

## Evaluation of hemochemical changes in the blood of piglets supplemented with two microbial preparations

### Evaluación de los cambios hemoquímicos en la sangre de lechones suplementados con dos preparados microbianos

J.E. Miranda<sup>1,2</sup>, A. Marín<sup>2</sup>, L.I. Marrero<sup>2</sup>, Yaneisy García<sup>3</sup> and J.R. García-Díaz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Beuario del Instituto de Fomento al Talento Humano, SENESCYT, Ecuador

<sup>2</sup>Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Apartado Postal 54830, Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Cuba

<sup>3</sup>Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba

Email: efra\_miranda@outlook.com

To evaluate the effect of two microbial preparations on the hematological and biochemical blood values of pigs, 120 piglets were used (Duroc/Yorkshire/Landrace), distributed according to a completely randomized design into three groups of 40 animals each: T1) control; T2) microbial preparation A and T3) microbial preparation B. Treatment T2 contained *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus*. T3 was composed by T2 microorganisms plus *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV). At 14 and 42 days of age of the piglets, samples were taken to evaluate the effect of additives in the hematological profile and blood biochemistry. Values of hemoglobin, hematocrit and erythrocytes, as well as high density lipoproteins were higher ( $P < 0.05$ ) in T3 for both ages of animals. Evaluation of hemochemical changes in the blood of piglets supplemented with two microbial preparations. While, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular concentration and total proteins were lower ( $P < 0.05$ ) in T2 and T3, leukocytes, basophils, eosinophils, albumin, glucose and triglycerides were higher ( $P < 0.05$ ) in the animals of control group. However, values of blood concentration and blood biochemistry were among the normal parameters for this species. It is concluded that the addition of microbial preparations with probiotic activity to the diets of piglets favorably improves the values of the blood and biochemical profile of the blood and, thereby, improves the physiological state and health of the animals.

Key words: blood values, blood biochemistry, young pigs, probiotics, agro-industrial byproducts

Nowadays, swine production undergoes nutritional, social and environmental changes that induce stress responses, which generates greater susceptibility to infection (Pajarillo *et al.* 2014). Evidently, inadequate management can have immediate negative effects on physiology and performance of the animals (Ponnampalam *et al.* 2011).

Bacterial infections are the most common in piglets and cause pathological processes that affect the full blood count (Ayala *et al.* 2008). Generally, antibiotics are used as therapeutic, prophylactic, as well as growth promoters. In many cases, they are used to counteract several pathogens and in some cases, to control outbreaks of infection (Ahmed *et al.* 2014). The increasing of microbial resistance to antibiotics caused the European Union, since 2006, to prohibit its use

Para evaluar el efecto de dos preparados microbianos en los valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos de lechones se utilizaron 120 cerditos (Duroc/Yorkshire/Landrace), distribuidos según diseño completamente aleatorizado en tres grupos de 40 animales cada uno: T1) control; T2) preparado microbiano A y T3) preparado microbiano B. El T2 contenía *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. El T3 estuvo compuesto por los microorganismos del T2 más *Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV). A los 14 y 42 d de edad de los lechones, se tomaron muestras para evaluar el efecto de los aditivos en el perfil hematológico y bioquímica sanguínea. Los valores de hemoglobina, hematocrito y eritrocitos, así como las lipoproteínas de alta densidad fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en el T3 para ambas edades de los animales. Mientras que, volumen corpuscular media, hemoglobina corpuscular media, concentración corpuscular media y proteínas totales fueron menores ( $P < 0.05$ ) en el T2 y T3. Los leucocitos, basófilos, eosinófilos, albúmina, glucosa y triglicéridos fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en los animales del grupo control. No obstante, los valores de la concentración hemática y bioquímica sanguínea estuvieron entre los parámetros normales para esta especie. Se concluye que la adición de los preparados microbianos con actividad probiótica en las dietas de cerdos jóvenes mejora favorablemente los valores del perfil hemático y bioquímico de la sangre y con ello, mejoran el estado fisiológico y la salud de los animales.

Palabras clave: valores hemáticos, bioquímica sanguínea, cerdos jóvenes, probióticos, subproductos de la agroindustria.

En la actualidad, la producción porcina experimenta cambios nutricionales, sociales y ambientales, que inducen a respuestas de estrés, lo que genera mayor susceptibilidad a contraer infecciones (Pajarillo *et al.* 2014). Evidentemente, el manejo inadecuado puede provocar efectos negativos inmediatos en la fisiología, desempeño y comportamiento del animal (Ponnampalam *et al.* 2011).

Las infecciones bacterianas son las más comunes en los cerdos jóvenes y causan procesos patológicos que repercuten en los cuadros hemáticos (Ayala *et al.* 2008). Generalmente, los antibióticos se emplean como terapéuticos, profilácticos, así como promotores del crecimiento. En muchos casos se utilizan para contrarrestar diversos agentes patógenos y en algunos, para controlar los brotes de infección (Ahmed *et al.* 2014). El nivel creciente de resistencia microbiana ante

as growth promoters in animals (Dadvar *et al.* 2015). Therefore, taking into account the economic losses caused by diarrheal disorders, it was necessary to look for alternatives to mitigate these physiological disorders in animals (Lye *et al.* 2012).

Biological media, such as probiotics, are microbial additives obtained from monocultures or mixed cultures, which inhibit the growth of pathogens in the gastrointestinal tract (Colina *et al.* 2011). Likewise, they play a role in the maintenance of the function of intestinal barrier and local and systemic modulation of the immune system, which contributes to improve the health of the host (Londoño and Parra 2015). Hence, the objective of this study is to evaluate the effect of two microbial preparations on hematological values and blood biochemicals of piglets, at 14 and 42 d of age.

