizados en productos probióticos, reciben el estado de QPS (Qualified presumption of safety - EFSA) ya que, en principio, no entrañan ningún tipo de riesgo para su utilización en alimentos y piensos (BIOHAZ/EFSA, 2021).

Sin embargo, es recomendable realizar una evaluación completa para garantizar su seguridad, en particular cuando se sospecha que puedan poseer resistencias antimicrobianas adquiridas que puedan ser transferibles, especialmente cuando vienen codificadas en su genoma (Reglamento (CE) n° 429/2008).

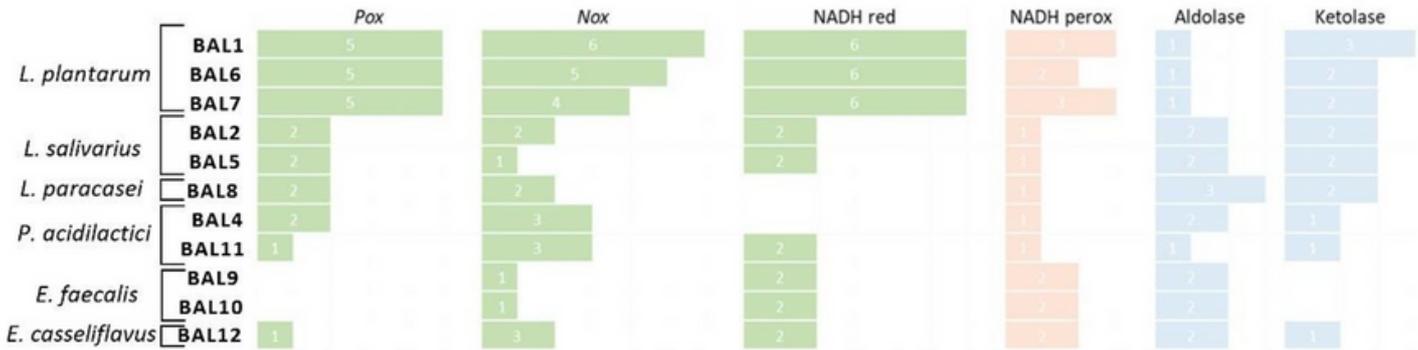
Para evaluar la seguridad de los aislados, se cuantificó su susceptibilidad a los antibióticos que se utilizan comúnmente en medicina humana y veterinaria y de forma paralela, se buscaron los genes asociados con resistencias a antibióticos para correlacionar estos marcadores con la tolerancia fenotípica de los aislados.

Los lactobacilos aislados en este estudio no portan factores de virulencia y fueron susceptibles a la mayoría de los antibióticos probados, que son los recomendados por la EFSA para este propósito.

Acción antimicrobiana

CARACTERIZACIÓN ANTIMICROBIANA

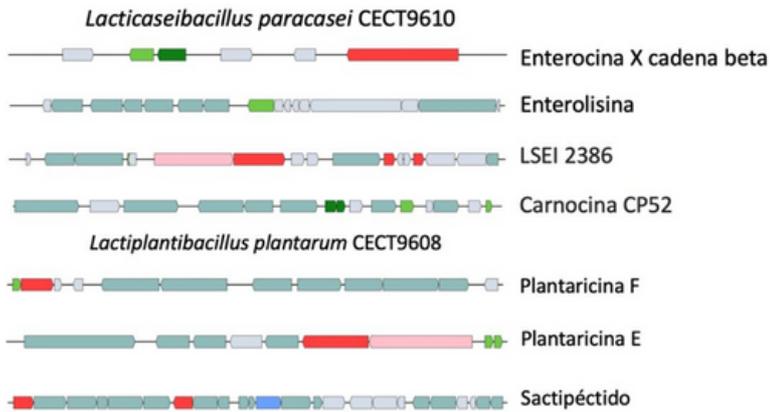
Se realizó un estudio fenotípico y genotípico de actividad antimicrobiana con el objetivo de caracterizar tanto el efecto inhibitorio sobre ciertos patógenos y detectar genes que codifiquen para moléculas antimicrobianas



Análisis realizado por INGULADOS SL | Genes asociados con la producción y acumulación de H₂O₂ (verde y naranja) y otros metabolitos secundarios como lactato, acetato, etanol y CO₂ (azul) en los aislados. Se muestra la proporción en la barra, cada cuadrado se corresponde con un gen encontrado.

Conclusión. Se realizaron diferentes ensayos in vitro para enfrentar a las cepas de la colección BAL-INGULADOS frente a patógenos bacterianos importantes en medicina humana y animal. Además, se realizó secuenciación completa del genoma y posterior estudio bioinformático de los genes obtenidos. Las anotaciones del genoma permitieron identificar los genes que codifican para las enzimas fructosa-6-fosfato aldolasa y fosfoctolasa en *L. plantarum* CECT9608 (BAL6) y *L. paracasei* CECT9610 (BAL8), demostrando su papel como heterofermentadores facultativos. Estas cepas son capaces de convertir carbohidratos en lactato utilizando la ruta EMP y / o producir lactato en combinación con etanol, acetato y dióxido de carbono como metabolitos antimicrobianos a través de la ruta PKP. Además, también albergan genes asociados con la producción de H₂O₂: Pox, Lox y / o NADH oxidasas, así como NADH peroxidasa.

PRESENCIA DE BACTERIOCINAS



Conclusión. Se identificó en *L. plantarum* la bacteriocina de dos péptidos codificada por los dos genes del operón plnEF. Los genes plnE y plnF permiten la expresión de dos péptidos, denominados plantaricinas E y F, que interactúan entre sí para formar una estructura de hélice-hélice que se une a una proteína de membrana específica de la bacteria diana, presumiblemente un transportador de la superfamilia APC, lo que ocasiona la destrucción de la membrana y, como consecuencia, la muerte celular (Ekblad et al., 2016; Oppegård et al., 2016).³ El resto de los genes que detectamos en los genomas de *L. plantarum* son idénticos al operón plnWVUTSHG, que participan en el transporte, procesamiento y autoprotección (Diep et al., 2009).⁴ Asimismo, detectamos un clúster de genes implicados en la síntesis hipotética de una nueva bacteriocina de dos péptidos en *L. paracasei*. El clúster está compuesto por dos genes que codifican para dos bacteriocinas que muestran cierta similitud con la termofilina A (Ward y Somkuti, 1995)⁵ y la carnocina CP51 (Herbin et al., 1997),⁶ seguidos de un gen de galactosido O-acetiltransferasa y dos genes adicionales implicados en la inmunidad y el transporte. La carnocina CP51 se expresa con el péptido complementario carnocina CP52 en *Carnobacterium* y termofilina A glicosilada, como ocurre con algunas plantaricinas (Diep et al., 2009).⁷

