

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS



**USO EFECTIVO DE LA COMBINACIÓN PROBIÓTICO-GLICONUTRIENTE
COMO COADYUVANTE DE LA TERAPIA CON ANTIBIÓTICOS PARA LA
DIARREA EN LA CRÍA DE TERNEROS LECHEROS**

TESIS
COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS VETERINARIAS

PRESENTA
M.V.Z. Octavio Zapata Ramírez

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Alejandro Plascencia Jorquera

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

AGOSTO DE 2017

USO EFECTIVO DE LA COMBINACIÓN PROBIÓTICO-GLICONUTRIENTE COMO COADYUVANTE DE LA TERAPIA CON ANTIBIÓTICOS PARA LA DIARREA EN LA CRÍA DE TERNEROS LECHEROS Tesis presentada por **Octavio Zapata Ramírez**, como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias Veterinarias, que ha sido aprobada por el comité particular indicado:

Dr. Alejandro Plascencia Jorquera

Director de Tesis

Dr. Gilberto López Valencia

Co-director de tesis

Dr. Alberto Barreras Serrano

Asesor

Dra. María Alejandra López Soto

Asesor

CONTENIDO

	Página
Lista de cuadros	i
Lista de figuras	ii
Resumen	iii
Abstract	iv
Justificación	v
Hipótesis	vi
Objetivo	vii
Revisión de literatura	1
Situación actual de la producción de leche	1
Situación actual de la producción de leche en México	1
Crianza de terneros	2
Perfiles hemáticos en terneros	3
Morbilidad y mortalidad en la crianza de terneros	5
Aditivos alimenticios	6
Probióticos	7
Mecanismo de acción de los probióticos	9
Interacción de los probióticos con el sistema inmune del intestino	9
Uso de probióticos en la crianza de terneros	12
Gliconutrientes	14
Glicoformas	17
Glycozyme	18
Conclusiones	19
Literatura Citada	20
Experimento 1	24

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Pág.
1 Niveles promedio de urea, nitrógeno, glucosa, ácidos grasos no esterificados (NEFA's), triglicéridos, colesterol y cetonas totales en sangre de terneros Holstein a lo largo de las primeras cinco semanas de edad.	4
2 Tasas aceptables de mortalidad de becerras en diferentes periodos de la crianza	6
3 Microorganismos más utilizados en la alimentación de rumiantes.	8
4 Distintos probióticos y sus beneficios o efectos documentados	11
5 Experimentos realizados en terneros adicionados con probióticos.	13
6 Los 8 sacáridos esenciales.	15
7 Componentes de Glycozyme	18

LISTA DE FIGURAS

Figura		Pag
1	Cualidades que pueden modificar los aditivos alimenticios.	7
2	Mecanismo de acción de los probióticos.	10

RESUMEN

Treinta terneros Holstein que presentaron diarrea infecciosa durante la segunda semana después de su nacimiento fueron utilizados para evaluar los efectos de una fuente estandarizada que contenía una combinación de probióticos, β -glucanos y gliconutrientes (GLY) en apoyo de la terapia antibiótica durante la fase de crianza temprana (d 7 a D 45 después del nacimiento). Los tratamientos fueron 1) terapia con antibióticos (trimetoprim y sulfas, ANTIB), y 2) ANTIB más 5 g / ternero / d GLY. Los tratamientos no afectaron la duración de la diarrea, la cual tuvo un promedio de 16,7 días. Sin embargo, el suministro de GLY disminuyó ($P < 0,05$) la tasa de mortalidad, y aumentó ($P < 0,05$) la ganancia de peso. El incremento de peso se atribuyó a un mayor consumo ($P < 0,05$) concentrado iniciador para terneros. El suplementar a los terneros con GLY aumentó ($P < 0,05$) la glucosa sérica y disminuyó ($P < 0,05$) el nitrógeno ureico en suero sanguíneo, los ácidos grasos no esterificados y la concentración de cortisol. Concluimos que el suplementar diariamente 5 g de una fuente estandarizada que contenga probióticos, β -glucanos y gliconutrientes a terneros que presenten cuadros diarreicos bajo terapia antibiótica promoverá la salud y mejorará el desempeño temprano del crecimiento.

Palabras clave: aditivos alimenticios, diarrea, terneros lecheros, gliconutrientes, probióticos

ABSTRACT

Thirty Holstein calves presenting infectious diarrhea during the second week following birth were utilized to evaluate the effects of a standardized product containing a combination of probiotics, β -glucans and glyconutrients (GLY) in support of antibiotic therapy during the early rearing phase (d 7 to d 45 following birth). Treatments were 1) antibiotic therapy (trimethoprim and sulfas; ANTIB), and 2) ANTIB plus 5 g/calf/d GLY. Treatments did not affect diarrhea duration, averaging 16.7 days. However, GLY support decreased ($P < 0.05$) mortality rate, and increased ($P < 0.05$) live weight gain. Increased weight gain was attributable to enhanced ($P < 0.05$) consumption of calf starter. Supplemental GLY increased ($P < 0.05$) serum glucose and lowered ($P < 0.05$) serum urea nitrogen, non-esterified fatty acids, and cortisol concentration. We conclude that daily provision of 5 g of a standardized product containing probiotics, β -glucans and glyconutrients to diarrheic calves under antibiotic therapy will promote health and enhance early growth-performance.

Key words: feed additives, diarrhea, dairy calves, glyconutrients, probiotics

JUSTIFICACIÓN

Las preocupaciones financieras, la consolidación como industria y el mayor énfasis en la producción de leche han impulsado el crecimiento de las operaciones especializadas en la crianza de terneros lecheros (Wolf, 2003). Sin embargo la alta mortalidad en sus primeras semanas de vida se ha vuelto una preocupación importante, siendo el 70% de las muertes casos de diarrea infecciosa (Pijoan, 1997). Durante muchos años distintos programas se han basado únicamente en el uso de antibióticos como tratamiento ante dicho problema y la preocupación sobre el impacto potencial del uso de antibióticos se ha desarrollado interés en la búsqueda de alternativas naturales que promuevan el crecimiento y la salud (Ravindrán, 2010). Recientemente se ha demostrado que algunos probióticos tienen la habilidad de modular el balance y las actividades gastrointestinales (Uyeno, et al 2015). De igual manera, el uso de algunos sacáridos definidos como gliconutrientes en combinación con β -glucanos ha ganado popularidad como suplemento alimenticio en humanos y en algunas especies productivas de no rumiantes (Mondoa y Kitei, 2001) debido a distintos atributos tales como mejorador de la señalización celular, anti-inflamatorio y promotor general de la respuesta inmune (Mathews, et al 2003). Teóricamente el suplementar estos aditivos sería benéfico para terneros que presenten cuadros diarreicos. Sin embargo, no existe información disponible sobre los efectos de la suplementación con probióticos, gliconutrientes y β -glucanos a terneros diagnosticados con cuadros diarrea infecciosa.

HIPÓTESIS

El suplementar con una fuente estandarizada de probióticos, gliconutrientes y β -glucanos como coadyuvante en la terapia antibiótica de terneros diagnosticados con cuadros de diarrea tendrá efectos sobre la mortalidad, días en diarrea, peso corporal y perfiles hemáticos.

OBJETIVO

Evaluar los efectos sobre la mortalidad, días en diarrea, peso corporal y perfiles hemáticos en becerros diagnosticados con diarrea y suplementados con de una fuente estandarizada de probióticos, gliconutrientes y β -glucanos como coadyuvante de su terapia antibiótica.