### Materials and Methods

The experimental study was carried out in the pig production unit "Gahujón Alto", Canton Colta, Ecuador. The unit is located at 1° 53' 12.248" SL longitude 78° 43' 22.454" LW, 3 510 m.o.s.l. (meters over sea level), with annual precipitation between 500 and 1,000 mm. Minimum, maximum and average temperature is 3, 14 and 10 °C, with annual relative humidity of 80 % and annual evapotranspiration of 69.03.

*Experimental treatments and design.* A completely randomized design with four repetitions per treatment was used, where each experimental unit was composed by twelve piglets. Evaluated treatments were: T1) control; T2) microbial preparation A and T3) microbial preparation B.

*Animals.* An amount of 120 Duroc x Landrace/Yorshire crossbreed piglets were used, which descendants of 12 first farrowing sows (Landrace/Yorkshire), with  $135.6 \pm 2$  kg of liveweight (LW) and  $235 \pm 3$  d of age. Four pregnant sows were used per treatment, housed in collective pens of 6 x 6.5 m wide and cement floor, with a density of 1.6 m<sup>2</sup> per animal, from gestation to 110 d of gestation. After parturition, piglets were distributed at random to form the experimental groups with 40 animals per treatment (20 females and 20 males). From this moment until weaning, they were settled in maternity area. Piglets after weaning were regrouped (without altering the groups of origin) with 20 piglet, in pens of 6 x 6.5 m in cement floors. The food used was Bioalimentar® (Ambato, Ecuador), which meets the nutritional requirements for pigs, recommended by NRC (2012). Bioalimentar was offered to sows twice a day, at 7:00 a.m. and 4:00 p.m., and the piglets received it *ad libitum* from 7 d of age up to weaning. From there until 42 d of age, they were fed at the same time as their mothers. Water was also provided *ad libitum* in nipple troughs.

*Animal management system.* Maternity was

los antibióticos provocó que la Unión Europea desde 2006 prohibiera su utilización como promotores del crecimiento en los animales (Dadvar *et al.* 2015). Por ello, al tener en cuenta las pérdidas económicas causadas por los trastornos diarréicos, fue necesario buscar alternativas atenuantes para mitigar estos trastornos fisiológicos en los animales (Lye *et al.* 2012).

Los medios biológicos, como los probióticos, son aditivos microbianos obtenidos a partir de los monocultivos o cultivos mixtos, que inhiben el crecimiento de agentes patógenos en el tracto gastrointestinal (Colina *et al.* 2011). Asimismo, intervienen en el mantenimiento de la función de la barrera intestinal y la modulación local y sistémica del sistema inmune, lo que contribuye a mejorar la salud del huésped (Londoño y Parra 2015). De ahí que el objetivo de este estudio sea evaluar el efecto de dos preparados microbianos en los valores hematológicos y bioquímicos sanguíneos de lechones, a los 14 y 42 d de edad.

### Materiales y Métodos

El trabajo experimental se realizó en la unidad de producción porcina Gahujón Alto, Cantón Colta, Ecuador. La unidad está localizada en 1° 53' 12.248 "LS longitud 78° 43' 22.454 "LW, 3 510 msnm (metros sobre nivel del mar), con precipitación anual entre 500–1 000 mm. La temperatura mínima, máxima y media es de 3, 14 y 10 °C, con humedad relativa anual de 80 % y evapotranspiración anual de 69.03.

*Diseño y tratamientos experimentales.* Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones por tratamiento, donde cada unidad experimental estuvo compuesta por doce lechones. Los tratamientos evaluados fueron: T1) control; T2) preparado microbiano A y T3) preparado microbiano B.

*Animales.* Se emplearon 120 cerditos, cruce Duroc x Landrace/Yorshire, descendientes de 12 cerdas primerizas (Landrace/Yorkshire), con  $135.6 \pm 2$  kg de peso vivo (PV) y  $235 \pm 3$  d de edad. Se emplearon cuatro cerdas gestantes por tratamiento, alojadas en corrales colectivos de 6 x 6.5 m y piso de cemento, con densidad de 1.6 m<sup>2</sup> por animal, desde la gestación hasta 110 d de gestación. Después del parto, los cerditos se distribuyeron al azar para conformar los grupos experimentales con 40 animales por tratamiento (20 hembras y 20 machos). Desde este momento hasta el destete se ubicaron en la maternidad. Los lechones a partir del destete se reagruparon (sin alterar los grupos de procedencia) con 20 cerditos, en corrales de 6 x 6.5 m en pisos de cemento. El alimento utilizado fue Bioalimentar® (Ambato, Ecuador), que cumple con los requerimientos nutricionales para cerdos, recomendados por NRC (2012). El Bioalimentar se ofreció a las reproductoras dos veces por día, a las 7:00 a.m. y 4:00 p.m., y a los cerditos se les ofreció *ad libitum* a partir de los 7 d de edad hasta el destete. De ahí hasta los 42 d de edad, se alimentaron en el mismo horario que a sus madres. El agua también se suministró *ad libitum* en bebederos tipo tetinas.

*Sistema de manejo de los animales.* La maternidad se

maintained at 28 °C during the first two weeks after parturition. Later, this temperature was reduced in 1.5 °C every week until weaning. Photoperiod was controlled with 12 h of light and 12 h of darkness. The litters of each treatment were located distant from each other (with an intermediate pen on both sides of the corridor) to avoid self-inoculation. Piglets were weaned at 33 d of age. Piglets from each group under study received the proper veterinary attention, according to the Manual de Manejo de Hembras y Primerizas (Coates *et al.* 2013).