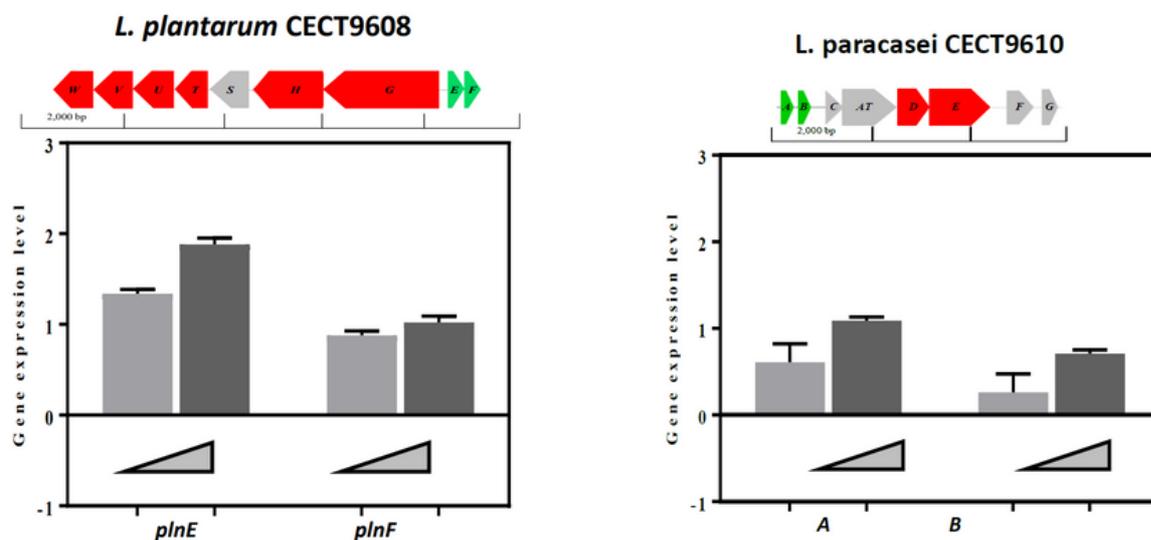
Análisis INGULADOS SL | Clústeres de genes implicados en la biosíntesis de bacteriocinas modificadas se encuentran en las BAL anotadas. Se presenta: proteínas sin función determinada (gris), Blast hit with UniRef90 (aguamarina), Péptido central (verde), modificaciones (azul), inmunidad / transporte (rojo), regulación (amarilla), transporte y escisión del líder (rosa) y proteasa (lila).

Actividad antimicrobiana

Para determinar la actividad antimicrobiana de las dos cepas mencionadas, se cuantificó el nivel de expresión de las bacteriocinas de clase II identificadas en el genoma tras el cocultivo con bacterias patógenas. Mediante RT-PCR se cuantificó la cantidad de transcritos derivadas de los genes precursores de bacteriocinas en *L. plantarum* y *L. paracasei* (indicadas en verde en la parte superior de la figura).

El ARN se obtuvo de cultivos de lactobacilos expuestos a concentraciones crecientes de células patógenas durante la fase de crecimiento exponencial. Como se ilustra en la figura, el nivel de expresión de los genes *plnE* y *plnF* depende de la cantidad de bacterias, puesto que se observa un aumento muy significativo de la expresión en comparación con los monocultivos de *L. plantarum*.

Observamos resultados similares con los genes A / B de *L. paracasei*, aunque el aumento en la expresión génica fue mucho menor. Estos datos confirman, no solo el efecto inductor de la bacteria patógena sobre la actividad antimicrobiana mostrada por *L. plantarum* y *L. paracasei*, sino también el papel de las bacteriocinas de dos péptidos en dicha actividad antimicrobacteriana.



Análisis INGULADOS SL | Figura. Clústeres de genes de bacteriocinas de clase II identificados en el genoma de las cepas de lactobacilos y nivel de expresión de genes que codifican los precursores de bacteriocinas en cultivos de lactobacilos expuestos a diferentes concentraciones crecientes de una bacteriapatógena. La nomenclatura para los grupos de bacteriocina sigue recomendaciones específicas (Diep et al., 2009; O’Shea et al., 2011) y representa: las bacteriocinas precursoras (verde), las enzimas de modificación postraduccional (azul), las proteínas de transporte / inmunidad (rojo) y otras proteínas hipotéticas (gris).

L. plantarum CECT9608. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de *L. plantarum*, el nivel de expresión de sus genes de la bacteriocina precursora correspondiente *plnE* y *plnF* en cultivos expuestos a una bacteria patógena a 10⁶ ufc / ml (barras de colorgris claro) y 10⁷ ufc / mL (barras grises oscuro).

L. paracasei CECT9610. Clúster de la bacteriocina de dos péptidos de *L. paracasei* y el nivel de expresión de los de la bacteriocina precursora correspondiente A y B en cultivos expuestos a una bacteria patógena a 10⁶ ufc / ml (barrasde color gris claro) y 10⁷ ufc / mL (barras grises oscuro).

Acción inmunomoduladora

CARACTERIZACIÓN INMUNOMODULADORA

Se realizó un estudio de caracterización inmunomoduladora de BAL de la colección de INGULADOS, para lo cual se utilizó un modelo monocítico de células sanguíneas, adaptado de un estudio previo que demostró ser útil para este propósito (Stedman et al., 2020). El estudio completo se encuentra actualmente publicado (Bravo et al., 2022).¹⁰

Conclusión.

Se encontró un perfil de activación de las dos rutas de señalización inmunitaria testadas que fue especialmente relevante en los lactobacilos y resultó ser específico de las diferentes especies bacterianas de este estudio. Mientras que otros aislados de la colección mostraron una gran capacidad para inducir la activación de NF- κ B, la vía del interferón IFN-I fue principalmente activada en presencia de *L. plantarum* y *L. paracasei*.

Es importante, además, que perfil fagocítico de los lactobacilos se correlacionó positivamente con esta capacidad para activar respuestas inmunitarias innatas protectoras en los macrófagos, lo que concuerda con la importancia de que se produzca

la fagocitosis bacteriana para la activación de mediadores proinflamatorios, mediante estas dos rutas mencionadas (Aderem, 2003;¹¹ Kaufmann y Dorhoi, 2016).¹² En este sentido, se encontraron en los genomas de *L. plantarum* y *L. paracasei* dos adhesinas (cna y sraP) asociadas a la internalización por los fagocitos que podrían tener un papel relevante (Foster et al., 2014).¹³

