

AFLATOXINA B₁, SELENIO Y *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EN LA RESPUESTA INMUNE DE POLLOS DE ENGORDE EN EL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Aflatoxin B₁, Selenium and *Saccharomyces cerevisiae* in the Immune Response of Broiler Chickens in Zulia State, Venezuela

Francisco Perozo Marín¹, Sergio Rivera¹, Geovany Fino¹, Yaneth Mavárez²

¹ Profesor Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia. ² Médico Veterinario Estudiante de Postgrado.
Apartado 15252, Maracaibo 4005-A, estado Zulia, Venezuela. E-mail: frankperozo1@latinmail.com

RESUMEN

Se evaluó la respuesta inmune de pollos (Hubard x Hubbard) con la inclusión en la dieta por 42 días de 70 µ/kg de Aflatoxina B₁ (AFB₁) además de la capacidad de 2,5 mg/kg de Selenio (SE) y el *Saccharomyces cerevisiae* 0,1% (SC) para prevenir la aflatoxicosis. Usando un diseño de experimento factorial con ocho tratamientos y cuatro replicas de 15 aves para cada uno (480 pollos). Los tratamientos fueron: T₁= dieta basal; T₂= AFB₁; T₃= SC; T₄ = AFB₁+ SC; T₅ = SE; T₆= AFB₁+ SE ;T₇= SC + SE; T₈ = AFB₁+ SC + SE. Las variables estudiadas fueron: Numero de glóbulos blancos (GB); Leucograma (LEU); Títulos de anticuerpos (Gumboro y Newcastle) (TA); Proteínas séricas (PS); Gammaglobulinas (Gamma); Relación albúmina /globulina (alb/glo); Índice peso Bursa/peso corporal (Pb/Pc); Porcentaje de linfocitos viables en Bursa (PLV); Grados de lesión de Bursa (GL). Se aplicó un análisis de la varianza (ANOVA). Se realizaron comparaciones de medias usando la prueba de Dunnet. La variable GL se analizó utilizando Kruskal Wallis todas del paquete estadístico SAS. Los resultados indicaron: la AFB₁ disminuyó GB, indujo linfocitosis y heteropenia, disminuyó PS, afectó Pb / Pc e incrementó GL. El selenio incrementó PS e indujo una mayor respuesta celular, además disminuyó GL en presencia de AFB₁. La levadura no previno las alteraciones en ninguna de las variables afectadas por la AFB₁. Estos resultados sugieren que la exposición constante a bajas dosis de AFB₁ afecta la respuesta inmune de los pollos de engorde y que la utilización del selenio a 2,5 mg/kg previene este efecto, no así el *Saccharomyces cerevisiae* a la dosis utilizada.

Palabras clave: Aflatoxina B₁, selenio, *Saccharomyces cerevisiae*, respuesta inmune, pollos de engorde.

ABSTRACT

This research aimed at evaluating a 42 day long exposure to Aflatoxin B₁ 70 µ/kg (AFB₁) on poultry immune responses and an application of 2.5 mg/kg of selenium (SEL) and 0.1% *Saccharomyces cerevisiae* (SC) as a dietary supplement to prevent aflatoxicosis. In a factorial experiment design with eight treatments of 15 chickens each and four repetitions (480 male Hubbard x Hubbard) was used. The treatments were: T₁= control (basal diet common for all the groups); T₂= AFB₁; T₃= SC; T₄ = AFB₁+ SC; T₅ = SEL; T₆= AFB₁+ SEL;T₇= SC + SEL; T₈ = AFB₁+ SC + SEL. The parameters evaluated were: number of leucocytes (WC); percentage distribution of leucocytes (LEU); antibody title for Gumboro and Newcastle (AT); Serum proteins (SP), Gammaglobulins (Gamma) Albumin/globulin index (alb/glo); Bursa/body Weight (B/BW); viable lymphocyte percentage in Fabricius Bursa (VLP); Bursal degree of Histopathological lesion (LD). Data were analyzed using Variance analysis using the SAS GLM procedure. Treatment means were analyzed by Dunnet's test, while the Kruskal Wallis test was used to analyze LD variable. Results indicated that AFB₁ decreased GB, induced an arise in lymphocytes and a hetherophylic depletion, decreased PS and B/BW, and increased the degree of lesion in Bursa. Thus, the immune response was impaired. Selenium in the presence of AFB₁ increased PS, improved cellular response and showed an important preventive effect in relation to Bursal damage. The yeast culture did not prevent alterations in any immunological variable affected by AFB₁. This data suggest that long time-low level exposure to AFB₁ affects immune response in broilers and that supplementation with 2.5 mg/kg of Selenium is a useful tool in preventing the problem. The *Saccharomyces cerevisiae* level used in this assay showed no profitable results.