**Microbial preparations.** The strains used in the preparations were *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV), from the Bank of Microorganisms of the Universidad Central “Marta Abreu” of Las Villas, and four ATCC (American Type Cultures Collection, USA) strains, which were *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* and *Saccharomyces cerevisiae*. These strains were activated in skim milk at 37 °C for 24 h. To obtain the preparations, the mixture of sugarcane molasses and orange vinasse was used as a substrate and fermented at 37°C for 24 h, according to the methodology described by Miranda *et al.* (2017). In preparation A, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* and *S. thermophilus* were used and in B, the previous bacteria plus *S. cerevisiae* and *K. fragilis* yeasts (L-4 UCLV) were also used. Chemical composition and microbial concentration of each preparation are shown in table 1.

mantuvo a 28 °C de temperatura durante las dos primeras semanas postparto, posteriormente se redujo en 1.5 °C cada semana hasta el destete. El fotoperíodo se controló con 12 h de luz y 12 h de oscuridad. Las camadas de cada tratamiento se ubicaron distantes unas de otras (con un cuartón intermedio a ambos lados del pasillo) para evitar la auto inoculación. Los lechones se destetaron a los 33 d de edad. Los cerditos provenientes de cada grupo en estudio recibieron las atenciones veterinarias pertinentes, según el Manual de Manejo de Hembras y Primerizas (Coates *et al.* 2013).

**Preparados microbianos.** Las cepas utilizadas en los preparados fueron *Kluyveromyces fragilis* (L-4 UCLV), proveniente del Banco de Microorganismos de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y cuatro cepas ATCC (American Type Cultures Collection, EEUU): *Lactobacillus acidophilus*, *L. bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* y *Saccharomyces cerevisiae*. Estas cepas se activaron en leche descremada a 37 °C durante 24 h. Para la obtención de los preparados se utilizó como sustrato la mezcla de melaza de caña de azúcar y vinaza de naranja y se fermentó a 37°C durante 24 h, según la metodología descrita por Miranda *et al.* (2017). En el preparado A se emplearon las bacterias *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* y en el B las bacterias anteriores, además de las levaduras *S. cerevisiae* y *K. fragilis* (L-4 UCLV). La composición química y la concentración microbiana de cada preparado se presentan en la tabla 1.

Table 1. Composition of microbial preparations to be included in the base diet of mother sows and their offspring

Indicators	Microbial preparations	
	Preparation A (T2)	Preparation B (T3)
Dry Matter, %	16.5	17.5
Crude Protein, %	15.2	16.1
True Protein, %	10.3	11.1
Ether Extract, %	2.86	2.53
Ashes, %	2.82	2.76
pH	3.88	3.85
Lactic acid, mmol/L	0.68	0.72
Microbial concentration, CFU/mL	9.2 x 10 <sup>7</sup>	9.5 x 10 <sup>8</sup>

**Use of additives in pigs.** Microbial preparations were provided to animals of groups T2 and T3 at 7:00 a.m. every three days. The breeding sows received 15 mL of additive, by mixing 0.3 kg of balanced food plus 0.5 L of water, from the day after the confirmation of pregnancy until weaning, according to the assigned treatment. The offspring continued to receive the same additive. The first dose applied to piglets was a single dose before having colostrum. Oral dosage varied according to age: 1 mL in the first week; 1.5 mL in weeks 2 and 3; 2 mL in weeks 4 and 5, and 2.5 mL in the following up to 42 d of age. Control group received normal saline

**Empleo de los aditivos en los cerdos.** Los preparados microbianos se suministraron a los animales de los grupos T2 y T3 a las 7:00 a.m. cada tres días. A las cerdas reproductoras se les proporcionó 15 mL de aditivo, al mezclar 0.3 kg de balanceado más 0.5 L de agua, a partir del día posterior de la confirmación de la gestación hasta el destete, según el tratamiento asignado. La descendencia continuó recibiendo el mismo aditivo. La primera dosis aplicada a los cerditos fue en mono dosis antes de tomar el calostro. La dosificación, en forma oral, varió de acuerdo con la edad: 1 mL en la primera semana; 1.5 mL en las semanas 2 y 3; 2 mL en

solution in the same amount as the treated groups.

*Experimental procedure for taking and analyzing samples.* At 14 and 42 d of age of the animals, 12 pigs of each treatment were randomly selected. They were immobilized and extracted 8 mL of blood from the jugular vein. These samples were taken in vacutainer tubes, with and without ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), using a California-type needle. Subsequently, they were transferred to the laboratory within the first three hours for further processing. The evaluation of the blood profile consisted of the determination of hemoglobin (Hb), hematocrit, erythrocyte, mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), leukocytes, basophils, eosinophils, lymphocytes and monocytes, through the methodology described by Kraft (1998) and Corredor (2012). Indicators of blood biochemistry were total proteins, albumin, glucose, triglycerides, total cholesterol, high-density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), determined according to Mejía *et al.* (2012) and Londoño and Parra (2015).

*Statistical analysis.* The experimental data were processed with the statistical package Statgraphic plus 15.1 for Windows. Analysis of variance was carried out according to a completely randomized design. In the necessary cases, Duncan (1955) comparison test was applied to discriminate differences between means at  $P < 0.05$ .

## Results

Table 2 shows the blood profile of the piglets, evaluated at 14 and 42 d of age. In both ages, differences were found with respect to control for all the evaluated indicators, except lymphocytes at 14 d of age. With the inclusion of microbial preparations, in both measurements, hemoglobin, hematocrit and erythrocytes increased ( $P < 0.05$ ). Hemoglobin was higher in T3, while hematocrit and erythrocytes did not differ between T2 and T3.