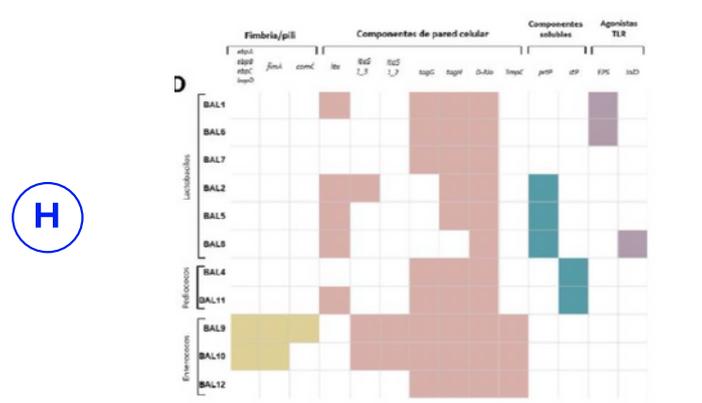
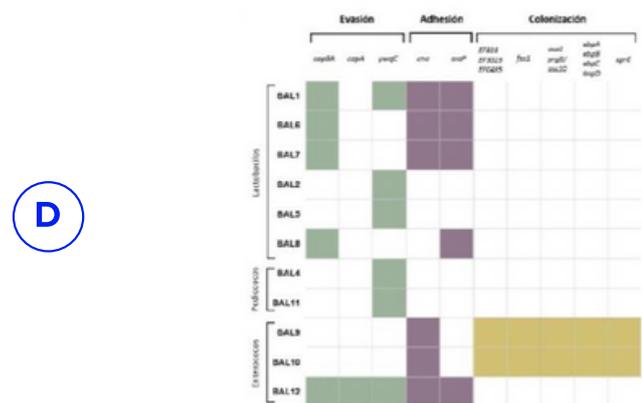
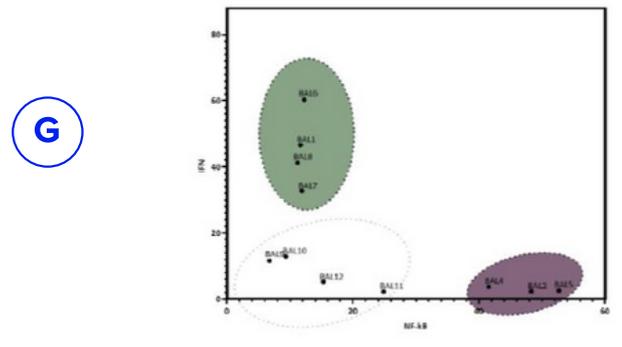
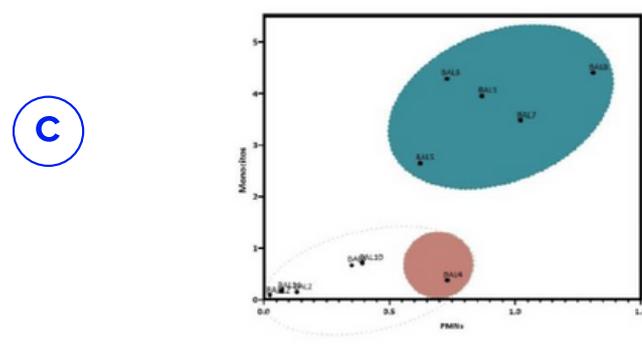
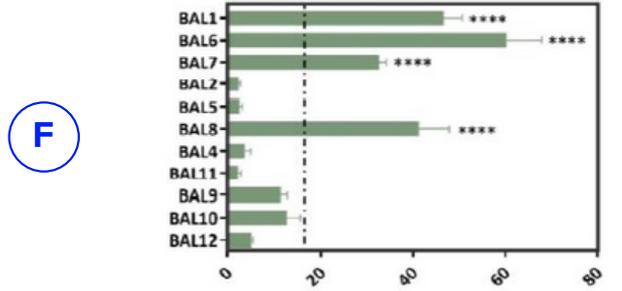
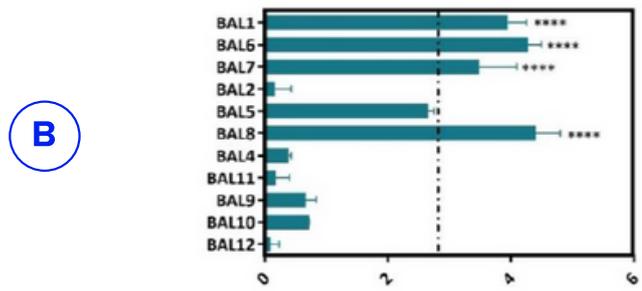
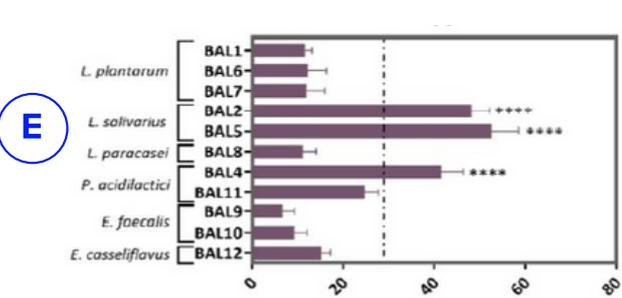
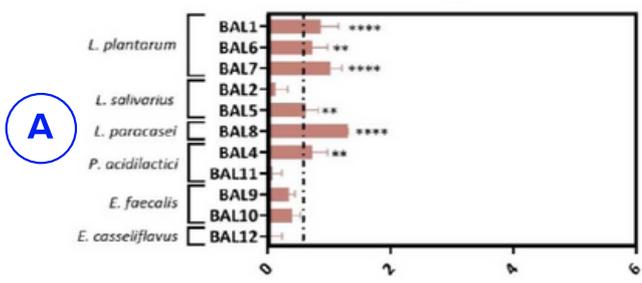
Los fagocitos del sistema inmunitario del hospedador discriminan entre bacterias residentes y patógenas a través de receptores de PRR como los TLR o NLR, que reconocen ligandos microbianos conocidos como MAMP (Hevia et al., 2015;¹⁴ Ren et al., 2016).¹⁵ Los MAMP incluyen una amplia variedad de metabolitos microbianos y moléculas estructurales como EPS, lipoproteínas de membrana, LTA/WTA, pili y fimbrias, entre otros (Hevia et al., 2015;¹⁶ Stedman et al., 2020).¹⁷ que han sido encontrados en todos los aislados de la colección. Los componentes de la pared celular se encontraron en todos los aislados como LTA (Ita, ItaS1_2, ItaS1_3), WTA (tagGH, D-Ala), lipoproteínas de membrana (TmpC, lolD), además del peptidoglicano presente en todas las bacterias Gram+ (Hevia et al., 2015; Ren et al., 2016). Además, cabe destacar que dos aislados de *L. plantarum* poseen genes asociados a la producción de EPS, que recientemente ha sido asociado a la inmunomodulación mediada por TLR2 y TLR4 en esta especie (Barragán et al., 2020);²⁰ y *L. paracasei* posee una lipoproteína de membrana (lolD) que también podría estar involucrada en la activación vía TLR2 (Hutchings et al., 2009).²¹ Además, en este aislado se encontró el gen que codifica para lactocepina (PrTP), una enzima que contribuye a su efecto inmunomodulador degradando citoquinas proinflamatorias (Hevia et al., 2015; Hörmannspenger et al., 2013).²³

Por otro lado, las bacteriocinas secretadas, mencionadas anteriormente, pueden contribuir a los efectos inmunomoduladores actuando sobre las células mononucleares de sangre periférica, como los monocitos, y también sobre las células dendríticas (Hegarty et al., 2016).²⁴

Los aislados que mostraron una estimulación de la ruta del IFN poseen los factores de adhesión que favorecerían la fagocitosis y la internalización necesaria para esta vía de señalización, con la subsecuente activación de sensores citosólicos o TLR endosomales, como ha sido propuesto en otros estudios previos (Kawashima et al., 2013;²⁵ Negishi et al., 2012;²⁶ Stedman et al., 2020).²⁷ No obstante, estos aislados podrían ser buenos candidatos para estimular la respuesta inmunitaria eficaz frente a patógenos virales, puesto que se ha comprobado que la activación de esta ruta sensibiliza las células del hospedador a la apoptosis, eliminando de esta forma el nicho del patógeno intracelular (Kawashima et al., 2013;²⁸ Koyama et al., 2008).²⁹ Este hecho es muy importante no solo para el control de enfermedades provocadas por virus, sino también para el desarrollo de inmunoadyuvantes de vacunas frente a infecciones por agentes virales (Lebedeva et al., 2018).³⁰

Los lactobacilos interactúan con los fagocitos y portan moléculas asociadas con la adhesión celular. La respuesta de PMN (A) y monocitos (B) a las BAL se cuantificó utilizando bacterias marcadas con PKH2 y se expresa como log2 de la intensidad de fluorescencia media (MFI). (C) El perfil fagocítico de la mayoría de los aislados de lactobacilos son predominantemente monocíticos, pero *L. paracasei* también interactúa con los PMN. (D) Los aislados de BAL portan genes que se asocian con la evasión, la adhesión y / o la colonización.

Los lactobacilos activan respuestas inmunitarias innatas protectoras en macrófagos y poseen moléculas asociadas con la activación de TLR. La activación de las rutas NF-κB (E) e IFN-1 (F) se cuantificó en macrófagos THP-1 diferenciados expuestos a las BAL. La activación de las rutas inmunitarias NF-κB / IFN se presenta con respecto al control y los datos representan al menos 3 réplicas biológicas. (G) Los aislados se distribuyen de manera diferente según su capacidad para activar las vías NF-κB / IFN. Las especies *L. plantarum* y *L. paracasei* desencadenan respuestas significativas de IFN.. (H) Los aislados poseen genes asociados con PRR, como TLR y NOD, que incluyen fimbria / pili, componentes de la pared celular y agonistas de TLR2.