Key words: Aflatoxin B₁, selenium, *Saccharomyces cerevisiae*, immune response, broiler chicks.

INTRODUCCIÓN

En el trópico las altas temperaturas y humedad inducen la proliferación de hongos productores de micotoxinas [52]. Las micotoxinas son una serie de metabolitos procedentes de los hongos, con efectos tóxicos sobre los animales y el hombre, siendo la Aflatoxina B₁ la más estudiada por su amplia distribución mundial y frecuencia de aparición [33]. Las Normas COVENIN [11] han establecido 20 µg/Kg como nivel máximo de tolerancia de Aflatoxina B₁, en la materia prima con la que se elabora el alimento concentrado para aves. Fernández y col. [17] reportaron la presencia de niveles subclínicos de micotoxinas en materias primas importadas, utilizadas para la elaboración del alimento balanceado para aves en Venezuela; a su vez Mazzanni y col. [36] reportaron la presencia de aflatoxinas en granos producidos y almacenados en el país.

El mecanismo de acción de la AFB₁ se fundamenta en la capacidad de los metabolitos activos de la misma (Aflatoxina 8,9-epóxido) de interactuar con el ADN, ARN y proteínas intracelulares en los hepatocitos de las aves [9, 25]. La AFB₁ es capaz de ingresar al núcleo del hepatocito, unirse al ADN, lo que determina una inhibición de la ARN Polimerasa y una disminución de la síntesis de ARN mensajero. La consecuencia directa es la reducción de la síntesis proteica [25, 26, 28, 43].

La aflatoxicosis en las aves se presenta bajo dos formas clínicas, que se conocen como aflatoxicosis aguda y crónica [61, 68]. La forma aguda es reconocida como una enfermedad hepatotóxica violenta, clínicamente caracterizada por depresión, anorexia, ictericia y hemorragia. Histológicamente evidencia necrosis peri-portal asociada con la proliferación e hiperplasia de los conductos biliares, degeneración vacuolar de hepatocitos y esteatosis hepática conocida como hígado graso [15, 44, 49, 68]. La aflatoxicosis crónica, resulta de la ingesta constante de bajos niveles de la toxina y trae como consecuencias: disminución en la ganancia de peso y consumo de alimento, incremento de la conversión alimenticia y compromiso de la respuesta inmunológica del ave [13, 59, 62].

La inmunosupresión inducida por la aflatoxicosis, afecta al ave en su capacidad de sintetizar anticuerpos, sustancias humorales como: citosina, interferón y proteínas del sistema complemento, afectando además el número y funcionalidad de los glóbulos blancos, disminuyendo la capacidad quimiotáctica y fagocítica de heterófilos, monocitos y macrófagos [2, 10, 33, 47, 48, 57]. Estas alteraciones disminuyen la capacidad de ofrecer resistencia a las enfermedades, comprometiendo la respuesta productiva del lote [49].

La utilización de selenio y levaduras para prevenir los daños causados por las toxinas, ameritan ser evaluadas en profundidad pues son costosas y es necesario adecuar su utilización en función a la relación costo-beneficio que provean [69]. El uso del selenio pre-contaminación evita la acción biológica de la AFB₁, inhibiendo los enlaces de la AFB₁ con el ADN, bloqueando así la inhibición de la síntesis proteica [32, 58, 66].