At 14 and 42 d, MCV and MCHC were higher ( $P < 0.05$ ) in T1 with respect to T2 and T3, without differences between these groups. This same effect was found for MCH at 42 d of age, not being so at 14 d, when differences were detected between T2 and T3, with a lower value in T3. Leukocytes and basophils also decreased with the inclusion of microbial preparations, without differences between T2 and T3 (table 2).

With respect to monocytes, in the evaluation performed at 14 d, the values were higher ( $P < 0.05$ ) for the animals treated with additives, being superior in T3. However, at 42 d old, this indicator was higher ( $P < 0.05$ ) in the control treatment, without differences between T2 and T3. There were no differences ( $P < 0.05$ ) among treatments for lymphocytes at 14 d.

las semanas 4 y 5, y 2.5 mL en las siguientes hasta los 42 d de edad. El grupo control recibió suero fisiológico en igual cantidad que los grupos tratados.

*Procedimiento experimental para la toma y análisis de las muestras.* A los 14 y 42 d de edad de los animales, se seleccionaron al azar 12 cerdos de cada tratamiento. Se inmovilizaron y se les extrajo 8 mL de sangre de la vena yugular. Estas muestras se tomaron en tubos vacutainer, con etilendiaminotetraacético (EDTA) y sin él, mediante una aguja tipo California. Posteriormente, se trasladaron al laboratorio dentro de las tres primeras horas para su posterior procesamiento. La evaluación del perfil hemático consistió en la determinación de hemoglobina (Hb), hematocrito, eritrocito, volumen corpuscular media (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), leucocitos, basófilos, eosinófilos, linfocitos y monocitos, mediante la metodología descrita por Kraft (1998) y Corredor (2012). Los indicadores de la bioquímica sanguínea fueron proteínas totales, albúmina, glucosa, triglicéridos, colesterol total, colesterol-lipoproteína de alta densidad (C-HDL) y colesterol-lipoproteína de baja densidad (C-LDL), determinados según la metodología de Mejía *et al.* (2012) y Londoño y Parra (2015).

*Análisis estadístico.* Los datos experimentales se procesaron con el paquete estadístico Statgraphic plus 15.1 para Windows. Se realizó análisis de varianza según diseño completamente aleatorizado. En los casos necesarios, se aplicó la dócima de comparación de Duncan (1955) para discriminar diferencias entre medias a  $P < 0.05$ .

## Resultados

En la tabla 2 se muestra el perfil hemático de los lechones, evaluados a los 14 y 42 d de edad. En ambas edades, se encontraron diferencias con respecto al control para todos los indicadores evaluados, excepto los linfocitos a los 14 d de edad. Con la inclusión de los preparados microbianos, en las dos mediciones, aumentó la hemoglobina, hematocrito y eritrocitos ( $P < 0.05$ ). La hemoglobina fue mayor en el T3, mientras que el hematocrito y los eritrocitos no difirieron entre T2 y T3.

A los 14 y 42 d edad, el VCM y CHCM fueron mayores ( $P < 0.05$ ) en el T1 con respecto a T2 y T3, sin diferencias entre estos grupos. Este mismo efecto se encontró para HCM a los 42 d de edad, no siendo así a los 14 d, cuando se detectaron diferencias entre T2 y T3, con menor valor en T3. Los leucocitos y basófilos también disminuyeron con la inclusión de los preparados microbianos, sin diferencias entre T2 y T3 (tabla 2).

Con respecto a los monocitos, en la evaluación realizada a los 14 d, los valores fueron mayores ( $P < 0.05$ ) para los animales tratados con los aditivos, siendo superior en el T3. Sin embargo, a los 42 d de edad, este indicador fue mayor ( $P < 0.05$ ) en el tratamiento control, sin diferencias entre T2 y T3. No hubo diferencias ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos para los

Table 2. Full blood count (FBC) of piglets at 14 and 42 d of age, when supplemented with two microbial preparations