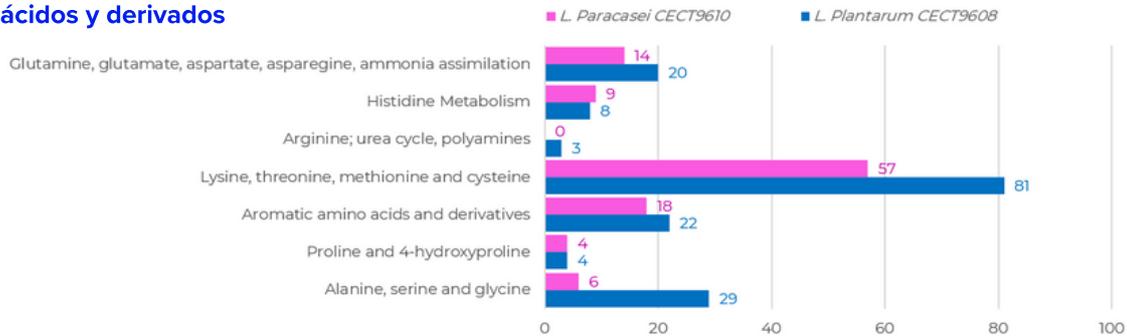


Anotación funcional

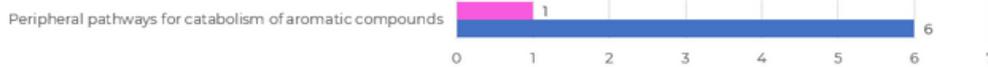
CLASIFICACIÓN DE LOS GENES ANOTADOS PARA EL GENOMA DE CADA BACTERIA

Para completar los estudios anteriores y poder confirmar y detectar otras propiedades beneficiosas de las cepas seleccionadas, se realizó un estudio bioinformático de los genomas en mayor profundidad. El primer paso para el procesamiento de datos implica llevar a cabo la anotación de los genomas realizada con la plataforma RAST. Este proceso se basa en identificar y etiquetar todas las características relevantes en una secuencia del genoma, es decir, identifica genes o secuencias que posiblemente codifiquen proteínas (CDS) y les asigna una función específica. Esta plataforma aporta información básica sobre el genoma, como la taxonomía, el tamaño, el número de contigs, el número de secuencias de codificación y ARN y los recuentos de anotaciones de genes no hipotéticos e hipotéticos.

Aminoácidos y derivados



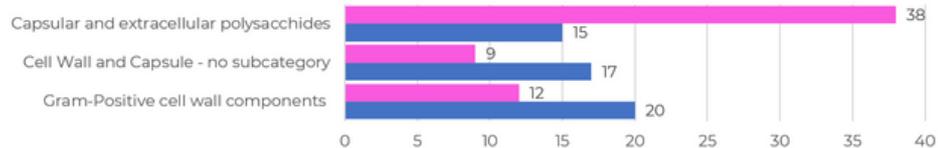
Metabolism of aromatic compounds



Fatty Acids, Lipids and Isoprenoids



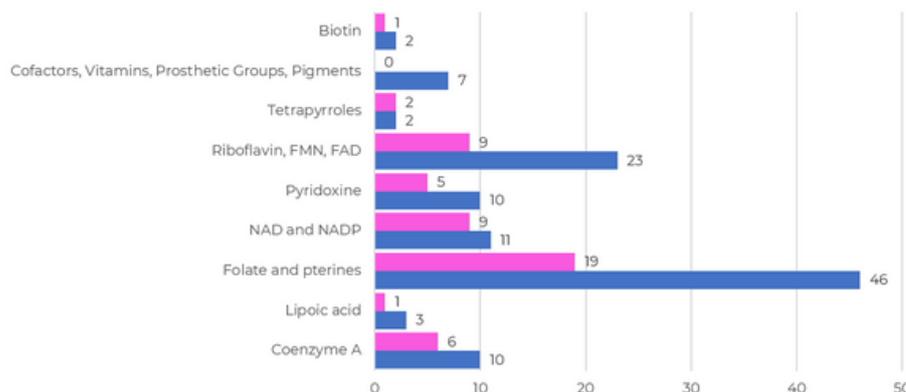
Metabolism of aromatic compounds



Virulence, Disease and Defense



Cofactors, Vitamins, Prosthetic Groups, Pigments



Probióticos vs Postbióticos

ORIGEN: PROBIÓTICO | RESULTADO: POSTBIÓTICO

A partir de bacterias ácido lácticas (Colección BAL-INGULADOS) aisladas de la microbiota de animales sanos en ambientes naturales y salvajes, tras un trabajo intenso de un cultivo controlado in-vitro, nuestras BAL INGULADOS han demostrado capacidad antimicrobiana e inmunomoduladora frente a patógenos comunes y actuales. Este enfoque, basado en la investigación, representa un avance científico en comparación con cepas probióticas convencionales, destacando su eficacia probada frente a nuevos desafíos patogénicos.

Probióticos

Al tratarse de bacterias vivas, **sufren** directamente el **ataque** de los **antibióticos**. No existen garantías de supervivencia y su fecha de caducidad es muy reducida.

Solo sobreviven semanas después de finalizar los antibióticos. **Su efecto es a medio / largo** plazo, y solo si consiguen colonizar, reproducirse y fermentar.

Es importante considerar diversidad y funcionalidad de cada tipo de bacteria para evitar una sobrepoblación que afecte negativamente al equilibrio de la microbiota y evitar que compartan material genético negativo.

Postbióticos

Conservan **intacta su acción metabólica** incluso contra antibióticos. Existe evidencia y demostración científica. Su fecha de caducidad alcanza hasta 24 meses.

Su **efecto** en el organismo es **directo e inmediato**. El organismo recibe el equivalente a la producción metabólica de una microbiota en óptimas condiciones, incluso junto a antibióticos.

Estimula el crecimiento diverso de las bacterias buenas que conforman la microbiota original del organismo sin introducir material genético que pueda conllevar consecuencias negativas para su funcionamiento.

Demostración en casos reales



La evidencia que demuestra los beneficios del uso de postbióticos para reforzar la salud del organismo.

Todos los estudios de casos clínicos han sido desarrollados por
INGULADOS

Demostración casos reales

1 - ALTERNATIVA ANTIBIÓTICA | CERDOS

Antecedentes

El aumento generalizado en el uso de antibióticos dio lugar al desarrollo y aparición de cepas bacterianas patógenas multiresistentes de las que se desconocía su impacto en la salud humana.

En enero de 2006 el uso de antibióticos como promotores de crecimiento quedó prohibido en la Unión Europea (Reglamento CE 1831/2003).

Objetivo

Demostrar que el uso de POSTBIÓTICOS como ingredientes funcionales en alimentación, y el desarrollo de formulaciones para optimizar la salud intestinal ayudan a conseguir animales más sanos y robustos y, por lo tanto, capaces de expresar por completo su potencial genético, minimizando el uso de antibióticos cuando se presentan infecciones víricas.

Caso de estudio

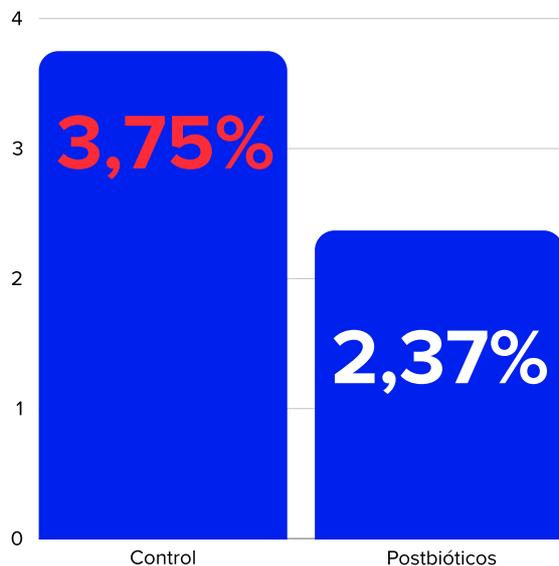
Explotación porcina cebo cerdo blanco cruces de Danbreed o de PIC.

Sala de destete con 7.000 plazas de capacidad

- Grupo de control: **800** lechones | Alimentados con piensos pre-starter y starter
- Grupo suplementado con postbióticos (PB): **6.190** lechones | Misma alimentación anterior + suplementación PB

Cuadro clínico

Entre los **días 1 y 3** tras destete aparecen problemas digestivos en ambos grupos con un total de **177 muertes**.