Revisión de literatura

Situación actual de la producción de leche

Al finalizar el año 2015 la producción global total de leche fue de 818 millones de toneladas, 2% mayor en comparación al año 2014 alcanzando el consumo *per cápita* los 111.3 kg (IFDA, 2016) y de acuerdo a la OECD/FAO (2016) este número se incrementará un 12.5% en la próxima década. Los principales productores de leche en el mundo son: Unión Europea, India, Estados Unidos de Norte América, China, Pakistán, Rusia, Brasil, Nueva Zelanda, Turquía, Ucrania y México. En cuanto al tema de las exportaciones Estados Unidos de Norte América y la Unión Europea también encabezan la lista de países exportadores de leche descremada en polvo principalmente con un 30% y 32% respectivamente (OECD/FAO, 2016). En contraparte los principales importadores son China que acapara el 10.6% del total de la leche comercializada globalmente seguido de México con un 7.9% e Indonesia con 6.2% (SIAP/SAGARPA, 2016). Se espera que en un periodo no mayor a 5 años India se convierta en el país con la mayor producción a nivel mundial. Para el año 2026 la producción promedio por vaca en Estados Unidos, quien es el mayor referente en cuanto a producción intensiva se refiere incrementará 21% pasando de 10,326 a 12,512 kilos de leche por año por vaca. Según USDA (2017) pronostica que la población de ganado lechero aumentará un 2.15% y así mismo la producción de leche seguirá incrementándose de manera sostenida debido a la alta demanda mundial de productos derivados de la leche.

Situación actual de la producción de leche en México

La producción nacional de leche presenta una diversidad de condiciones, entre los principales factores que influyen este tema se tienen el grado de tecnificación de la explotación (intensivo, semi-intensivo o traspatio) el tipo de alimentación del ganado, el tipo de raza, entre otros, así como las condiciones climáticas y la disponibilidad de agua (Hernández et al., 2013). México cuenta con un total de 2, 457,683 cabezas de ganado destinadas a la producción de

leche, de las cuales el 46% se encuentra en los estados de Jalisco (334,651), Chihuahua (276,202), Durango (276,791) y Coahuila (242,610) donde predomina un sistema de explotación altamente intensivo. Dichas entidades son de igual manera los principales productores de leche solventando el 50% de la producción mexicana colocándose en el siguiente orden Jalisco (2,228,482), Coahuila (1,411,959), Durango (1,133,982) y Chihuahua (1,051,731). El total del país en el año 2016 fue de 11,267 millones de toneladas de leche aumentando 1.9% en comparación con el año anterior colocándolo en puesto número 12 a nivel mundial. Se espera que la producción para 2017 alcance los 11, 804 millones de toneladas, lo que significará un aumento del 1.7% respecto al año anterior. El total de importaciones lácteas fue de 292,803 toneladas, provenientes de Estados Unidos de Norte América el 90% de ellas , cifra que ha aumentado 104% en comparación del año 2006 cuando se ubicó en 143, 529 toneladas (SIAP/SAGARPA, 2016).

Crianza de terneros

La crianza de terneros dentro de los sistemas lecheros de explotación intensiva es una actividad altamente específica que comprende del día del nacimiento hasta los dos años de edad, donde se determina la producción lechera de su vida adulta, así como la renovación del hato y nos permite llevar a cabo el mejoramiento genético, lo que convierte en necesario que las lecherías implementen estrategias para mejorar la salud y el crecimiento de los terneros (Alugongo et al., 2017) ya que además dicha etapa representa el segundo mayor gasto económico dentro de los costos de producción del establo alcanzando cerca de un 20% del total ubicándose solo por debajo de la alimentación de las vacas en producción (Gabler et al., 2000). Desde el punto de vista económico productivo es recomendable que la vaquilla tenga su primer parto a una edad no mayor a los 24 meses de edad, para que esta inicie su ciclo productivo y así amortizar los gastos de su crianza que son aproximadamente de \$1,100 a \$1,300 dólares (Bailey y Currin, 1999).

Perfiles hemáticos en terneros

Las patologías presentadas en los terneros recién nacidos así como la mortalidad durante sus primeros 40 días de vida son una causa sumamente importante de pérdidas económicas dentro de la industria lechera. Debido lo cual, el conocer los valores o rangos hematológicos y bioquímicos específicos puede ser una herramienta útil para ayudar a interpretar con mayor exactitud las distintas enfermedades y formular un diagnóstico más acertado en los padecimientos de los aún lactantes (Mohri et al., 2007). Distintos autores han medido niveles en sangre de Glucosa, nitrógeno ureico en sangre, ácidos grasos no esterificados, colesterol, leucocitos, eritrocitos, cortisol entre otros (Quigley et al., 1991; Sasaki et al., 2002), ya que consideran sus valores deben ser registrados a lo largo de los primeros dos a tres meses de edad pues este lapso es crítico para la supervivencia de los mismos, además de que los valores normalmente registrados en rumiantes adultos son diferentes de los valores en terneros.

Mohri et al. (2007) expresa en sus resultados que los altos niveles de leucocitos y neutrófilos así como un bajo número de linfocitos al momento del nacimiento pueden estar relacionados con altos niveles de cortisol, esto se debe a que los niveles de cortisol en el feto incrementan durante los días previos al nacimiento elevándose aún más al momento del nacimiento y van disminuyendo en paulatinamente al paso de los primeros 20 días de vida.

Quigley et al. (1991) quienes compararon becerros destetados precozmente (26 días) y becerros con destete tardío (56 días), mencionan en su discusión que los valores de la biometría hemática pueden verse afectados por una amplia serie de factores tales como el alojamiento, los horarios de la toma de muestras así como la composición de las dietas y el consumo de materia seca.

Cuadro 1. Niveles promedio de urea, nitrógeno, glucosa, ácidos grasos no esterificados (NEFA's), triglicéridos, colesterol y cetonas totales en sangre de terneros Holstein a lo largo de las primeras cinco semanas de edad.

		Semana				
		1	2	3	4	5
Urea	nitrogen	13.2±0.3	12.6±0.2	8.8±0.2	11.6±0.2	9.9±0.3
(mg/dl)						
Glucosa	(mg/dl)	104.4±1.0	103.5±1.0	89.0±0.9	89.3±0.8	95.6±1.1
NEFA's	(μEq/l)	244±10	311±9	245±9	225±7	255±11
Triglicéridos		35.7±1.0	41.8±1.0	19.5±0.9	28.2±0.8	25.7±1.1
(mg/dl)						
Cholesterol	total	117±2	116±2	101±2	102±2	93±2
(mg/dl)						
Cetonas	totales	668.0±13.0	727.5±12.1	146.7±11.7	429.6±10.1	347.9±14.3
(μEq/l)						

Adaptado de Sasaki et al. 2002

Morbilidad y mortalidad en la crianza de terneros

Las altas tasas de morbilidad (animales que enferman) y mortalidad (animales enfermos que mueren) dentro de los establos puede afectar severamente la producción de terneros y con ello reducir significativamente el desarrollo de las lecherías. La ocurrencia de cualquier enfermedad además de causar un gasto debido a su tratamiento médico, afecta su vida productiva adulta (Wolf, 2003).

La principal causa de mortalidad en los terneros se presenta dentro de los primeros días de nacido el animal donde esta puede llegar a sobrepasar frecuentemente el 10% debido principalmente al síndrome diarreico neonatal (Oropeza et al., 1998, Berge et al., 2009, Hulbert y Moisés 2016) y alcanzar hasta un 70% en casos graves debido al mismo síndrome (Pijoan, 1997). Esta enfermedad es claramente detectable por sus signos como las heces blandas, fiebre, anorexia y deshidratación (Brewer et al., 2014) además se estima que del total de animales que presentan estos signos alrededor del 83% reciben algún tipo de terapia antibiótica por vía parenteral (Walker et al., 2012). El uso extensivo o prolongado de antibióticos puede perjudicar el balance de la flora intestinal e incrementar la susceptibilidad de los terneros a algunos microorganismos patógenos ya que su estado inmunológico se ve seriamente deprimido además de disminuir la capacidad de absorción de nutrientes (Fuller, 1989).

En los sistemas intensivos de crianza, los terneros son separados de las madres inmediatamente al nacer mucho antes de que su microbiota intestinal se haya colonizado. Esta situación incrementa la posibilidad de que los terneros se vean afectados de diarrea y por consecuente presenten problemas de pérdida de peso (Seo et al., 2010) Convirtiéndose la diarrea en la principal causa de morbilidad y mortalidad dentro de los aún lactantes, pudiendo además ser el detonante de enfermedades en el tracto respiratorio las cuales pueden llegar a tener un 9% de incidencia (Walker et al., 2012) debido a la

inmunosupresión provocada por la diarrea (Timmerman et al., 2005). El bienestar de los terneros lecheros puede mejorarse a través de estrategias de manejo que ayuden a mejorar su resistencia ante el estrés y la enfermedad (Hulbert y Moisés, 2016).