Parameters	Age, d	Treatments			± SE	P Value
		T1	T2	T3		
Hemoglobin, g/L	14	104.5 <sup>c</sup>	105.4 <sup>b</sup>	108.8 <sup>a</sup>	0.89	0.0130
	42	110.7 <sup>c</sup>	112.6 <sup>b</sup>	114.4 <sup>a</sup>	0.02	0.0070
Hematocrit, L/L	14	0.21 <sup>b</sup>	0.23 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a</sup>	0.01	0.0064
	42	0.28 <sup>b</sup>	0.30 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	1.32	0.0121
Erythrocytes, x10 <sup>12</sup> /L	14	3.45 <sup>b</sup>	4.33 <sup>a</sup>	4.72 <sup>a</sup>	0.07	0.0056
	42	5.32 <sup>b</sup>	6.21 <sup>a</sup>	6.65 <sup>a</sup>	0.01	0.0241
MCV, fL	14	49 <sup>a</sup>	45 <sup>b</sup>	45 <sup>b</sup>	0.12	0.0129
	42	39 <sup>a</sup>	37 <sup>b</sup>	36 <sup>b</sup>	1.22	0.0312
MCH, pg	14	29 <sup>a</sup>	27 <sup>b</sup>	25 <sup>c</sup>	0.07	0.0019
	42	20 <sup>a</sup>	18 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	0.32	0.0214
MCHC, g/L	14	421 <sup>a</sup>	408 <sup>b</sup>	406 <sup>b</sup>	0.29	0.0133
	42	345 <sup>a</sup>	335 <sup>b</sup>	330 <sup>b</sup>	0.11	0.0121
Leucocytes, x10 <sup>9</sup> /L	14	6.08 <sup>a</sup>	5.05 <sup>b</sup>	5.06 <sup>b</sup>	0.17	0.0129
	42	13.25 <sup>a</sup>	12.85 <sup>b</sup>	12.42 <sup>b</sup>	1.03	0.0034
Basophils, x10 <sup>9</sup> /L	14	0.12 <sup>a</sup>	0.11 <sup>b</sup>	0.10 <sup>b</sup>	0.02	0.0132
	42	0.38 <sup>a</sup>	0.25 <sup>b</sup>	0.23 <sup>b</sup>	0.11	0.0125
Eosinophils, x10 <sup>9</sup> /L	14	0.23 <sup>a</sup>	0.21 <sup>b</sup>	0.20 <sup>b</sup>	0.03	0.0017
	42	0.87 <sup>a</sup>	0.54 <sup>b</sup>	0.47 <sup>c</sup>	0.02	0.0012
Monocytes, x10 <sup>9</sup> /L	14	0.35 <sup>c</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0.50 <sup>a</sup>	0.01	0.0197
	42	2.45 <sup>a</sup>	1.85 <sup>b</sup>	1.74 <sup>b</sup>	1.12	0.0124
Lymphocytes, x10 <sup>9</sup> /L	14	1.12	1.01	1.05	0.04	0.6495
	42	3.2 <sup>a</sup>	2.1 <sup>b</sup>	1.88 <sup>c</sup>	0.12	0.0021

<sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts in the same row differ at P<0.05 (Duncan 1955)

T1, Base diet without additive. T2, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. T3, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* and *K. fragilis* (L-4 UCLV). MCV, mean corpuscular volume. MCH, mean corpuscular hemoglobin. MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration. Blood values used as reference of Kraft (1998) and Corredor (2012)

While at 42 d, it was higher (P < 0.05) in the animals that did not consume the microbial preparations (T1).

Table 3 shows the performance of blood biochemistry of piglets at 14 and 42 d old. In both ages, differences were found with respect to the control for all the evaluated indicators. Total protein was lower (P < 0.05) in the control with respect to the piglets that consumed the microbial preparations. Albumin was also lower (P < 0.05) in control animals with 14 d of age, without variations among treatments (T2 and T3). However, the opposite effect was observed for this indicator in the measurement at 42 d of age.

The glucose values decreased in piglets treated with the microbial preparations. Out of these, the lowest was (P < 0.05) in T3, at 42 d of age. Triglyceride, total cholesterol and LDL-C levels were lower in T2 and T3 with respect to animals in control group T1, while HDL-C values were increased in piglets treated with microbial cultures (T2 and T3).

linfocitos a los 14 d. Mientras que a los 42 d fue mayor (P < 0.05) en los animales que no consumieron los preparados microbianos (T1).

En la tabla 3 se muestra el comportamiento de la bioquímica sanguínea de los lechones a los 14 y 42 d de edad. En ambas edades, se encontraron diferencias con respecto al control para todos los indicadores evaluados. La proteína total fue menor (P < 0.05) en el control con respecto a los lechones que consumieron los preparados microbianos. La albúmina también fue menor (P < 0.05) en los animales del control con 14 d de edad, sin variaciones entre tratamientos (T2 y T3). Sin embargo, se observó efecto contrario para este indicador en la medición a los 42 d de edad.

Los valores de glucosa disminuyeron en los cerditos tratados con los preparados microbianos. De estos, el menor fue (P < 0.05) en el T3, a los 42 d de edad. Los índices de los triglicéridos, colesterol total y C-LDL fueron menores en T2 y T3 con respecto a los animales del grupo control T1), mientras que los valores de C-HDL se incrementaron en lechones tratados con los cultivos microbianos (T2 y T3).

Table 3. Performance of blood biochemistry of pigs at 14 and 42 d of age, supplemented with two microbial preparations

Indicators	Age, d	Treatments			± SE	P-value
		T1	T2	T3		
Total proteins g/L	14	83.05 <sup>b</sup>	85.42 <sup>a</sup>	85.68 <sup>a</sup>	0.12	0.0129
	42	85.33 <sup>b</sup>	87.31 <sup>a</sup>	87.63 <sup>a</sup>	1.22	0.0312
Albumin g/L	14	42.10 <sup>b</sup>	43.58 <sup>a</sup>	44.01 <sup>a</sup>	0.07	0.0019
	42	45.32 <sup>a</sup>	41.44 <sup>b</sup>	40.71 <sup>b</sup>	0.32	0.0214
Glucose mmol/L	14	6.43 <sup>a</sup>	5.52 <sup>b</sup>	5.52 <sup>b</sup>	0.29	0.0133
	42	7.62 <sup>a</sup>	6.33 <sup>b</sup>	5.53 <sup>c</sup>	0.11	0.0121
Triglycerides mmol/L	14	1.18 <sup>a</sup>	0.93 <sup>b</sup>	0.85 <sup>c</sup>	0.01	0.0064
	42	1.34 <sup>a</sup>	0.98 <sup>b</sup>	0.91 <sup>b</sup>	1.32	0.0121
Total cholesterol mmol/L	14	1.28 <sup>a</sup>	1.19 <sup>b</sup>	1.17 <sup>b</sup>	0.07	0.0056
	42	1.46 <sup>a</sup>	1.20 <sup>b</sup>	1.18 <sup>b</sup>	0.89	0.0130
HDL-C mmol/L	14	0.68 <sup>c</sup>	0.81 <sup>b</sup>	0.92 <sup>a</sup>	0.01	0.0197
	42	0.52 <sup>b</sup>	1.01 <sup>a</sup>	1.12 <sup>a</sup>	1.12	0.0124
LDL-C mmol/L	14	28.5 <sup>a</sup>	27.3 <sup>b</sup>	26.4 <sup>c</sup>	1.22	0.0312
	42	30.54 <sup>a</sup>	24.32 <sup>b</sup>	22.12 <sup>c</sup>	0.07	0.0019