(%) Tasa de mortalidad en ambos grupos

Consumo de postbióticos reduce la tasa de mortalidad por *E.Coli* multirresistente un **36,8%**

Estudio microbiológico

Se extrajo el ADN de las bacterias aisladas a partir de cultivos puros de bacterias identificadas como *Escherichia coli*. Las bacterias fueron identificadas mediante PCR y se realizó la detección de los factores de patogenicidad como fimbrias o toxinas (Stx2e, F41, K88, P987, F18, LT, K99, Sta, Stb, East).

Factores de virulencia	<i>E. coli C</i>	<i>E. coli I</i>
Stx2e	-	-
F41	-	-
K88	-	-
P987	-	-
F18	+	+
LT	+	+
K99	-	-
Sta	+	+
STb	+	+
East	+	+

Antibiograma

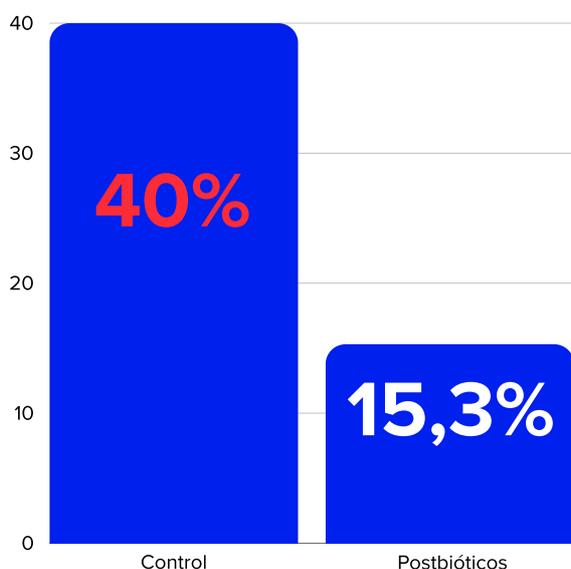
Se realizó antibiograma mediante el método Kirby-Bauer de difusión de discos en agar a partir de los cultivos puros frente a los antibióticos convencionales (amoxicilina, tetraciclina, gentamicina, neomicina, sulfa-trimetoprim, enrofloxacina, cloranfenicol, cefazolina).

El antibiograma nos permitirá proponer un tratamiento antibiótico para los animales en las primeras fases de la enfermedad.

Las dos cepas aisladas mostraron un perfil de resistencia elevado, es decir, son resistentes a la mayoría de los antibióticos testados, lo que dificulta su tratamiento.

Antibiótico	<i>E. coli C</i>	<i>E. coli I</i>
Amoxicilina	R	R
Tetraciclina	R	R
Neomicina	R	R
Enrofloxacina	S	R
Sulfa-Trimetoprim	R	R
Cefalosporinas	S	S

Resultado La capacidad antimicrobiana de los postbióticos evitó el uso de antibióticos a un 62% de potenciales casos



(%) Porcentaje de cuadros completos que han necesitado tratamiento antibiótico para tratar *E.coli* multirresistente.

Consumo de postbióticos reduce el uso de antibióticos por *E.coli* multirresistente un 62%

ALTERNATIVA ANTIBIÓTICA | POLLOS

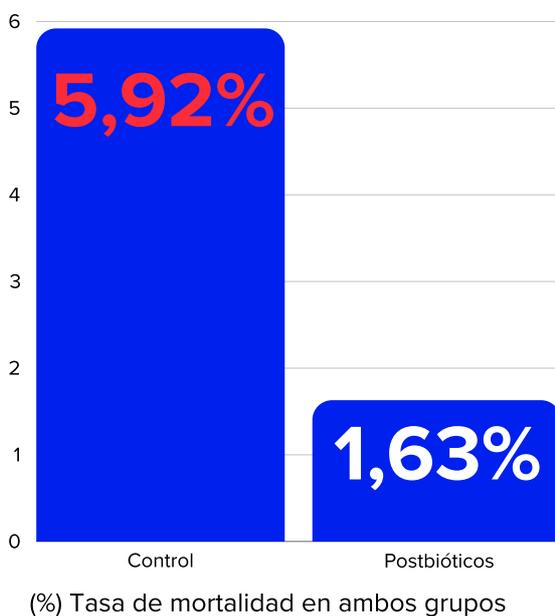
Caso de estudio

Granja avícola

- Grupo de control de nave A: 15.000 pollos
- Grupo suplementado con postbióticos (PB) nave B: 15.000 pollos

Objetivo

Estudio clínico para demostrar el control de colibacilosis en una granja avícola.



Consumo de postbióticos reduce la tasa de mortalidad por APEC (*E.Coli aviar*) multirresistente un **72,5%**

Beneficios de la utilización de POSTBIÓTICOS

Escherichia coli patógena aviar (APEC) es una bacteria patógena con alta proporción de factores de patogenicidad que tiene el potencial de causar colibacilosis, una importante enfermedad que provoca importantes pérdidas sanitarias y económicas en avicultura.

En pollos suplementados durante todo el ciclo de producción, una disminución en la carga intestinal de cepas APEC ocasionó una menor prevalencia de colibacilosis, ya que la transmisión oro-fecal es la principal vía de contagio. Los postbióticos también pueden contribuir a mantener una microbiota saludable y, por tanto, a las funciones de barrera intestinal que previenen la colonización de bacterias patógenas y mejoran la síntesis y absorción de nutrientes. La mejora en los parámetros de producción de las naves suplementadas se relaciona con unos mejores indicadores de salud y una óptima utilización de los nutrientes. Además de la mejora significativa de los parámetros productivos (reducción 72,4% de mortalidad por colibacilosis), la menor prescripción de antibióticos también contribuye a mejorar la rentabilidad de la explotación y ayuda a controlar el problema de salud pública mundial de la resistencia a los antimicrobianos.

2 - AUMENTA LA CAPACIDAD METABÓLICA DEL ORGANISMO

Antecedentes

Una microbiota debilitada por disbiosis intestinal minimiza la capacidad del organismo para obtener y aprovechar los nutrientes que proporcionan los alimentos.

Objetivo

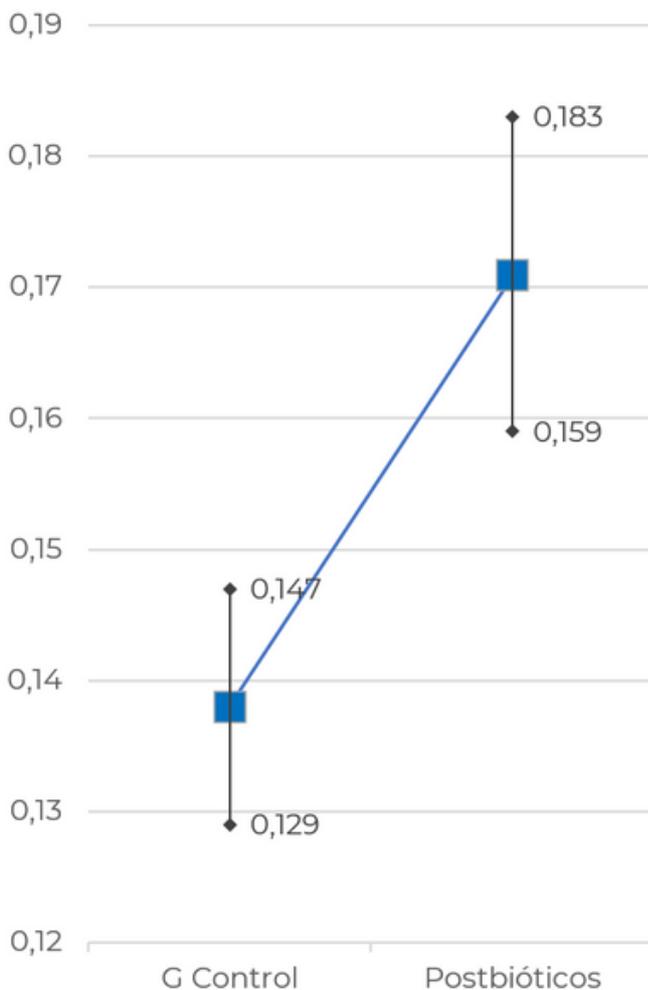
Demostrar que el uso de POSTBIÓTICOS genera un mayor aprovechamiento nutricional de los alimentos

Caso de estudio

Explotación porcina 100% ibérica pura

Se incluyeron en el estudio 14 madres calificadas ibéricas puras, todas ellas nulíparas que habían sido cubiertas por monta natural con verracos ibéricos 100%.