Cuadro 2: Tasas aceptables de mortalidad de becerras en diferentes periodos de la crianza

Periodo	Tasa de mortalidad
Nacimiento al destete	Menor al 5%
61 a 120 días	Menor al 2%
121 a 180 días	Menor al 1%
181 a 365 días	Menor al 1%
12 meses al parto	Menor al 0.5%

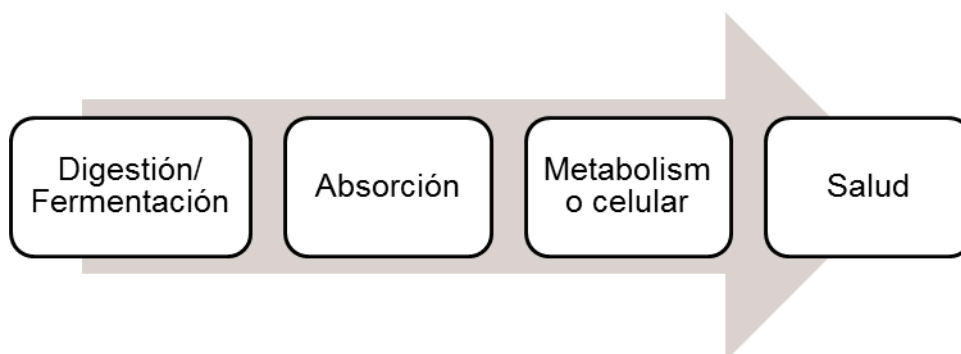
Adaptado de Espinoza-Martínez et al. 2014.

Aditivos alimenticios

Parte del aumento en productividad pecuaria se ha logrado a través de sustancias de origen vegetal o compuestos químicos conocidos comúnmente como aditivos alimenticios, los cuales alteran o modifican el ambiente ruminal, su actividad metabólica, ciertos grupos de bacterias (Pinos y González, 2000) e incluso pueden mejorar el estado inmunológico del animal (Hulbert y Moisés, 2016). En términos generales, un aditivo alimenticio se refiere a un producto incluido en la ración el cual tiene como propósito mejorar la eficiencia en los procesos de fermentación/absorción de diferentes nutrimentos, la mejor metabolización de los mismos para deposición de proteína una vez que ingresan al sistema (Plascencia, 2015), el bienestar o la salud del animal (Ravindran, 2010). Estos aditivos alimenticios se han usado en el ganado no solo por sus beneficios para el control y tratamiento de enfermedades infecciosas si no para incrementar o mejorar la eficiencia alimenticia (Nagaraja et al., 1987). Así mismo el entorno global donde cada día aumentan los

requisitos y las regulaciones para poder utilizar aditivos en la alimentación animal, nos orilla a un nuevo marco donde será necesario utilizar compuestos alternativos o naturales (Yirga, 2015) como las levaduras, probióticos, minerales quelados, extractos de vegetales entre otros (Plascencia, 2015).

Fig. 1. Cualidades que pueden modificar los aditivos alimenticios.



Probióticos

Son microorganismos vivos que tienen la habilidad de modular el balance y las actividades gastrointestinales, por ello son considerados benéficos para el organismo de los animales. Estos son definidos como aditivos alimenticios compuestos a base de microorganismos vivos, los cuales, no son considerados patógenos para la microbiota gastrointestinal y benefician creando un balance entre los en los microorganismos (Fuller, 1989) y recientemente se le han agregado términos referentes a la inmunomodulación ya que se considera también tienen un efecto sobre ella (Heyman y Menard, 2002). Dentro de otra publicación Castro et al. (2016) los definen como aditivos no digestibles pero fermentables, cuya función es modular el crecimiento y las actividades de poblaciones microbianas, quienes mejoran la salud y el funcionamiento del intestino.

Cuadro 3. Microorganismos más utilizados en la alimentación de rumiantes.

Género	Especie
Productoras de ácido láctico	
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i>
	<i>L. plantarum</i>
	<i>L. casei</i>
	<i>L. salivarius</i>
	<i>L. reuteri</i>
	<i>L. bulgaricus</i>
	<i>B. pseudolongum</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>B. thermophilum</i>
	<i>B. lactis</i>
	<i>S. bovis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. faecium</i>
	<i>E. faecium</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>
Utilizadoras de ácido láctico	
<i>Megasphaera</i>	<i>M. elsdenii</i>
<i>Propionibacterium</i>	<i>P. shermani</i>
	<i>P. freudenreichi</i>
	<i>P. acidipropionici</i>
Otras bacterias	
<i>Prevotella</i>	<i>P. bryantii</i>
<i>Bacillus</i>	<i>B. subtilis</i>
Levadura	
	<i>S. cerevisiae</i>
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. boulardi</i>

(Seo et al., 2010)

Mecanismo de acción de los probióticos

Los probióticos en términos generales tienen la capacidad de modular la respuesta inmune del intestino ya que compiten por diferentes sustratos y por adhesión a la pared intestinal ayudando a que este recobre rápidamente sus funciones gastrointestinales, mejore en caso de presentar diarrea, beneficiando su ganancia de peso y eficiencia alimenticia. Las bacterias ácido lácticas cuando se desarrollan en un ambiente anaerobio en presencia de glucosa y glicerol inhiben la unión de sustratos a las sub unidades de reductasa ribonucleotida interviniendo con la síntesis de DNA de microorganismos patógenos (Seo et al., 2010).

Interacción de los probióticos con el sistema inmune del intestino

Los mecanismos exactos de la interacción probiótico-intestino aún no es descrito en su totalidad ya que se cree solo se conoce un 90% de su contenido bacteriano. Saad et al. (2013) en su revisión expresa que los microorganismos se pueden unir primero a los receptores de reconocimiento que se encuentran en la superficie intestinal y desencadenar así la cascada de defensa inmunológica o pueden ser transportados por células localizadas en el epitelio folicular asociado a las células de Peyer, además la captación de antígenos y microorganismos también puede ocurrir a través de transporte vesicular transepitelial mediante enterocitos y células M (Marco et al., 2006).

Los probióticos también pueden mejorar las funciones inmunes incluyendo las actividades fagocíticas de los neutrófilos y la actividad citotóxica de las células Natural Killer (NK), además de estimular la producción de IgA's mediante las células B , la activación de linfocitos T y macrófagos, estimulando también la producción de citoquinas (Saad et al., 2013), esto debido a que promueven un equilibrio benéfico en el intestino.

Fig. 2. Mecanismo de acción de los probióticos.