<sup>a,b,c</sup> Means with different superscripts in the same row differ at  $P < 0.05$  (Duncan 1955)

T1, Base diet without additive. T2, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. T3, *L. acidophilus* + *L. bulgaricus* + *S. thermophilus* + *S. cerevisiae* and *K. fragilis* (L-4 UCLV). MCV, mean corpuscular volume. MCH, mean corpuscular hemoglobin. MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration. Blood values used as reference of Kraft (1998) and Corredor (2012)

## Discussion

Blood profile results of this study (Table 2) could be related to the substrate to ferment the previously mentioned microorganisms and with the microorganisms used and introduced with the diet to the mother sows and their offspring. This could favor the physiological changes in the piglets, possibly by improving the imbalance of the autochthonous microbiota of the gastrointestinal tract, which affected the values of blood indicators. In this sense, the results of this research agree in part with those reported by Ayala *et al.* (2008), who, when supplementing *Bacillus subtilis* with sows in the last gestation stage, observed higher ( $P < 0.05$ ) concentration of Hb and Hto in the animals that consumed this bioproduct, which indicates a probiotic effect on health of pigs. Muñoz *et al.* (2010) reported a slight decrease in physiological changes, as well as in the stabilization of blood values in pigs, by supplementing a mixed culture of lactic acid bacteria, based on the assumption that microbial preparations in piglets could improve passive immunity and reduce blood disorders, such as hemolysis or destruction of red blood cells (Sun *et al.* 2015). Regarding other blood indicators, values obtained in this study were among the reference limits for this species (Muñoz *et al.* 2010). However, some blood indicators obtained were favorable for the animals that consumed the microbial preparations, which can be attributed to the fact that probiotics had a favorable influence with a constant contribution

## Discusión

Los resultados de perfil hemático de este estudio (tabla 2) podrían estar relacionados con el sustrato para fermentar los microorganismos antes mencionados y con los microorganismos utilizados e introducidos con la dieta a las cerdas madres y su descendencia. Esto pudo favorecer los cambios fisiológicos en los cerdos jóvenes, posiblemente al mejorar el desequilibrio de la microbiota autóctona del tracto gastrointestinal, lo que repercutió en los valores de los indicadores hemáticos. En este sentido, los resultados de esta investigación concuerdan en parte con los informados por Ayala *et al.* (2008), quienes al suplementar *Bacillus subtilis* a cerdas madres en la última etapa de la gestación, observaron mayor ( $P < 0.05$ ) concentración de Hb y Hto en los animales que consumieron dicho bioproducto, lo que indica el efecto probiótico en la salud de los cerdos. Muñoz *et al.* (2010) informaron una ligera disminución de las alteraciones fisiológicas, así como de la estabilización en los valores hemáticos en cerdos, al suplementar un cultivo mixto de bacterias lácticas, a partir del supuesto de que los preparados microbianos en los cerdos jóvenes podrían mejorar la inmunidad pasiva y reducir trastornos hemáticos, como la hemólisis o la destrucción de los glóbulos rojos (Sun *et al.* 2015). En lo que se refiere a los otros indicadores hemáticos, los valores obtenidos en este estudio se encontraron entre los límites de referencia para esta especie (Muñoz *et al.* 2010). Sin embargo, algunos indicadores hemáticos obtenidos fueron favorables para los animales que consumieron los preparados microbianos, lo que se puede atribuir a que los probióticos influyeron

of blood-forming elements (Ayala *et al.* 2008). González *et al.* (1993) reported similar responses by supplementing microbial additives in pigs with six weeks old.

Regarding blood biochemistry of piglets at 14 and 42 d of age (table 3), it is confirmed that the use of the additives did not cause a negative effect on the animals, since the values of blood biochemistry of piglets were among the values considered normal for pigs by González *et al.* (1993) and Espinosa *et al.* (2008). Likewise, uniformity and superior degree of immunity is observed in the treated animals, attributed to the response that microbial preparations with probiotic capacity may cause, associated with eubiosis of intestinal biota that stimulates the response of lymphoid tissue and promotes better health state in piglets (Ahmed *et al.* 2014 and Dadvar *et al.* 2015). Similar results were reported by Ponnampalam *et al.* (2011) and Londoño and Parra (2015), by supplementing microbial additives in pigs. Colina *et al.* (2011) observed a reduction ( $P < 0.05$ ) in serum levels by supplementing lactic acid bacteria. Muñoz *et al.* (2010) also reported similar results, which could affirm the beneficial effect of microbial additives on animal health and its favorable repercussion for final consumer of pork (Lye *et al.* 2012). Pajarillo *et al.* (2014) and Sun *et al.* (2015) argued that the beneficial effect of probiotics occurs when they are ingested in adequate amounts and that the intestinal ecosystem of the host is modified. This, in turn, generates a beneficial microbial balance, which means a better animal health.