- Grupo de control: Formado por 5 hembras reproductoras y sus lechones (n=35).
- Grupo suplementado con postbióticos (PB): Formado por 9 hembras reproductoras y sus lechones (n=61).



El consumo de postbióticos aumenta un **24% la GMD** con la misma ingesta diaria en ambos grupos.

La ganancia media diaria (GMD) es un indicador productivo muy útil para valorar la velocidad de crecimiento de los animales y que **nos aporta información acerca del rendimiento de los animales**. Una buena tasa de crecimiento estaría ligada a una “buena salud” del aparato digestivo. Para valorar este parámetro hemos medido la ganancia media diaria al final de la lactación.

Niveles medios de las enzimas lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina (U/l) en los grupos de estudio

3 - AUMENTA LA POBLACIÓN MICROBIANA SANA

Antecedentes

El rendimiento de los alimentos en el organismo es el resultado de una población microbiana sana, que además favorece la disminución en la morbilidad y mortalidad durante las fases críticas del desarrollo.

Objetivo

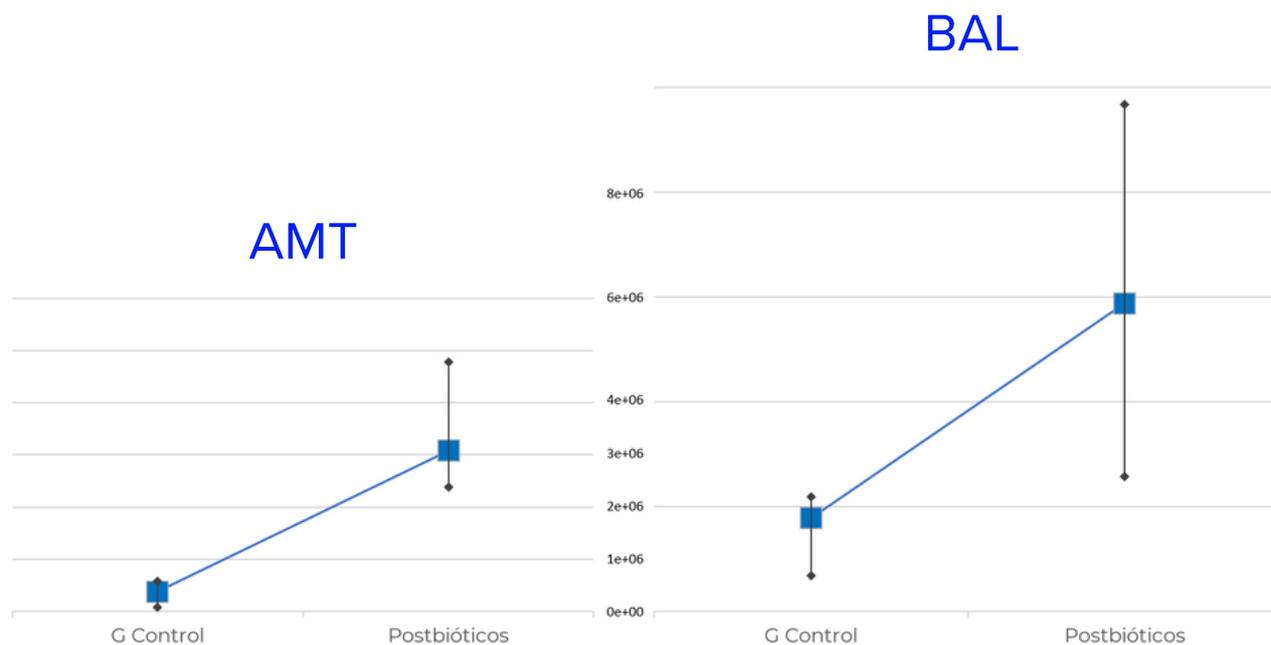
Demostrar que el uso de POSTBIÓTICOS estimula el crecimiento de población de UFC de bacterias ácido lácticas y favorece el equilibrio sobre el total bacterias aeróbicas.

Caso de estudio

Explotación porcina 100% ibérica pura

Se incluyeron en el estudio 14 madres calificadas ibéricas puras, todas ellas nulíparas que habían sido cubiertas por monta natural con verracos ibéricos 100%.

- Grupo de control: Formado por 5 hembras reproductoras y sus lechones (n=35).
- Grupo suplementado con postbióticos (PB): Formado por 9 hembras reproductoras y sus lechones (n=61).



Recuentos de bacterias en unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/mL). AMT: aerobios mesófilos totales, BAL: bacterias ácido lácticas.

El consumo de postbióticos **triplica** la población de **BAL** maximizando la rentabilidad de la microbiota

4 - DEMOSTRACIÓN INMUNOMODULADORA Y AUMENTO DE VITALIDAD

Antecedentes

Si la anemia es la antítesis de unas buenas condiciones de salud, minimizar el riesgo de sufrirla, evitarla o combatirla es uno de los objetivos principales que persigue el organismo.

Objetivo

Demostrar que el uso de POSTBIÓTICOS favorece el crecimiento de la serie roja en hemograma, equilibra la cantidad de glóbulos blancos y plaquetas, estimulando condiciones óptimas para el organismo.

Caso de estudio

Explotación porcina 100% ibérica pura

Se incluyeron en el estudio 14 madres calificadas ibéricas puras, todas ellas nulíparas que habían sido cubiertas por monta natural con verracos ibéricos 100%.

- Grupo de control: Formado por 5 hembras reproductoras y sus lechones (n=35).
- Grupo suplementado con postbióticos (PB): Formado por 9 hembras reproductoras y sus lechones (n=61).

	Valores de referencia	Unidades	Media Control	Media Postbióticos	Diferencia
SERIE ROJA					
Hematíes (RBC)	5,3 - 8,0	x106/ul	7,97	8,32	4,4%
Hemoglobina	9,0 - 14,0	g/dL	11,47	13,9	21,2%
Hematocrito	26,0 - 41,0	%	36,14	43,33	19,9%
MCV	42 - 62	fL	45,52	52,21	14,7%
MCH	14 - 21	pg	14,45	16,76	16,0%
MCHC	32 - 36	g/dL	31,72	32,09	1,2%
SERIE BLANCA					
Leucocitos (WBC)	8,7 - 37,9	x103/ul	25,47	17,67	-30,6%
SERIE PLAQUETAR					
Plaquetas	211 - 887	x103/ul	877,5	686,76	-21,7%

Hemogramas completos de ambos grupos, valores de referencia y sus unidades.

Las diferencias observadas pueden deberse al mejor aprovechamiento y digestión de los nutrientes en los animales suplementados, incluyendo vitaminas como la B12 o la K y minerales como el hierro, que participan en los procesos de regulación de la hematopoyesis (Rowland, 2017).³¹ Además, es especialmente destacable en la especie porcina puesto que los lechones nacen con reservas mínimas de hierro y es habitual la administración de este mineral al nacimiento, por lo que en este caso se mejoraría su aprovechamiento (Perri, 2016).³²

Por otro lado, los menores niveles de glóbulos blancos descartan la presencia de procesos infecciosos subclínicos. Este parámetro, unido a los resultados de los anteriores indicadores de salud, concuerda con el efecto sobre el sistema inmune de las bacterias ácido lácticas, que son capaces de modular la repuesta inmune innata y adaptativa previniendo la colonización por agentes patógenos y reforzando los mecanismos de defensa en el caso de que se produzca una infección (Pagnini, 2010).³³

Consumo postbióticos aumenta la vitalidad del organismo y modula la respuesta inmune innata y adaptativa

5 - RESUELVE DE MANERA MÁS EFICIENTE TRANSTORNOS DIGESTIVOS

Antecedentes

Los cambios bruscos de alimentación producen un desequilibrio en la microbiota del tracto gastrointestinal, que ocasiona la sintomatología asociada a problemas digestivos, fundamentalmente la presencia de diarreas.