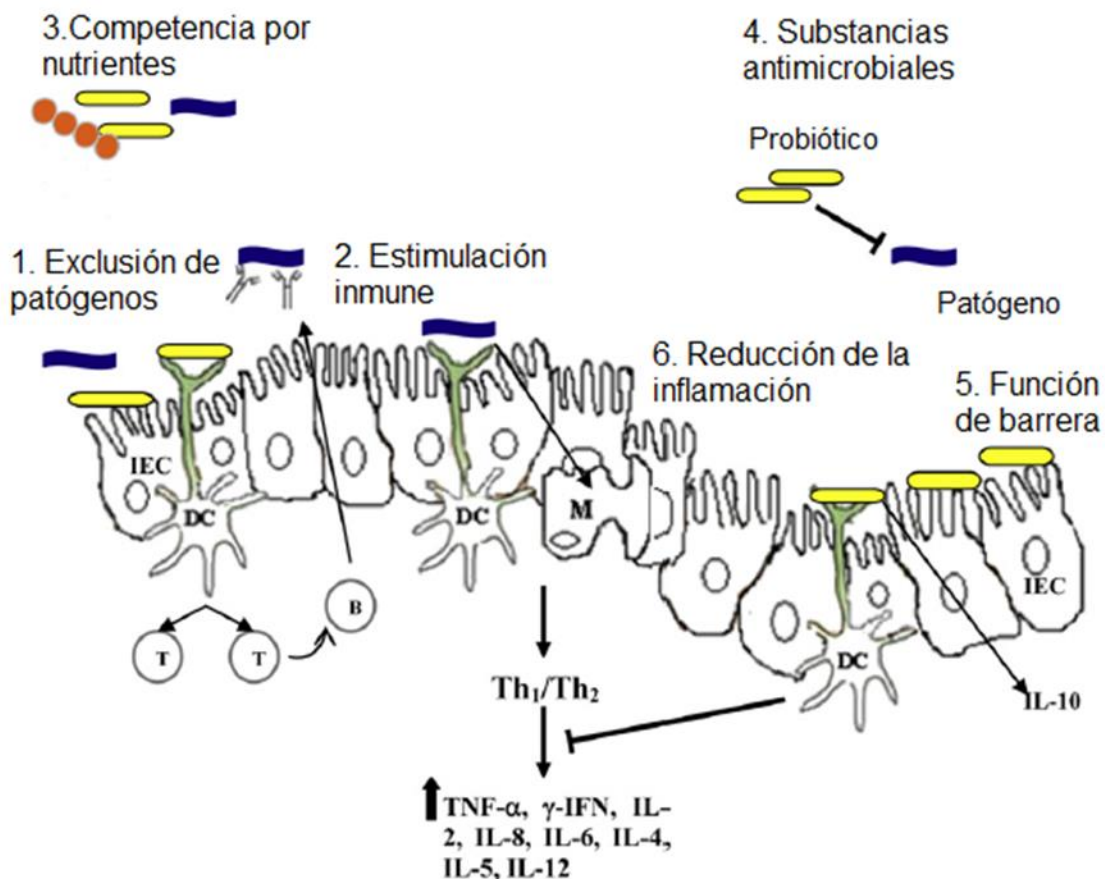


Fig. 1. Algunos mecanismos de probióticos mediante los cuales beneficia al huésped. Los efectos consisten en: 1) Exclusión y competencia contra patógenos, 2) Estimula la inmunidad innata, 3) Competencia por nutrientes, 4) Producción de la integridad intestinal y 6) Regulación de citoquinas anti-inflamatorias e inhibición de citoquinas pro-inflamatorias. IEC: Células epiteliales intestinales, DC: Células dendríticas, IL: Interleucina, M: Células intestinales M.

Saad et al., 2013

Cuadro 4. Distintos probióticos y sus beneficios o efectos documentados.

Especie de probiótico	Beneficio o efecto	Referencia
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Reducción de colesterol, disminuyó la diarrea, mejora en síndrome de intestino irritable	Niedzielin et al., 2001, Bukowska et al., 1998, Wullt et al., 2003.
<i>L. Casei Shirota (LcS)</i>	Regulación de IL-6 e INF	Matsumoto et al., 2003.
<i>L. Casei</i> DN114001	Modulación inmune	Tien et al., 2006.
<i>L.rhamnosus</i> GG	Tratamiento para diarrea asociado con rotavirus y antibióticos, tratamiento y prevención de alergias, modulación inmune, mejora en síndrome de intestino irritable	Basu et al., 2008, Zhang et al., 2005,
<i>L. acidophilus</i> La5		Gosselink et al., 2004, Kalliomäki et al., 2003, Kuisma et al., 2003, Sugita
<i>L. acidophilus</i> M92		y Togawa, 1994, Ohman et al., 2009,
<i>L. salivarius</i> UCC118		Kos, 2001, Mattila-Sandholm et al.,
<i>L. reuteri</i> DSM 122446		1999; Dunne et al., 2001, Shornikova
<i>L. reuteri</i> ATCC PTA 6475		et al., 1997, Lin et al., 2008, Rosenfeldt et al., 2002.
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Aumento de secreciones de IgA	Bakker-Zierikzee et al., 2006
<i>E. coli</i> Nissle 1917	Lapsos menores de síndrome de intestino irritable, tratamiento de alergias, exclusión de <i>E. coli</i> patogénica	Takahashi et al., 2006. Malchow, 1997, Sturm et al., 2005, Kruis et al., 2004; Sartor, 2005, Boudeau et al., 2003.
<i>Saccharomyces boulardi</i>	Lapsos menores de síndrome de intestino irritable, reducción de diarrea provocada por antibióticos y <i>Clostridium difficile</i>	Guslandi et al., 2000, Kotowska et al., 2005, McFarland et al., 1994

Adaptado de Saad et al., 2013

Uso de probióticos en la crianza de terneros

Recientemente los probióticos se han utilizado como medida profiláctica en becerros durante la etapa de crianza obteniendo resultados positivos reflejados en un mayor crecimiento, ganancia de peso y mejor estatus de salud (Oropeza et al., 1998; Timmerman et al., 2005; Alugongo et al., 2017), convirtiéndose su uso en una potencial alternativa para disminuir el uso de dosis sub-terapéuticas de antibióticos (Yirga, 2015), ya que en diversas investigaciones se ha demostrado que su uso tiene un efecto similar al usar antibióticos en los substitutos de leche para terneros (Morril et al., 1995, Kehoe y Carlson, 2015).

Sin embargo los probióticos deben cumplir diversos criterios para ser considerados como tal, deben ser inofensivos para el organismo, resistir a las sustancias biliares, adherirse a las células intestinales epiteliales, ser capaces de recorrer todo el tracto digestivo y modular la respuesta inmune (Heyman y Menard, 2002).

El principal beneficio del uso de estos aditivos es aumentar la resistencia del tracto gastrointestinal ante la colonización de bacterias patógenas y por lo tanto mejorar el estatus de salud en los animales (Choct, 2009) obteniendo como resultado de esta actividad mayor consumo de materia seca, aumento en la cantidad de energía metabólica por lo tanto mayores reservas de energía y conversión alimenticia, así como sustratos absorbibles y la proliferación de la población de microorganismos intestinales (De las Cagigas y Blanco, 2002; Uyeno et al., 2015).

Aunque hay algo de inconsistencia dentro de sus efectos en los artículos publicados, atribuido generalmente a sus distintos modos de empleo, dosificación y distinto contenido bacteriano etc. (Fuller, 1990). Además se cree que el suministro de probióticos es más efectivo cuando los terneros se encuentran en condiciones de estrés o bajo terapia antibiótica (Uyeno et al.,

2015; Yirga, 2015) y aún mayor cuando actúa en simbiosis con otros aditivos como prebióticos, oligosacáridos y distintos extractos de plantas. Su relativamente bajo costo de inclusión a las raciones en rumiantes ha incrementado ampliamente su uso (DiLorenzo, 2011).

Cuadro 5. Experimentos realizados en terneros adicionados con probióticos.

Especie	Dosis	Efecto	Referencia
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5x10 ufc/ml	Terneros que recibieron el probiótico mantuvieron el peso inicial mientras que los testigos perdieron peso hasta las dos semanas de edad	Cruywagen et al., 1996
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i>	3x10 ufc/ml	Ambas cepas mejoraron GDP, eficiencia alimenticia y redujeron la incidencia de diarrea.	Abe et al., 1995
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	No especificado	La incidencia de diarrea disminuyó después de la primer semana en terneros suplementados con <i>Lactobacillus spp.</i>	Abu-Tarboush et al., 1996
<i>Lactobacillus plantarum</i>	No especificado		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 27SC	1.85x10 ufc/ml		
<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Propionibacterium freudenreichii</i>	De 1x10 ufc/ml a 1x10 ufc/ml	Terneros suministrados con probióticos disminuyeron sus secreciones de <i>E. coli</i> .	Elam et al., 2003
<i>Propionibacterium jensenii</i> 702 (PJ702)	1.1x10 ufc/ml 1.2x10 ufc ml		Adams et al., 2008

<i>L. acidophilus</i>	1x10 ufc/kg	GDP y eficiencia alimenticia	Malik y Bandla, 2010
<i>Sacharomyces cerevisae</i>	3x10 ufc/kg	fueron mayores en terneros que recibieron probióticos adicionados con enzimas.	
<i>L. casei</i> DSPV 318T	3x10 ufc/kg/pv	Estimularon el consumo	Frizzo et al., 2010
<i>L. salivarius</i> DSPV		temprano de concentrado y	
<i>Pediococcus acidilacti</i>		el desarrollo del rumen.	