El *Saccharomyces cerevisiae* incrementa la biodisponibilidad de los nutrientes [42, 63]. El mecanismo de acción propuesto es la quelación de la toxina y su eliminación en el tracto gastrointestinal [12, 19]. Otro mecanismo de acción postulado es la acción de la levadura sobre las enzimas microsomales, acelerando la eliminación del tóxico [63]. En el presente ensayo el objetivo básico fue determinar las consecuencias de la exposición a 70 µg/Kg de AFB₁ y de la suplementación con 2,5 ppm de selenio y/o *Saccharomyces cerevisiae* al 0,1% en la respuesta inmune de pollos de engorde.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se realizó en el Centro Experimental de Producción Animal (CEPA) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, ubicado en el municipio La Cañada de Urdaneta del estado Zulia; la zona es clasificada como un bosque muy seco tropical [14] con una temperatura media de 30°C y una precipitación que oscila entre 125 y 500 mm/año. Se utilizó un galpón de 35 metros de largo por 6 metros de ancho, cerrado con malla anti-pájaro y cortinas de polietileno, dividido en dos filas de 16 cubículos de tres metros cuadrados (2 x 1,5 mts) cada uno.

Población y manejo

Se trabajó con 480 pollitos machos de la línea Hubbard-Hubbard de un día de edad. Las aves fueron vacunadas contra Gumboro y Marek (Herpes virus de pavo) y se les aplicó por aspersión la vacuna contra Newcastle (Cepa La Sota). Una vez en el galpón experimental el manejo individual de las aves se restringió al máximo y las vacunaciones se realizaron por vía oral en el agua de bebida administrándoseles una dosis de Newcastle cepa La Sota al día 7 y Gumboro a los 7 y 14 días.

Experimento

El experimento se condujo como un diseño factorial con un total de 8 combinaciones de tratamiento factorial. La validación del mismo se fundamenta en los grados de libertad previstos para estimar el error experimental (31 grados) [54]. Las unidades experimentales consideradas para el análisis fueron cada uno de 32 corrales habilitados, en los cuales se distribuyeron de manera aleatoria 15 aves para cada uno. Los tratamientos aplicados fueron: T₁= control; T₂= Aflatoxina (70 µg/Kg); T₃= *Saccharomyces cerevisiae* (0,1%); T₄ = Aflatoxina (70 µg/Kg) + *Saccharomyces cerevisiae* (0,1%); T₅ = selenio (2,5 mg/Kg.); T₆= Aflatoxina (70 µg/Kg) + selenio (2,5 mg/Kg.); T₇= *Saccharomyces cerevisiae* (0,1%) + selenio (2,5 mg/Kg.); T₈ Aflatoxina (70 µg/Kg) + *Saccharomyces cerevisiae* (0,1%) + selenio 2,5 mg/Kg.

Dietas experimentales

El alimento utilizado (2000 Kg) se analizó para determinar su contenido de aflatoxina a través del método de

columnas de inmunoafinidad (Aflatest[®]) según el protocolo descrito por la Asociación Oficial de Análisis Químico (AOAC) [1] sin encontrar niveles detectables. La mezcla de la AFB₁ con el alimento se realizó en cantidades suficientes para lograr la concentración deseada de 70 µg/Kg antes y después de la adición del selenio 2,5 mg/Kg y la levadura al 0,1%.

Al análisis bromatológico la dieta basal mostró: alimento pre-iniciador (primeras tres semanas): Energía metabolizable 3098 Kcal.; Materia seca: 88,63%; Proteína: 23,1%; Grasa: 8,3%; Fibra: 2,8%. Alimento terminado (últimas tres semanas): Energía metabolizable 3300 Kcal. Materia seca 88,67%; Proteína: 18,91%; Grasa 10,53%; Fibra: 2,8%; La concentración de selenio en la dieta basal se calculó en función a la premezcla utilizada en la elaboración del alimento, resultando 0,5 mg/Kg.