Objetivo

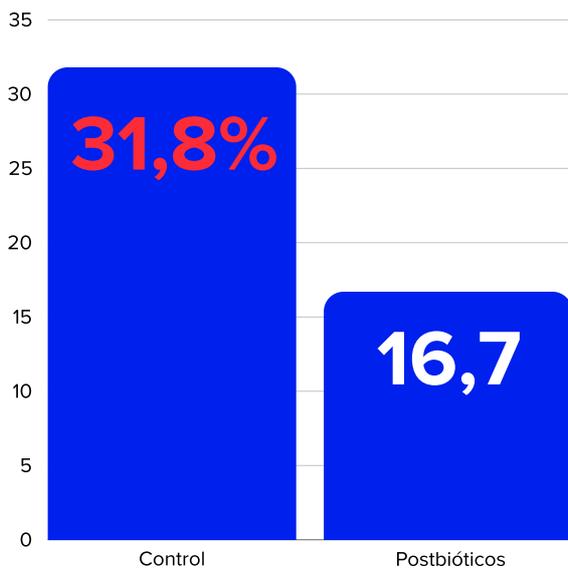
Demostrar que el uso de POSTBIÓTICOS minimiza el riesgo de sufrir diarreas cuando un perro cambia de alimentación y maximiza la vitalidad del animal.

Caso de estudio

Rehala de 46 perros de trabajo

Se introdujo un nuevo pienso en su dieta y se analizaron los resultados dos meses después.

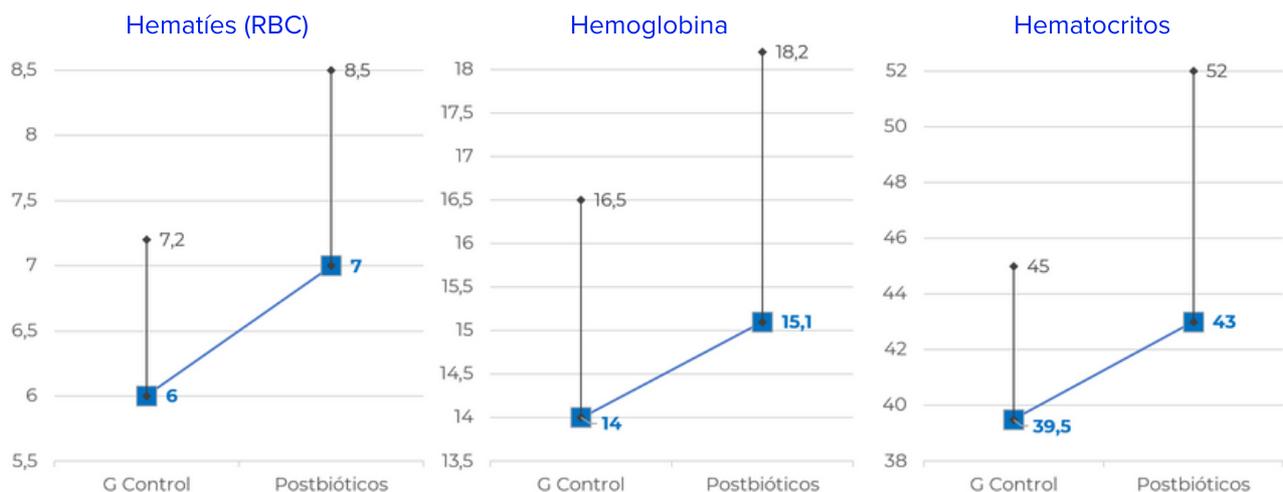
- Grupo de control: 23
- Grupo suplementado con postbióticos (PB): 23



La suplementación con postbióticos ante cambios de alimentación reduce el riesgo de diarreas un **47%**

Hemograma

La administración de postbiótico en los perros mejora los parámetros analíticos de la hematología relacionados con la serie roja especialmente la proporción de glóbulos rojos y un incremento en su funcionalidad.



6 - CASOS CLÍNICOS EN PERROS Y GATOS CON TRASTORNOS DIGESTIVOS

N	Especie	Signos clínicos	Etiología	Patologías previas	Dosis	Otros tratamientos	Resolución
1	Perro	Diarrea aguda líquida, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Desconocida	No conocidas	3	No	Sí
2	Gato	Diarrea crónica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Sospecha alimentaria	No conocidas	3	Cambio alimentación	No
3	Gato	Íleo paralítico, alteración en frecuencia y consistencia deposiciones crónica, anorexia, apatía, no emesis	Sospecha disbiosis	Neumonía por aspiración megaloesófago, íleo paralítico	4	Marbifloxacino, Amoxicilina/clavulánico, cintaprida, meloxicam, butorfanol y mirtazapina	Sí
4	Perro	Gastroenteritis hemorrágica aguda con diarrea, anorexia, apatía, no emesis	Piometra	Piometra, insuficiencia renal e hipoglucemia	3	Cirugía, fluidoterapia, metronidazol, aglepristona, omeprazol	Sí
5	Perro	Diarrea aguda, no hemorrágica, anorexia, dolor abdominal, emesis	Sospecha alimentaria	No conocidas	3	Cambio alimentación (dieta gastrointestinal), maropitant	Sí
6	Perro	Diarrea aguda, no hemorrágica, apetito normal, no dolor abdominal, emesis	Sospecha alimentaria	No conocidas	2	No	Sí
7	Perro	Diarrea aguda, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Sospecha alimentaria	No conocidas	3	Cambio alimentación (dieta gastrointestinal)	Sí
8	Perro	Diarrea aguda, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Sospecha alimentaria	No conocidas	3	No	Sí
9	Perro	Diarrea aguda, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Desconocida	No conocidas	3	No	Sí
10	Perro	Diarrea aguda, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Desconocida	No conocidas	3	No	Sí
11	Gato	Diarrea crónica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Desconocida	Virusis	3	No	Sí
12	Gato	Diarrea aguda, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Desconocida	No conocidas	3	No	Sí
13	Gato	Diarrea aguda, no hemorrágica, anorexia, no emesis, dolor abdominal	Desconocida	No conocidas	3	No	Sí
14	Perro	Diarrea aguda, no hemorrágica, anorexia, no emesis, no dolor abdominal	Desconocida	No conocidas	3	No	Sí
15	Perro	Diarrea crónica, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal	Desconocida	Diabetes	3	Probióticos	Sí
16	Perro	Diarrea crónica, no hemorrágica, apetito normal, no emesis, no dolor abdominal, ascitis	Enteropatía pérdida de proteínas	Enteropatía pérdida de proteínas	3	Prednisolona y metronidazol	Sí
17	Perro	Diarrea aguda hemorrágica, anorexia, emesis, no dolor abdominal	Desconocida	Alteración gastrointestinal crónica	2	Desconocido	No

Se realizó el estudio en 6 centros veterinarios de la comunidad autónoma de Extremadura en el periodo de tiempo comprendido entre diciembre de 2023 hasta abril de 2023. A los veterinarios de los centros seleccionados se les impartió previamente una formación sobre el producto y su utilidad. Los criterios de inclusión de pacientes fue la presencia de sintomatología digestiva con presencia de diarreas de curso agudo o crónico en perros y gatos que acuden a consulta de medicina interna, especialmente de etiología desconocida. Se consideró como criterio de exclusión la presencia de vómitos sin alteración en las deposiciones, las toxiinfecciones o intoxicaciones químicas confirmadas mediante pruebas complementarias y la ingesta de cuerpos extraños que requieran cirugía.