Another beneficial effect of microbial preparations is to act against hypercholesterolemia, reducing total cholesterol and LDL-C by balancing the natural microbiota of the gastrointestinal tract of the host (Ahmed *et al.* 2014). This study showed an increase of HDL-C and a reduction of LDL-C at 42 d of age, which may indicate that the animals consuming microbial preparations may have had better functioning of metabolic organs, despite that levels found in all evaluated treatments were within the normal reference range (Colina *et al.* 2011).

There is evidence of a decrease of postprandial curves of glycemia and insulin after providing *S. cerevisiae* in diet for goats (Dadvar *et al.* 2015). It is known for some time that ingestion of non-digestible carbohydrates modifies the kinetics of glucose absorption, reducing postprandial peaks of glycemia and insulinemia (Ros 2003). Changes in intestinal expression of released insulinotropic peptides in response to ingestion of microbial preparations may also have an important function in the lipid effects observed in this study. This could be, in turn, closely related to metabolic diseases and the composition of bacterial populations in the intestine of the host (Lye *et al.* 2012). In this study, glucose reduction was observed

favorablemente con un aporte constante de elementos hemoformadores (Ayala *et al.* 2008). Similares respuestas informaron González *et al.* (1993), al suplementar aditivos microbianos en cerdos con seis semanas de edad.

En lo que se refiere a la bioquímica sanguínea de los lechones a los 14 y 42 d de edad (tabla 3), se reafirma que la utilización de los aditivos no provocó un efecto negativo en los animales, ya que los valores de la bioquímica sanguínea de los lechones estuvieron entre los valores considerados normales para los cerdos por González *et al.* (1993) y Espinosa *et al.* (2008). A su vez, se constata uniformidad y grado de inmunidad superior en los animales tratados, atribuible a la respuesta que pueden provocar los preparados microbianos con capacidad probiótica, asociados a la eubiosis de la biota intestinal que estimula la respuesta del tejido linfóide y propicia mejor estado de salud en cerdos jóvenes (Ahmed *et al.* 2014 y Dadvar *et al.* 2015). Similares resultados informaron Ponnampalam *et al.* (2011) y Londoño y Parra (2015), al suplementar aditivos microbianos en cerdos. Colina *et al.* (2011) observaron reducción ( $P < 0.05$ ) en los niveles séricos al suplementar bacterias lácticas. Muñoz *et al.* (2010) refieren también resultados parecidos, lo que pudiera afirmar el efecto benéfico de los aditivos microbianos en la salud del animal y su repercusión favorable para el consumidor final de la carne de cerdo (Lye *et al.* 2012). Pajarillo *et al.* (2014) y Sun *et al.* (2015) argumentaron que el efecto benéfico de los probióticos se produce cuando se ingieren en cantidades adecuadas y se logra modificar el ecosistema intestinal del huésped. Esto, a su vez, genera un balance microbiano beneficioso, que se traduce en una mejor salud del animal.

Otro de los efectos benéficos de los preparados microbianos es actuar contra la hipercolesterolemia, reduciendo colesterolos totales y C-LDL mediante el equilibrio de la microbiota natural del tracto gastrointestinal del huésped (Ahmed *et al.* 2014). En esta investigación se observó aumento de C-HDL y reducción de C-LDL a los 42 d de edad, lo que puede indicar que los animales que consumieron preparados microbianos pudieron haber tenido mejor funcionamiento de órganos metabólicos, a pesar de que los niveles encontrados en todos los tratamientos evaluados estuvieron en el rango de referencia normal (Colina *et al.* 2011).

Existen evidencias de una disminución de las curvas posprandiales de glucemia e insulina tras la administración de *S. cerevisiae* en la dieta de las cabras (Dadvar *et al.* 2015). Es conocido desde hace tiempo que la ingestión de hidratos de carbono no digeribles modifica la cinética de absorción de glucosa, reduciendo los picos posprandiales de glucemia e insulinemia (Ros 2003). Los cambios en la expresión intestinal de péptidos insulinotrópicos liberados en respuesta a la ingestión de preparados microbianos puede también representar una función importante en los efectos lipídicos observados en este estudio. Esto podría estar a su vez estrechamente relacionado con las enfermedades metabólicas y la composición de las poblaciones

at 14 and 42 d of age in the animals that consumed the microbial preparations, which may indicate that animals had better functioning of metabolic organs, even though the levels found in all treatments were in the normal reference range (Colina *et al.* 2011 and Mejía *et al.* 2012).

It is concluded that the addition of the evaluated microbial preparations with probiotic capacity in diets for piglets favorably improves the values of the blood and biochemical profile of the blood and with it, the physiological state and the health of the animals.

### Acknowledgements

The main author thanks the Secretary of Higher Education, Science, Technology and Innovation for the Doctoral training scholarship. Likewise, gratitude is expressed to the Faculty of Sciences, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba (Ecuador) for facilitating the use of equipment and microbiology, clinical and bromatology laboratories to develop this study and the Ibero-American Agro-Bigdata Network and "Decision Support Systems" (DSS) for a sustainable agricultural sector (BIGDSSAGRO) for their support to this research.

Cuban Journal of Agricultural Science, Volume 52, Number 1, 2018.

bacterianas en el intestino del huésped (Lye *et al.* 2012). En este estudio se observó disminución de glucosa a los 14 y 42 d de edad en los animales que consumieron los preparados microbianos, lo que puede indicar que los animales tuvieron mejor funcionamiento de los órganos metabólicos, a pesar de que los niveles encontrados en todos los tratamientos estuvieron en el rango de referencia normal (Colina *et al.* 2011 y Mejía *et al.* 2012).

Se concluye que la adición de los preparados microbianos evaluados con capacidad probiótica en las dietas de cerdos jóvenes mejora favorablemente los valores del perfil hemático y bioquímico de la sangre y con ello, el estado fisiológico y la salud de los animales.