Respuesta inmune

Se determinó el número de glóbulos blancos y su distribución porcentual, los títulos de anticuerpos contra Gumboro y Newcastle alcanzados a los 42 días, las proteínas totales, el nivel de Gammaglobulinas y la relación albúmina/globulina. A su vez se evaluó el índice peso Bursa/peso corporal y se analizó histopatológicamente la Bursa por dos técnicas: evaluación microscópica y determinación del porcentaje de linfocitos viables.

Muestras

Previo al sacrificio, el día 42 fue pesada y separada una sub-muestra de 2 animales por corral, lo que permitió obtener 8 aves por tratamiento. Se tomaron muestras de sangre por punción cardiaca, con y sin anticoagulante. De las muestras sin anticoagulante se realizó la determinación de proteínas totales [50] y serología utilizando kits comerciales de Elisa (ProFlok Plus corp Maryland, USA) [60]. Para determinar el patrón proteico se usó la técnica electroforética en placas de Acetato de Celulosa (EPAC) inicialmente descrita por Kohm (1957) y citada por Pierson [50].

El recuento total de leucocitos se obtuvo con la fórmula: Glóbulos blancos contados + 10% x 200. El hemograma se realizó sobre la base de 100 células mediante frotis, teñidos con colorante Dip Quick Stain (Jorgensen Laboratory) [50].

Las aves se sacrificaron por dislocación cervical, se extrajo la Bursa de Fabricio, la cual se pesó y dividió en dos partes iguales conservándose en formalina bufferada al 10%. Para determinar la relación peso Bursa/peso corporal (B/PC) se dividió el peso de la Bursa entre el peso del ave y se multiplicó por 1000 [20]. La determinación de los linfocitos viables presentes en la Bursa de Fabricio (PLV), se realizó a través de la técnica de análisis de imágenes [41]. Las Bursas fueron evaluadas histopatológicamente. Los grados de lesión observados fueron trasladados a la escala ordinal según lo expuesto por Henry y col. [23].

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados empleando un análisis de la varianza para un diseño factorial a través del procedimiento

general lineal model (GLM) disponible en el paquete estadístico Statistical Analysis System (SAS) [64]. Las comparaciones de las medias de los tratamientos se realizaron a través de la prueba de Dunnett. El análisis de las lesiones de la bursa de Fabricio, se realizó con la prueba de Kruskal-Wallis disponible en el procedimiento Npar 1 way [46]. El grado de correlación entre las variables se midió a través de la prueba de Spearman. Todos los criterios relacionados con significancia fueron basados en una probabilidad de $P < 0,05$ excepto la variable recuento de glóbulos blancos para la cual se consideró una probabilidad de significación de $P < 0,07$.

RESULTADOS

El recuento de glóbulos rojos no fue afectado significativamente por ninguno de los tratamientos ni sus interacciones. Se observó una disminución del número de glóbulos blancos en los tratamientos con AFB₁. El menor promedio corresponde al T₂ ($4238 \pm 364/\text{mm}^3$) el cual difiere ($P < 0,07$) del control ($6125 \pm 320/\text{mm}^3$) (TABLA I).

El valor mínimo de heterófilos se observó en el grupo que consumió la dieta basal más la aflatoxina T₂ ($50,87\% \pm 4,54$) el cual es significativamente menor ($P < 0,05$) que el grupo control ($68,37\% \pm 4,61$). (TABLA II). En los tratamientos donde el selenio acompañó a la toxina, se incrementó el porcentaje heterófilos ($P < 0,006$). El valor más alto de linfocitos ($30,87\% \pm 4,25$) corresponde al grupo T₂ que consumió AFB₁ sin aditivo. Este valor es mayor y significativamente diferente ($P < 0,05$) a los grupos en que esta presente el selenio (T₆, T₇ y T₈). El Selenio demostró tener un efecto significativo ($P < 0,006$) disminuyendo la proporción de linfocitos en sangre. Para los eosinófilos, las variaciones fueron mínimas y no significativas. El promedio más bajo de monocitos corresponde al grupo control ($11,62\% \pm 1,65$) que difiere $P < 0,05$ del T₅ ($24,62\% \pm 2,84$) y el T₇ ($24,37\% \pm 4,07$) en los cuales está presente el selenio, el cual incrementó significativamente el número de monocitos en sangre ($P < 0,02$). Así pues la AFB₁ indujo linfocitosis + heteropenia y el selenio revirtió ese efecto (TABLA II).