La pauta de administración recomendada a los veterinarios de los centros incluidos en el estudio fue de 3 dosis de 1 mL por 5 Kg de peso por vía oral separadas en intervalos de entre 8 y 12 horas. Se dejó a criterio del veterinario la administración de dosis extra.

NOTA: Las dosis pautadas contienen una concentración 4:1 de FORTEBIÓTICOS. Es decir, cada gota de FORTEBIÓTICOS equivale a 4 gotas del producto suministrado en los casos documentados en la tabla.

FORTEBIÓTICOS se diseñó tras este estudio con una concentración x4 para equilibrar la posología 1:1 (una gota por cada Kg de peso del paciente)

Fortebióticos

L. plantarum CECT9608 y *L. paracasei* CECT9610



DOSSIER TÉCNICO

REFERENCIAS

- 1)** Karczewski, J., Poniedziałek, B., Adamski, Z., & Rzymiski, P. (2014). The effects of the microbiota on the host immune system. *Autoimmunity*, 47(8), 494–504.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., & Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *European Journal of Nutrition*, 57(1), 1–24.
- 2)** Aguilar-Toalá, J., García-Varela, R., García, H., Mata-Haro, V., González-Córdova, A., Vallejo-Cordoba, B., & Hernández-Mendoza, A. (2018a). Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. *Trends in Food Science & Technology*, 75, 105–114.
- 3)** Ekblad, B., Kyriakou, P. K., Oppegård, C., Nissen-Meyer, J., Kaznessis, Y. N., & Kristiansen, P. E. (2016). Structure–function analysis of the two-peptide bacteriocin plantaricin EF. *Biochemistry*, 55(36), 5106–5116.
- 4)** Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., & Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), 1562–1574.
- 5)** Ward, D., & Somkuti, G. (1995). Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ST134. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43(2), 330–335.
- 6)** Herbin, S., Mathieu, F., Brulé, F., Branlant, C., Lefebvre, G., & Lebrihi, A. (1997). Characteristics and genetic determinants of bacteriocin activities produced by *Carnobacterium piscicola* CP5 isolated from cheese. *Current Microbiology*, 35(6), 319–326.
- 7)** Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., & Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), 1562–1574.
- 8)** Diep, D. B., Straume, D., Kjos, M., Torres, C., & Nes, I. F. (2009). An overview of the mosaic bacteriocin pln loci from *Lactobacillus plantarum*. *Peptides*, 30(8), 1562–1574.
- 9)** O’Shea, E. F., O’Connor, P. M., Raftis, E. J., O’Toole, P. W., Stanton, C., Cotter, P. D., Ross, R. P., & Hill, C. (2011). Production of multiple bacteriocins from a single locus by gastrointestinal strains of *Lactobacillus salivarius*. *Journal of Bacteriology*, 193(24), 6973–6982.
- 10)** Bravo, M., Combes, T., Martinez, F. O., Risco, D., Gonçalves, P., Garcia-Jimenez, W. L., Cerrato, R., Fernandez-Llario, P., & Gutierrez-Merino, J. (2022). Wildlife Symbiotic Bacteria Are Indicators of the Health Status of the Host and Its Ecosystem. *Applied and Environmental Microbiology*, 88(1), e01385-21.
- 11)** Aderem, A. (2003). Phagocytosis and the inflammatory response. *The Journal of Infectious Diseases*, 187(Supplement_2), S340-5.
- 12)** Kaufmann, S. H., & Dorhoi, A. (2016). Molecular determinants in phagocyte-bacteria interactions. *Immunity*, 44(3), 476–491.
- 13)** Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49–62.
- 14)** Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., & Margolles, A. (2015a). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1285.
- 15)** Ren, C., Zhang, Q., De Haan, B. J., Zhang, H., Faas, M. M., & De Vos, P. (2016). Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Scientific Reports*, 6(1), 1–12.
- 16)** Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., & Margolles, A. (2015b). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1285.
- 17)** Stedman, A., van Vliet, A. H., A. Chambers, M., & Gutierrez-Merino, J. (2020). Gut commensal bacteria show beneficial properties as wildlife probiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1467(1), 112–132.
- 18)** Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., & Margolles, A. (2015b). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1285.

REFERENCIAS

- 19)** Ren, C., Zhang, Q., De Haan, B. J., Zhang, H., Faas, M. M., & De Vos, P. (2016). Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Scientific Reports*, 6(1), 1-12.
- 20)** Barragán, P. J., Sanchez, O. J., & Henao-Rojas, J. C. (2020). Evaluation of the Growth Kinetics of *Lactobacillus Plantarum* ATCC 8014 on a Medium Based on Hydrolyzed Bovine Blood Plasma at Laboratory and Bench-Scale Levels and Its Application as a Starter Culture in a Meat Product. *Fermentation*, 6(2), 45.
- 21)** Hutchings, M. I., Palmer, T., Harrington, D. J., & Sutcliffe, I. C. (2009). Lipoprotein biogenesis in Gram-positive bacteria: Knowing when to hold 'em, knowing when to fold 'em. *Trends in Microbiology*, 17(1), 13-21.
- 22)** Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., & Margolles, A. (2015b). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Frontiers in Microbiology*, 6, 1285.
- 23)** Hörmannspurger, G., von Schillde, M.-A., & Haller, D. (2013). Lactocepin as a protective microbial structure in the context of IBD. *Gut Microbes*, 4(2), 152-157.
- 24)** Hegarty, J. W., Guinane, C. M., Ross, R. P., Hill, C., & Cotter, P. D. (2016). Bacteriocin production: A relatively unharnessed probiotic trait? *F1000Research*, 5.
- 25)** Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., Kaneko, D., Kumagai, Y., You, D.-J., & Carreras, J. (2013). Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon- β . *Immunity*, 38(6), 1187-1197.
- 26)** Negishi, H., Miki, S., Sarashina, H., Taguchi-Atarashi, N., Nakajima, A., Matsuki, K., Endo, N., Yanai, H., Nishio, J., & Honda, K. (2012). Essential contribution of IRF3 to intestinal homeostasis and microbiota-mediated Tslp gene induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(51), 21016-21021.
- 27)** Stedman, A., van Vliet, A. H., A. Chambers, M., & Gutierrez-Merino, J. (2020). Gut commensal bacteria show beneficial properties as wildlife probiotics. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1467(1), 112-132.
- 28)** Kawashima, T., Kosaka, A., Yan, H., Guo, Z., Uchiyama, R., Fukui, R., Kaneko, D., Kumagai, Y., You, D.-J., & Carreras, J. (2013). Double-stranded RNA of intestinal commensal but not pathogenic bacteria triggers production of protective interferon- β . *Immunity*, 38(6), 1187-1197.
- 29)** Koyama, S., Ishii, K. J., Coban, C., & Akira, S. (2008). Innate immune response to viral infection. *Cytokine*, 43(3), 336-341.
- 30)** Lebedeva, E., Bagaev, A., Pichugin, A., Chulkina, M., Lysenko, A., Tutykhina, I., Shmarov, M., Logunov, D., Naroditsky, B., & Ataulakhanov, R. (2018). The differences in immunoadjuvant mechanisms of TLR3 and TLR4 agonists on the level of antigen-presenting cells during immunization with recombinant adenovirus vector. *BMC Immunology*, 19(1), 1-14.
- 31)** Rowland, I, Gibson, G, Heinken, A, Scott, K, et al. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition* 2017; 57(1), 1-24.
- 32)** Perri, AM, Friendship, RM, Harding, J. C., & O'Sullivan, TL. An investigation of iron deficiency and anemia in piglets and the effect of iron status at weaning on posweaning performance. *Journal of Swine Health and Production* 2016; 24(1), 10-20
- 33)** Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO et al. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(1), 454-459.