Adaptado de Seo et al. 2010

Gliconutrientes

Las células normales cumplen distintas funciones para mantener su salud. Deben poder aceptar su nutrición y eliminar residuos o toxinas, defenderse de intrusos como bacterias, hongos y virus además de reparar el daño que les causen; comunicarse entre sí y actuar en equipo para el funcionamiento óptimo de su sistema inmunitario. Los procesos celulares necesitan de vitaminas, minerales, ácidos grasos, aminoácidos y energía los cuales deben ser obtenidos de la dieta (Mathews et al., 2003). Anteriormente se creía que los sacáridos y/o azúcares solo servían como aporte de energía, sin embargo, recientemente se ha relacionado la contribución de 8 sacáridos específicos o esenciales con propiedades nutraceuticas que forman complejos con distintas clases de lípidos y proteínas formando glicoproteínas o glicolpidos (Sierpina y Murray, 2006) a las cuales se les atribuye mejoran funciones vitales tales como la comunicación celular, estos sacáridos se les conoce como gliconutrientes (Espinoza, 2004). Aún que el reciente descubrimiento de sus funciones así como la poca información existente y el nulo número de experimentos realizados que detalle y compruebe estadísticamente su eficacia, ha hecho de manifiesto que en algunas publicaciones se niegue su funcionamiento, tal como lo expresa Schnaar y Freeze (2008) donde afirman que no hay estudios donde justifiquen su eficacia además de que estos

sacáridos están siempre presentes en el organismo por lo tanto no es necesario suplementarlos

Cuadro 6. Los 8 sacáridos esenciales.

Azúcar	Tipo	Abreviatura
Galactosa	Hexosa	Gal
Glucosa	Hexosa	Glc
Manosa	Hexosa	Man
Ácido N- acetil - neuramínico	Ácido siálico	NeuAc
Fucosa	Desoxihexosa	Fuc
N- Acetilgalactosamina	Animohexosa	GalNac
N-Acetilglucosamina	Aminohexosa	GlcNac
Xilosa	Pentosa	Xil

Mathews et al., 2003.

Anteriormente estos sacáridos esenciales se daba por hecho que al proveer una alimentación balanceada se aseguraba el suficiente aporte de ellos al organismo, sin embargo la evolución en el procesamiento de los alimentos así como la deterioración de los suelos ha disminuido la calidad y cantidad de algunos de ellos en los alimentos. Además hasta hace algunos años se creía que siete de los ocho azúcares esenciales podían derivarse de varias reacciones enzimáticas de la glucosa, mas, recientemente han obtenido pruebas donde la glucosa no es suficiente para generar dichos azúcares. Debido a lo anterior el suplementarlos de manera directa en la dieta es una práctica que ha ganado popularidad en los humanos y algunas especies de no rumiantes buscando promover un estado de salud favorable y manejar o controlar ciertos padecimientos (Sierpina y Murray, 2006). Los gliconutrientes

tienen un rol importante previniendo algunas enfermedades e induciendo a recuperarse de algunas otras tales como: cáncer, desórdenes neurológicos y distintos padecimientos crónicos, así mismo se cree ayudan la comunicación de la información contenida dentro del ADN durante el proceso de la división celular (Espinoza, 2004). En algunos casos los gliconutrientes estimulan la respuesta inmunológica activando los mecanismos de defensa contra distintos patógenos. Estos sacáridos actúan formando bloques en combinación proteínas o lípidos formando glicoformas (Sierpina y Murray, 2006).

Mondoa y Kitei (2001) en su libro describen a grandes rasgos las principales funciones y beneficios de cada uno de estos sacáridos:

Xilosa: antifúngico y antibacterial, ayuda en la comunicación celular, prevención de cáncer en el tracto digestivo, favorece la no formación de caries, es tolerable para los diabéticos y disminuye la colitis.

Fucosa: mejora la memoria a largo plazo, modulador de la inmunidad, protege contra enfermedades respiratorias y reacciones alérgicas; su metabolismo es anormal en la enfermedad de fibrosis quística, cáncer, diabetes mellitus, y herpes. Su contenido es abundante en la leche materna y ciertos tipos de hongos.

Galactosa: inhibe el crecimiento de tumores, principalmente en el hígado, mejora la cicatrización, es antiinflamatorio, mejora la comunicación celular, protege contra la radiación, mejora la memoria a largo plazo. Sus niveles son bajos en enfermedades como artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil y lupus, su contenido es abundante en productos lácteos.

Glucosa: sacárido ubicuo, es la principal fuente de energía en el organismo, eleva los niveles de insulina y está ligada a la obesidad y diabetes, se han encontrado niveles bajos en pacientes diagnosticados con Alzheimer, alteraciones relacionadas con el metabolismo de la glucosa se han asociado con problemas de depresión, anorexia y bulimia.

Manosa: favorece la remodelación de tejidos y la comunicación celular, inhibe el crecimiento tumoral, posee propiedades antibióticas y antiinflamatorias, reduce los niveles de azúcar en sangre y triglicéridos en los pacientes diabéticos.

N-acetilgalactosamina: inhibe la propagación de tumores, mejora la comunicación celular, los pacientes con enfermedades del corazón presentan bajos niveles de dicho sacárido.

N-acetilglucosamina: modulador de inmunidad, posee propiedades antitumorales, está íntimamente ligada a la osteoartritis y es útil para reducir el dolor y la inflamación, es vital para el aprendizaje, esencial para la barrera de defensa de las mucosas, importante para la enfermedad inflamatoria intestinal y la cistitis intersticial.

Ácido N-acetilneuráminico: ayuda al desarrollo del cerebro y al aprendizaje, regulador de la inmunidad afectando la viscosidad de las mucosas, antiviral, afecta la coagulación de la sangre y los niveles de lípidos, su metabolismo se ve afectado en la enfermedad de Sjogren y en personas alcohólicas, sus niveles disminuyen con el aumento de la edad, es abundante en la leche materna.

Glicoformas

Este grupo de sacáridos se combinan con cadenas de proteínas y lípidos formando estructuras complejas llamadas glicoproteínas, glicolípidos o proteoglicanos denominando este grupo como glicoformas. El exterior de la célula se cubre con una capa de estas glicoformas, las cuales evitan que distintos agentes patógenos invadan la célula sana, sujetan dicho agente hostil hasta que una célula del sistema inmunitario la destruya. Las glicoformas ayudan a los procesos corporales, tales como: respuesta inmunitaria, regeneración de tejidos, crecimiento y estabilidad celular, etc. Una clase importante de moléculas incluidas en el glucoma son las glicoformas, complejos celulares que contienen cadenas de oligosacáridos (glucanos) unidos de modo

covalente esqueletos polipeptídicos. Se ha estimado que alrededor de 50% de las proteínas eucarióticas tiene azúcares fijos (Murray et al., 2006).

Glycozyme

Es una fuente estandarizada de probióticos (*Lactobacillus Plantarum*, *Bacillus subtilis* y *Saccharomyces Cerevisiae*) adicionada con gliconutrientes (los 8 sacáridos esenciales) y β -glucanos, cuya acción en sinergia puede ayudar al organismo a mejorar ciertos aspectos de su funcionamiento tales como comunicación y replicación celular, modulación de la inmunidad, regulación de la microbiota intestinal entre otros (Maxcell Global Co. LTD, 2015).

Cuadro 7. Composición de Glycozyme

Contenido	Cantidad
Gliconutrientes (sacáridos)	15%
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Min. 1×10^{10}
<i>Bacillus subtilis</i>	Min. 1×10^{10}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Min. 1×10^{10}
β -glucanos	<5%

Maxcell Global Co. LTD, 2015

CONCLUSIONES

Dadas las condiciones en que se realizó el experimento, la inclusión de una fuente estandarizada de probióticos adicionada con gliconutrientes y β -glucanos como coadyuvante en la terapia antibiótica de terneros Holstein que presentaron cuadros agudos de diarrea ayudó a disminuir la mortalidad e incrementar el peso vivo de los terneros lo cual puede estar asociado a que también incrementó el consumo de materia seca. Además modificó los niveles de glucosa, urea en sangre, ácidos grasos no esterificados y cortisol positivamente en los terneros. Finalmente podemos concluir que el adicionar Glycozyme como coadyuvante de la terapia antibiótica en terneros promueve la salud y mejora el crecimiento temprano de animales diagnosticados con diarrea infecciosa.