El nivel de proteínas séricas (PS) ($3,25 \pm 0,19$ gr/dl) en el grupo T₂ (expuesto a la toxina) y el que consumió la dieta basal más levadura T₃ ($3,25 \pm 0,07$ gr/dl) son significativamente menores ($P < 0,05$) que el control ($3,98 \pm 0,27$ gr/dl). El efecto de la AFB₁ sobre la disminución de PS fue significativo ($P < 0,02$). (TABLA III). Ninguno de los factores ni sus interacciones afectó significativamente las gammaglobulinas, aun cuando se evidencia una tendencia a niveles séricos de gammaglobulinas mayores en los grupos expuestos a AFB₁. Los resultados de la relación albúmina/globulina muestran que el promedio ($0,87 \pm 0,17$) correspondiente al grupo T₂ es menor que el del grupo control ($1,11 \pm 0,07$) sin embargo, las diferencias no son estadísticamente significativas. La adición de *Saccharomyces cerevisiae* indujo una disminución de la relación albúmina/globulina en las aves que lo consumieron

TABLA I
RECUESTO DE GLÓBULOS ROJOS, GLÓBULOS BLANCOS EN POLLOS DE ENGORDE,
EXPUESTOS A AFB₁ Y SUPLEMENTADOS CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y SELENIO

Tratamiento	Variables	
	Glóbulos rojos (x10 ⁶ /ml)	Glóbulos blancos (x mm ³)
T1 control	2,66 ± 0,13	6125 ± 320
T2 AFB ₁	2,51 ± 0,15	4238 ± 364*
T3 Lev	2,78 ± 0,17	7163 ± 1464
T4 AFB ₁ + Lev	2,65 ± 0,11	6813 ± 1902
T5 Sel	2,57 ± 0,18	7819 ± 1011
T6 AFB ₁ +Sel	2,48 ± 0,14	5875 ± 806
T7 Lev+Sel	2,58 ± 0,14	6700 ± 1184
T8 AFB ₁ +Lev+Sel	2,88 ± 0,33	9950 ± 2374

Los valores en cada caso corresponden a la media de ocho aves. ± Error. Estándar. **AFB₁**= Aflatoxina B₁ (70 µg/Kg) **Lev**= 0,1% *Saccharomyces cerevisiae* **Sel** 2,5 mg/Kg (*) difiere dentro de la columna con una probabilidad de significancia P<0,07.

TABLA II
LEUCOGRAMA EN POLLOS DE ENGORDE EXPUESTOS A 70 PPB DE AFB₁ Y SUPLEMENTADOS
CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y SELENIO

Tratamiento	Variables			
	Heterófilos %	Linfocitos %	Monocitos %	Eosinófilos %
T1 control	68,37 ± 4,61	19,87 ± 4,18	11,62 1,65	0,25 ± 0,25
T2 AFB ₁	50,87 ± 4,54*	30,87 ± 4,25*	18,12 2,14	0,25 ± 0,25
T3 Lev	60,37 ± 4,14	23,75 ± 3,22	15,75 ± 2,52	0,25 ± 0,25
T4 AFB ₁ + Lev	60,37 ± 6,09	20,87 ± 4,39	18,37 ± 2,37	0,50 ± 0,38
T5 Sel	54,87 ± 3,67	20,87 ± 3,27	24,62 ± 2,84*	0,00 ± 0,00
T6 AFB ₁ +Sel	65,12 ± 3,06	18,12 ± 3,17*	16,75 ± 1,56	0,12 ± 0,13
T7 Lev+Sel	61,12 ± 4,19	14,37 ± 3,03*	24,37 ± 4,07*	0,12 ± 0,13
T8 AFB ₁ +Lev+Sel	69,25 ± 4,74	14,00 ± 1,77*	16,62 ± 3,93	0,25 ± 0,25

Los valores en cada caso corresponden a la media de ocho aves. ± Error. Estándar. **AFB₁**= Aflatoxina B₁ (70 µg/Kg) **Lev**= 0,1% *Saccharomyces cerevisiae* **Sel** 2,5 mg/Kg (*) difiere dentro de columna (P<0,05).