### Agradecimientos

El autor principal agradece a Secretaria de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación por la beca de formación de Doctoral. Asimismo, se expresa gratitud a la Facultad de Ciencias, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo, Riobamba (Ecuador) por facilitar el uso de los equipos y los laboratorios de microbiología, clínica y bromatología para desarrollar el presente estudio y a la Red Iberoamericana de Agro-Bigdata y "Decision Support Systems" (DSS) para un sector agropecuario sostenible (BIGDSSAGRO) por su apoyo a esta investigación.

### References

- Ahmed, S.T., Hoon, J., Hong, M. & Chul, Y. 2014. Evaluation of *Lactobacillus* and *Bacillus*-based probiotics as alternatives to antibiotics in enteric microbial challenged weaned piglets. *African J Microbiol Res* 8(1): 96-101.
- Ayala, L., Bocourt, R., Martínez, M., Castro, M. & Hernández, L. 2008. Respuesta productiva, hematológica y morfométrica de un probiótico comercial en cerdos jóvenes. *Rev Cubana de Cienc Agríc* 42(2):181-184.
- Coates, J., Corns, P.J., Juárez, A., MacDonald, R., McCulley, N., Melody, B., Minton, A., Molinari, R., Montes De Oca, H., Mosqueira, P., Neill, C., Pinilla, J.C., Piva & J., Teuber, R. 2013. Manual PIC de Manejo de Hembras y Primerizas. 100 Bluegrass Commons Blvd: Suite 2200: Hendersonville, TN 37075: EEUU.
- Colina, J., Méndez, A., Araque, H., Rueda, E., León, M. & Rossini, M. 2011. Lípidos sanguíneos en cerdos alimentados con pijiguao (*Bactris gasipaes* Kunth) y lisina sintética *Rev Mvz Córdoba* 16(3): 2668-2677
- Corredor, R. 2012. Perfil hemático de cerdos alimentados con follaje de Morera *Morus alba*. *Rev CITECSA* 2(3): 27-35.
- Dadvar, P., Dayani, O., Mehdipour, M. & Morovat, M. 2015. Determination of physical characteristics, chemical composition and digestion coefficients of treated lemon pulp with *Saccharomyces cerevisiae* in goat diet. *J Anim Physiol and Anim Nutrit* 99(1):107-113.
- Duncan, D.B. 1955. Multiple range and multiple F tests. *Biometrics* 11:1.
- Espinosa, V., García, A., Herrera, J., Álvarez, A., Estrada, S. & Meza, M. 2008. Efecto del extracto de *Yucca schidigera* en el perfil bioquímico y hemático de cerdos en crecimiento y engorde. *Rev Científica (Maracaibo)* 18(1):51 – 58.
- González, D., Cisneros, M., Martínez, A., Zendejasm, V. & Morilla, A. 1993. Perfil inmunológico de los cerdos durante las primeras diez semanas de edad. *Rev Tec Pecuaria México* 24(3): 217-221.
- Kraft, H. 1998. Hematología. Análisis químico clínico de sangre. En: Métodos de laboratorio clínico en medicina veterinaria de mamíferos domésticos. Ed. Acribia 1998. España pp 23-82.
- Londoño, S. & Parra, J. 2015. Efecto de la adición de cepas probióticas sobre metabolitos sanguíneos en cerdos en crecimiento. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial* 13(2): 49-56.
- Lye, H., Khoo, Y., Karim, A., Rusul, G. & Liang, T. 2012. Growth properties and cholesterol removal ability of electroporated *Lactobacillus acidophilus* BT 1088. *J Microbiol and Biotechnol* 22(7): 981-989.
- Mejía, K., Lemus, C., Huerta, R., Almague, R. & Ly, J. 2012. Niveles séricos de triglicéridos y colesterol en cerdos cuino mexicano. *Rev Comput de Prod Porc (RCPP)* 19(1): 37-41.
- Miranda, J.E., Marin, A. & Baño, D. 2017. Elaboration of a bioprepared with probiotic effect from a mixed culture of lactic bacteria and yeasts. *Bionatura* 2(1): 245-247.
- Muñoz, D., Ruiz, A., González, M., Islas, A., Díaz, N. & Quezada, M. 2010. Estudios hematológicos y patológicos comparativos de cerdos inoculados con un aislado de campo y el serotipo 5 ATCC de *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Arch Med Vet* 42(1): 57-65
- National Research Council (NRC) 2012. Nutrient Requirements of Swine: Eleventh Revised Edition. Washington, DC: The



National Academies.

- Pajarillo, E., Chae, J., Balolong, M., Kim, H. & Kang, D. 2014. Assessment of fecal bacterial diversity among healthy piglets during the weaning transition. *J Gener and Appl Microbiol* 60(4): 140–146.
- Ponnampalam, E., Lewandowski, P., Nesarstnam, K., Dunshea, R. & Gill, H. 2011. Differential effects of natural palm oil, chemically-and enzymatically-modified palm oil on weight gain, blood lipid metabolites and fat deposition in a pediatric pig model. *Nutrition Journal* 10(53): 1-7.
- Ros, E. 2003. Prebióticos y probióticos en la regulación del metabolismo de los lípidos. *Gastroenterol Hepatol* 26(1): 31-36
- Sun, Y., Park, I., Guo, J., Weaver, A. & Sung, K. 2015. Impacts of low level aflatoxin in feed and the use of modified yeast cell wall extract on growth and health of nursery pigs. *Animal Nutrition* 1(3):177–183

**Received: September 19, 2017**