LITERATURA CITADA

- Alugongo G.M., J. X. Xiao, Y. H. Chung, S. Z. Dong, S. L. Li, I. Yoon, Z. H. Wu, y Z. J. Cao. 2017. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products on dairy calves: Performance and health. *J. Dairy Sci.* 100: 1-11
- Bailey, T. y J. Currin, 1999. Heifer inventory and the economics of replacement rearing, Virginia cooperative extension. Virginia Tech and Virginia State University, USA, Virginia. Publication No. 404-287.
- Berge A. C. B., D.A. Moore, T.E. Bessert y W.M. Sischo. 2009. Targeting therapy to minimize antimicrobial use in preweaned calves: Effects on health, growth, and treatment costs. *J. Dairy Sci.* 92 :4707–4714.
- Brewer, M.T., K.L. Anderson, I. Yoon, M.F. Scott y S.A. Carlson. 2014. Amelioration of salmonellosis in pre-weaned dairy calves fed *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products in feed and milk replacer. *Veterinary Microbiology*.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.05.026>
- Castro J.J., A. Gomez, B.A. White, H.J. Mangian, J.R. Loften y J.K. Drackley. 2016. Changes in the intestinal bacterial community, short-chain fatty acid profile, and intestinal development of preweaned Holstein calves. 1. Effects of prebiotic supplementation depend on site and age. *J. Dairy Sci.* 99:1–21.
- Choct M .2009. Managing gut health through nutrition. *British Poultry Science* 50, 9–15.
- De las Cagigas-Reig A.L. y J. Blanco-Anesto. 2002. Prebióticos y probióticos, un relación beneficiosa. *Revista Cubana Aliment Nutr* 2002;16(1):63-8

- Di Lorenzo N. 2011. Manipulation of the Rumen Microbial Environment to Improve Performance of Beef Cattle. North Florida Research and Education Center, University of Florida.
- Espinosa Martínez M., E. Estrada Cortés, R. Barretero Hernández, E. Rodríguez Hernández y M. Escobar Ramírez. 2014. Crianza de becerras para sistemas familiares/semitecnificados de producción de leche. 1, ISBN: 978-607-37-0293-5
- Espinoza Sabario M. 2004. Gliconutrientes (Azúcares que curan) Revisión bibliográfica. Revista médica de Costa Rica y Centroamérica. LXI 568: 123-126
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. A review. J. Appl. Bacteriol. Vol 66: 635.
- Fuller, R. 1990. Probiotics in agriculture. Ag. Biotech. News and information, 2: 217-220.
- Gabler M.T., P.R. Tozer, y J. Heinrichs. 2000. Development of a cost spreadsheet for calculating the cost to raise a replacement dairy heifer. J. Dairy Sci. 83: 1104-1109.
- Hernández Morales, Patricia, Estrada-Flores, Julieta Gertrudis, Avilés-Nova, Francisca, Yong-Angel, Gilberto, López-González, Felipe, Solís-Méndez, Alejandra Donají, y Castelán-Ortega, Octavio A. 2013. Tipificación de los sistemas campesinos de producción de leche del sur del estado de México. Universidad y ciencia, 29(1), 19-31. Recuperado en 25 de febrero de 2017, http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792013000100003&lng=es&tlng=es.
- Heyman, M. y S. Ménard. 2002. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. Cell. Mol. Life Sci. 59:001–15.

- Hulbert L. E. y S.J. Moisé. 2016. Stress, immunity, and the management of calves. *J. Dairy Sci.* 99:3199–3216.
- IFDA. 2016. The world dairy situation 2016. International Dairy Federation 485: p1-6
- Kehoe S.I. y D.B. Carlson. 2015. Influence of nonmedicated additives as alternatives to antibiotic on claf growth and healt. *The Professional Animal Scientist* 31:516–522.
- Marco, M. L., S. Pavan y M. Kleerebezem. 2006. Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17, 204:210.
- Mathews C., K. Van Holde y K. Ahern. 2003. *Bioquímica*. 3ra edición. Editorial Pearson Addison Wesley.
- Mohri M, K. Sharifi y S. Eide. 2007. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related change and comparison with blood composition in adults *Res Vet Sci.* 83: 30-39.
- Mondoa E. y M. Kitei. 2001. *Sugars that heal: The new healing science of glyconutrients*. Nueva York , NY. Ballantine. 208p.
- Morrill J.L., J.M. Morrill y A.M. Feyerherm. 1995. Plasma proteins and a probiotic as ingredients in milk replacer. *J Dairy Sci* 78:902-907
- Murray RK, P. Mayes ,V. Rodwell y D. Granner . *Biquímica ilustrada de Harper*. 27° ed. St. Louis, MO: McGraw-Hill, 2006.
- Nagaraja, T. G., Taylor, M. B., Harmon, D. L., y Boyer, J. E. 1987. In vitro lactic acid inhibition and alterations in volatile fatty acid production by antimicrobial feed additives. *Journal of Animal Science*, 65(4), 1064–1076.

- OECD/FAO. 2016. Dairy and Dairy Products, in OECD-FAO Agricultural Outlook 2016-2025, OECD. Publishing, Paris.
- Oropeza-Aguilar M.I., E. Posadas Manzano, J.M. Cervantes-Sánchez y O. Ortiz Naranjo. 1998. Revención de afecciones gastrointestinales mediante el uso de probióticos en becerros Holstein lactantes. *Vet. Méx.* 29 (2). 1-5.
- Pijoan P. 1997. Management factors associated with calf mortality in dairy farms of Tijuana, Baja California, Mexico. *Vet Méx* 28: 269-275
- Pinos, Rodríguez, J. M., y S. S. González Muñoz, 2000. Efectos biológicos y productivos de los ionóforos en rumiantes. *Interciencia*, 25, 379–385.
- Plascencia, A. 2015. Evaluation of feed additives on performance of ruminants fattening under conditions of high ambient temperatures (in Spanish). XXV Reunión Internacional sobre Producción de Carne y Leche en Climas Áridos. Ensenada Baja California, México. pp. 1-27.
- Quigley, J. D. III, L. A. Caldwell, G. D. Sinks y R. N. Heitmann. 1991. Changes in blood glucose, nonesterified fatty acids, and ketones in response to weaning and feed intake in young calves. *J. Dairy Sci.* 74:250-257.
- Ravindrán, V. 2010. Aditivos en alimentación animal: Presente y Futuro. XXVI Curso de Especialización FEDNA, 3–26.
- Saad N., C. Delattre, M. Urdaci, J.M. Schmitter y P. Bressollier. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *LWT—food science and technology*. Vol 50: 1-16.
- Sasaki O, N. Yamamoto, K. Togashi y M. Minezawa. 2002. Effects of age, environments and sex on plasma metabolite levels in young Holstein calves. *Asian-Aust J Anim Sci*; 15: 637-642
- Schnaar R.L., H.H. Freeze . 2008. A “glyconutrient sham”. *Glycobiology*. 18:652-657.

- Seo J.K., S.W. Kim, M.H. Kim, S. D. Upadhaya, D.K. Kam y J.K. Ha. 2010. Direct-fed microbials for ruminant animals. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 23, No. 12 : 1657 – 1667.
- SIAP/SAGARPA 2016. Panorama de la leche en México.
- Sierpina V.S. y R.K. Murray . 2006. Glyconutrients: The state of the science and the impact of glycomics. *Explore (NY)*. 2:488–494.
- Timmerman H.M., L. Mulder, H. Everts, D.C. Van Espen, E. Van Der Wal, G. Klaassen, S.G.M. Rouwers, R. Hatermink, F.M. Rombouts y A.C. Beynen. 2005. Health and growth of veal calves fed milk replacers with or without probiotics. *J. Dairy Sci.* 88:2154–2165
- USDA. 2017 Agricultural projections to 2026. World Agricultural Outlook Board
- Uyeno Y., S. Shigemori y T. Shimosato. 2015. Effects of prebiotics/prebiotics in cattle health and productivity: Mini-review. *Microbes Environ* 30:126-132.
- Walker W.L., W. B. Epperson, T. E. Wittum, L. K. Lord, P. J. Rajala-Schultz y J. Lakritz. 2012. Characteristics of dairy calf ranches: Morbidity, mortality, antibiotic uses practices, and biosecurity and biocontainment practices. *J. Dairy Sci.* 95 :2204–2214
- Windschitl P., K. Randall y D. Brainard. 1991. Growth performance of Holstein dairy calves supplemented with a probiotic. Research progress report, 22.
- Wolf, C. A. 2003. Custom dairy heifer grower industry characteristics and contract terms. *J. Dairy Sci.* 86:3016–3022.
- Yirga H. 2015. The use of probiotics in animal nutrition. *J. Prob. Healt.* 3:2.