($P < 0,05$) (TABLA III). Ninguno de los otros factores, ni sus interacciones, incluso la presencia de la AFB₁ demostraron afectar la capacidad de respuesta humoral específica del ave (No se muestra la data).

La media ($0,40 \pm 0,29$) para la relación peso Bursa/peso corporal (B/PC) correspondiente al grupo T₂ (expuesto a la AFB₁) fue menor ($P < 0,05$) a la obtenida por el control ($0,72 \pm 0,17$) y el grupo T₈ ($0,73 \pm 0,26$) (TABLA IV). El porcentaje de linfocitos viables (PLV) no fue afectado significativamente, aun cuando se observó una tendencia a que los grupos expuestos a la AFB₁, excepto el grupo T₈ presenten PLV más bajos.

En la TABLA IV se reflejan los grados de lesión de la Bursa (GL), donde se observa que el GL del grupo T₂ ($3,25 \pm 0,31$) es significativamente mayor ($P < 0,05$) que el mostrado por el control (2 ± 00). En la Fig. 1 se muestran las lesiones causadas por la toxina sobre la bursa. El análisis factorial arroja una fuerte relación causa-efecto entre la presencia de aflatoxina y la aparición de lesiones en la Bursa ($P < 0,0008$). Todos los grupos en los cuales se incluyó aflatoxina presentaron un mayor grado de lesión que los grupos que no la consumieron. La presencia de selenio indujo una disminución del grado de lesión de la Bursa de Fabricio en las aves expuestas a la AFB₁ ($P < 0,03$). Se demostró un alto grado de correlación $P < 0,001$ entre los resultados de PLV y GL.

DISCUSIÓN

Las condiciones ambientales, de manejo y la genética del ave influyen y condicionan las variables utilizadas para clasificar la inmunocompetencia de las aves [65]. Por lo que es inadecuado extrapolar los datos provistos por la literatura, sin tener claro si se repiten bajo condiciones ambientales propias de Venezuela [14]. Ningún reporte que evalúe la respuesta inmune utilizando una concentración en la dieta de $70 \mu\text{g/Kg}$ durante 42 días está disponible en la literatura, esta concentración y tiempo de exposición constituye un escenario probable en las explotaciones comerciales de nuestro medio [17].

Los efectos de la exposición a la AFB₁ son dependientes tanto de la concentración en el alimento como del tiempo de exposición [57]. La concentración y tiempo de exposición utilizadas en el ensayo, no fueron capaces de alterar el número de glóbulos rojos en las aves. Esto concuerda con lo reportado por Santurio y col. [55] y Fernández y col. [16] quienes indicaron no conseguir variación en el recuento de glóbulos rojos como consecuencia de la exposición a concentraciones entre 600 y $2.500 \mu\text{g/Kg}$ de AFB₁. Contrariamente, diversos autores [6, 24, 39, 44, 70] observaron anemia en aves que consumieron alimento con concentraciones de AFB₁ entre 2.000 y $10.000 \mu\text{g/Kg}$. La concentración menor administrada en el presente ensayo pudiera explicar la diferencia observada con respecto a estos reportes.