Experimento 1

Running title: probiotics and glyconutrients in rearing dairy calves

Short Communication

Effective use of probiotic-glyconutrient combination as an adjuvant to antibiotic therapy for diarrhea in rearing dairy calves

Gilberto LÓPEZ-VALENCIA¹, Octavio ZAPATA-RAMÍREZ¹, Lilia NÚÑEZ-GONZÁLEZ¹, Víctor NÚÑEZ-BENÍTEZ¹, Heriberto LANDEROS- LÓPEZ¹, María LÓPEZ-SOTO¹, Alberto BARRERAS¹, Víctor GONZÁLEZ¹, Alfredo ESTRADA-ANGULO², Richard ZINN³, Alejandro PLASCENCIA¹

¹Institute of Veterinary Research, Autonomous University of Baja California, México

²Veterinary and Animal Science School, Autonomous University of Sinaloa, México

³Animal Science Department, University of California, Davis, USA

Artículo aceptado el 21 de abril 2017 en Turkish Journal of Veterinary and Animal Science

Abstract: Thirty Holstein calves presenting infectious diarrhea during the second week following birth were utilized to evaluate the effects of a standardized product containing a combination of probiotics, β -glucans and glyconutrients (GLY) in support of antibiotic therapy during the early rearing phase (d 7 to d 45 following birth). Treatments were 1) antibiotic therapy (trimethoprim and sulfas; ANTIB), and 2) ANTIB plus 5 g/calf/d GLY. Treatments did not affect diarrhea duration, averaging 16.7 days. However, GLY support decreased ($P < 0.05$) mortality rate, and increased ($P < 0.05$) live weight gain. Increased weight gain was attributable to enhanced ($P < 0.05$) consumption of calf starter. Supplemental GLY increased ($P < 0.05$) serum glucose and lowered ($P < 0.05$) serum urea nitrogen, non-esterified fatty acids, and cortisol concentration. We conclude that daily provision of 5 g of a standardized product containing probiotics, β -glucans and glyconutrients to diarrheic calves under antibiotic therapy will promote health and enhance early growth-performance.

Key words: feed additives, diarrhea, dairy calves, glyconutrients, probiotics

High mortality rate of Holstein calves during the rearing period is a major concern. Infectious diarrhea accounts for 70% of this mortality (1). Successful antibiotic interventions for calves with infectious diarrhea is strongly associated with the physiological and immunological capacity of the affected calf (2). Recently, probiotics are being used as a prophylactic management in rearing calves with positive results on growth and health status (3). Beneficial effects are attributed to facilitated maintenance of intestinal epithelial integrity (4). The use of glyconutrients in combination with β -glucans and probiotics (GLY) are popularized in dietary supplements for humans and for some non-ruminant species (5). Although not without controversy (6), the increased in

use of these substances is attributed enhanced cell signaling, promoting general immune responses, mediating inflammatory responses, and generalized reduction in cellular stress (5). To our knowledge, no information is currently available regarding effects of combining GLY with conventional antibiotic therapy protocols as a supportive treatment for young calves diagnosed with infectious diarrhea. Therefore, an experiment was performed to evaluate the effects (mortality, days on diarrhea, change in body weight and hematological profiles) of a standardized product containing probiotics, β -glucans and glyconutrients in support of antibiotic therapy for calves diagnosed with infectious diarrhea in a commercial setting.

The experiment was conducted at a commercial dairy located in the Mexicali valley, Baja California, 34 km south of the city of Mexicali in northwestern Mexico (32°40'7" N; 115°28'6" W, about 10 m above sea level, and under Sonoran desert conditions (*BWh* classification according to Köppen). All animal management procedures were conducted within the guidelines of locally approved techniques for animal use and care. The inclusion criteria for the calves used in the experiment were 1) total serum protein 72 h following birth was adequate (> 5.5 g /dL), and 2) calves presented symptoms of infectious diarrhea during the second week following birth. Of these, 30 Holstein calves were randomly assigned to two treatment groups (15 calves/treatment) consisting of either a conventional antibiotic therapy protocol (ANTIB) or ANTIB plus 5 grams/d of Glycozyme (Maxcell Global Co. LTD, Seoul, South Korea), consisting of a standardized mixture of glyconutrients, β -glucan, probiotics and enzymes (ANTIB + GLY). The daily dose of Glycozyme was weighed using a precision scale (Ohaus, AS612 mod, Pine Brook, NJ) and administered in

combined with milk replacer at the morning feeding. Following detection of diarrhea, ANTIB protocol consisted of 3 daily intramuscular applications of sulfa- trimethoprim (10 mg sulfas/kg + 2 mg trimethoprim/kg live weight; Sulfa-Jet, Laboratories Norvet, Torreón, México). If diarrhea did not subside within 72 hours of therapy, calves were administered enrofloxacin intramuscularly (2.5 mg / kg body weight/d; Floxi-Jet 5%, Laboratories Norvet, Torreón, México) until recovery. In addition to antibiotics, all calves were provided with oral electrolytes (1 L/d; Electrolex®Calves, Pisa Agropecuaria, México) along with an antispasmodic containing prifinium bromide (Prifinial, Vetoquinol de México, Mexico City). In case of death, calves were necropsied. In the survival calves feed intake and changes in body weight were registered from birth to day 45 of age. All calves included in the study underwent routine procedures of newborn calf management, including 4 L colostrum ingestion (2 L shortly after birth followed by 2 L 6 to 8 h following birth), and 4 L/d transition milk during the first 7 d. From d 8 through d 45, calves were fed twice daily a commercial milk replacer (4 L/d; Nodricina-200, Agriband Purina de México, Mexicali, BC), and allowed ad libitum access to a commercial calf starter (AMPLI-Calf starter 22, Purina Animal Nutrition, LLC, USA) and fresh water. The calf starter was formulated to meet or exceed the requirements for calves during the period of the study (7). Calves were housed in individual pens (100 cm wide, 150 cm long × 50 cm high) in an indoor facility, with individual waterers and feed bunks. Calves were daily monitored from 0600 to 1400 h. Diarrhea was identified through the quality of feces deposited in the floor or those attached to the perianal area of the calf. Only cases of diarrhea diagnosed by a staff veterinarian as infectious (appearance of blood and mucus in watery stool and rectal temperature over 38.5°C) were included in the study. At birth, all calves were

individually weighed (electronic scale, Salter Breknell, Fairmont, MIN). Approximately 72 h following birth, blood samples (10 mL) were obtained via the jugular (Venojet, Terumo Europe, Belgium). Once the clot retraction was present, the samples were centrifuged (Eppendorf, model 5804 R) for 10 min at $1300 \times g$ at 5 °C. Total protein concentration was assayed on freshly extracted serum using a refractometer (Mark Atago, model SPR-N). Remaining serum was stored at -20°C until subsequent determination of glucose, urea N (BUN), non-esterified fatty acids (NEFA) and cortisol concentrations. Upon completion of the study (d 45), surviving calves were individually weighed and blood sampled. Glucose was determined (spectrophotometric method; UV-2100, Shimadzu, Kyoto, Japan) using a diagnostic kit (Sigma-Aldrich, USA). Serum insulin (Cisbo Assays, USA) and cortisol (MP-Biomedicals, USA) concentration were determined via RIA. Readings for the cortisol samples were performed at 450 nm (MPR4, PerkinElmer Inc., Life Sciences, Germany). Serum non-esterified fatty acids were determined according to Abeni et al. (8). Individual feed delivery and feed refusals were measured daily. Dry matter was determined by oven drying [method 930.15 (9)]. The trial was analyzed as a completely randomized design using the MIXED procedure of SAS software (10). Treatment effects were considered significant when the value of $P \leq 0.05$, and were identified as trends when the value of $P > 0.05$ and ≤ 0.10 .

Treatment effects on mortality, and body weight change, and diarrhea duration of surviving calves are shown in Table 1. There was no treatment effect on duration of diarrhea in surviving calves, averaging 16.7 days. However, supporting antibiotic protocol with GLY reduced calf mortality (43%, $P < 0.05$), and increased (59%, $P < 0.05$) weight gain of surviving calves. The increased weight gain was associated with

enhanced starter consumption (44%, $P < 0.05$). Although health and productivity advantages have been demonstrated when probiotics are used as a prophylactic measure in rearing calves (3, 11), there is limited information of probiotics effects on growth performance and health parameters when calf health is compromised by infectious diarrhea. The advantages observed here for GLY supported calves may be due a positive effect GLY on cell stability (5).

Treatment effects on blood metabolites are shown in Table 2. Serum glucose, urea-N, NEFA, and cortisol concentration were not different among calves a 3 d of age (prior to presentation of clinical diarrhea). All serum metabolite values recorded at 3 d of age are within the normal range for healthy calves, as recorded in previous trials (12, 13, 14). Upon completion of the study (45 d of age), surviving calves that received ANTIB+GLY had serum glucose, urea-N, cortisol and NEFA concentrations within a normal range recorded for healthy calves 4 to 10 weeks of age (12,13,15). In contrast, surviving calves that received ANTIB, alone, had lower serum glucose (29%, $P < 0.05$), and greater NEFA (44%, $P < 0.05$) concentrations. Serum urea-N was also greater (29%, $P < 0.05$) in calves treated solely with ANTIB, although those values were not outside the normal range (13). High plasma levels of NEFA accompanied by a lowered glucose concentration reflect greater mobilization of body lipids mediated by a negative energy balance and/or sustained stress (16). The comparatively greater levels of urea-N for the ANTIB treatment could reflect decreased rate of anabolism. Surviving calves that received ANTIB+GLY also showed decreased (36%, $P < 0.05$) plasma cortisol concentration, resulting in concentrations approximating that recorded for unstressed calves (17). This decrease is consistent with differences in serum glucose and NEFA,

and growth-performance, reflecting a mediation of generalized stress. It is concluded the inclusion of GLY along with conventional antibiotic therapy promote health and enhance early growth-performance of calves diagnosed with infectious diarrhea.

Acknowledgements

The authors are grateful for the support received by the owner (Mr. José Luis Nevarez Borquez) and personnel of the commercial dairy farm “Establo Nevarez” during development of the experiment.

References

1. Pijoan P. Management factors associated with calf mortality in dairy farms of Tijuana, Baja California, Mexico. *Vet Méx* 1997; 28: 269-275.
2. Guyton A, Hall J. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia; PA, USA: Elsevier, Mosby Saunders; 2006.
3. Uyeno Y, Shigemori S, Shimosato T. Effects of prebiotics/prebiotics in cattle health and productivity: Mini-review. *Microbes Environ* 2015; 30:126-132.
4. Murray RK. Glycoproteins. In: Murray RK, Granner DK, Rodwell VW, editors. *Harpers Illustrated Biochemistry*. 27th ed. Columbus, OH, USA. McGraw-Hill; 2006, pp 523-544.
5. Schnaar RL, Freeze HH. A “glyconutrient sham”. *Glycobiology* 2008; 18:652-657.
6. National Research Council. Nutrient Requirements of Dairy Cattle, 7th edn. Washington, DC, USA: National Academy Press; 2001.
7. Abeni F, Bergoglio G, Masoero G, Tarzano GM, Allegrini S. Plasma hormones and metabolites in Piedmontese cows during late pregnancy: Relationships with calf birth weight. *J Anim Sci* 2004; 82:438-444.
8. AOAC. Official Methods of Analysis. 17th ed. Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists; 2000.
9. Statistical Analysis System. SAS/STAT: User’s Guide Statistic Released 9.1. Cary, NC, USA: SAS Institute Inc; 2004.
10. Morrill JL, Morrill JM, Feyerherm AM, Laster J.F. Plasma proteins and probiotic as ingredients in milk replacer. *J Dairy Sci* 1995; 78: 902-907.
11. Quigley III JD, Bernard JK, Tyberendt TL, Martin KR. Intake, growth, and selected blood parameters in calves fed starter via bucket or bottle. *J Dairy Sci* 1994; 77: 354-357.

12. Mohri M, Sharifi K, Eide S. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: Age related change and comparison with blood composition in adults Res Vet Sci 2007; 83: 30-39.
13. Piccione G, Casella S, Pennisi P, Giannetto C, Costa A, Caola G. Monitoring of physiological and blood parameters during perinatal and neonatal period in calves. Arq Bras Vet Zootec 2010; 62: 1-12.
14. Sasaki O, Yamamoto N, Togashi K, Minezawa M. Effects of age, environments and sex on plasma metabolite levels in young Holstein calves. Asian-Aust J Anim Sci 2002; 15: 637-642.
15. Sundrum A. Metabolic disorders in the transition period indicate that the dairy cows' ability to adapt is overstressed. Animal (Basel) 2015; 5:978-1020.
16. Schwartzkopf-Genswein KS, Booth-McLean ME, McAllister TA, Mears GJ. Physiological and behavioural changes in Holstein calves during and after dehorning or castration. Can Anim Sci 85; 131-138.

Table 1. Treatment effects on mortality and 45-d growth-performance and diarrhea duration of surviving calves.

	ANTIB ^a	ANTIB+GLY ^b	SEM	Significance
Calves				
Initial	15	15		
Surviving	8	11		
Mortality, %	46.7	26.7		<0.05
Live weight, kg				
Initial	38.89	39.28	1.51	NS
Final	42.85	45.58	1.90	NS
Weight gain, kg	3.96	6.30	0.563	<0.05
Calf starter intake (DM), kg	45.34	81.14	10.92	<0.05
Diarrhea duration, d	15.88	17.45	12.65	NS

^a The antibiotic therapy protocol consisted of a daily intramuscular application of sulfa-trimethoprim (10 mg sulfas/kg + 2 mg trimethoprim/kg live weight at the time of detecting the problem for up to 72 hours. If diarrhea did not subside within 72 hours of therapy, then continued with intramuscular application of enrofloxacin (2.5 mg / kg body weight/24 hours until recovery. Oral electrolytes and antispasmodic containing prifinium bromide were administered in all cases.

^b Protocol of antibiotic therapy reinforced with daily intake of 5 grams of a standardized compound of the combination of yeasts and sugars/calf/day. Oral electrolytes and antispasmodic containing prifinium bromide were administered in all cases.

Table 2. Effect of treatments on the profile of some serum parameters related to energy balance and stress in calves at day 3 of born and at day 45 of experiment^a

	ANTIB ^b	ANTIB+GLY ^c	SEM	Significance
Days on test	45	45		
Glucose, mg/dL				
Day-3	87.74	92.78	0.38	NS
Day-45	54.30	70.26	0.28	<0.05
Urea nitrogen, mg/dL				
Day-3	5.62	6.26	1.16	NS
Day-45	5.78	4.18	0.76	<0.05
Cortisol, µg/dL				
Day-3	1.79	2.06	0.25	NS
Day-45	1.48	0.95	0.15	<0.05
NEFA, mmol/L				
Day-3	0.534	0.510	0.06	NS
Day-45	0.267	0.149	0.02	<0.05

^a Serum profiles reported correspond to calves surviving through day 45.

^b The antibiotic therapy protocol consisted of a daily intramuscular application of sulfamethoxazole (10 mg sulfas/kg + 2 mg trimethoprim/kg live weight at the time of detecting the problem for up to 72 hours. If diarrhea did not subside within 72 hours of therapy, then continued with intramuscular application of enrofloxacin (2.5 mg / kg body weight/24 hours until recovery. Oral electrolytes and antispasmodic containing prifinium bromide were administered in all cases.

^c Protocol of antibiotic therapy reinforced with daily intake of 5 grams of a standardized compound of the combination of yeasts and sugars/calf/day. Oral electrolytes and antispasmodic containing prifinium bromide were administered in all cases.