TABLA III
PROTEÍNAS TOTALES, GAMMAGLOBULINAS Y RELACIÓN ALBÚMINA/GLOBULINA EN POLLOS DE ENGORDE EXPUESTOS A AFB₁ Y SUPLEMENTADOS CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y SELENIO

Tratamiento	Variables		
	Proteínas totales (g/dl ⁻¹)	γ Globulinas (g/dl ⁻¹)	Relación Alb./Glb.
T1 control	$3,98 \pm 0,27$	$0,73 \pm 0,05$	$1,11 \pm 0,07$
T2 AFB ₁	$3,25 \pm 0,19^*$	$0,91 \pm 0,13$	$0,87 \pm 0,17$
T3 Lev	$3,25 \pm 0,07^*$	$0,80 \pm 0,05$	$0,91 \pm 0,03$
T4 AFB ₁ + Lev	$3,50 \pm 0,14$	$0,93 \pm 0,07$	$0,86 \pm 0,08$
T5 Sel	$3,82 \pm 0,14$	$0,92 \pm 0,14$	$0,97 \pm 0,13$
T6 AFB ₁ +Sel	$3,48 \pm 0,08$	$1,15 \pm 0,09$	$0,94 \pm 0,10$
T7 Lev+Sel	$3,35 \pm 0,06$	$0,92 \pm 0,06$	$0,74 \pm 0,06$
T8 AFB ₁ +Lev+Sel	$3,53 \pm 0,16$	$1,01 \pm 0,19$	$0,83 \pm 0,12$

Los valores en cada caso corresponden a la media de ocho aves. \pm Error. Estándar. AFB₁= Aflatoxina B₁ ($70 \mu\text{g/Kg}$) Lev= $0,1\%$ *Saccharomyces cerevisiae* Sel $2,5 \text{ mg/Kg}$ Alb/glob= Nivel sérico de Albúminas dividido entre el nivel de Globulinas totales determinadas por electroforesis. g dl^{-1} = gramos por decilitro (*) difieren en la columna ($P < 0,05$)

TABLA IV
ÍNDICE DE RELACIÓN PESO AVE/ PESO BURSA. PORCENTAJE DE LINFOCITOS VIABLES E HISTOPATOLOGÍA DE LA BURSA DE FABRICIO EN POLLOS DE ENGORDE A LOS 42 DÍAS DE EDAD EXPUESTOS A AFB₁ Y SUPLEMENTADOS CON SACCHAROMYCES CEREVISIAE Y/O SELENIO

Tratamiento	Variables		
	Índice B /PC	PLV	Grados histopatología
T1 Control	0,72 ± 0,17	28,01 ± 1,86	2 ± 0
T2 AFB ₁	0,40 ± 0,29*	23,55 ± 3,56	3,25 ± 0,31*
T3 Lev	0,55 ± 0,05	29,62 ± 2,21	2,44 ± 0,22
T4 AFB ₁ + Lev	0,43 ± 0,03	25,83 ± 2,50	2,62 ± 0,18
T5 Sel	0,59 ± 0,08	28,38 ± 2,19	2,25 ± 0,16
T6 AFB ₁ +Sel	0,44 ± 0,02	25,53 ± 2,21	2,75 ± 0,26
T7 Lev+Sel	0,46 ± 0,02	26,20 ± 2,24	2,25 ± 0,25
T8 AFB ₁ +Lev+Sel	0,73 ± 0,26	32,02 ± 2,74	2,25 ± 0,16

Los valores en cada caso corresponden a la media de ocho aves. ± Error. Estándar. **AFB₁**= Aflatoxina B₁ (70 µg/Kg). **Lev**= 0,1% *Saccharomyces cerevisiae* **Sel** 2,5 mg/Kg (*) difiere dentro de columna (P<0.05). (1) Índice = Peso de la bursa de Fabricio/ Peso del ave x 1000. Saume y col. (2001) [56]. (2) PLV = Porcentaje de linfocitos viables; Valores porcentuales entre 30 y 35% = bursa sana. (3) Grados de lesión: El score de lesiones se rige por el siguiente baremo: Grado 0 = normal, Grado 1 = folículos aislados con necrosis leve, Grado 2 = depleción linfoide moderada o folículos aislados con depleción linfoide severa. Grado 3 = depleción linfoide severa en más del 50% de los folículos. Grado 4 = folículos con escasos linfocitos y con quistes, aumento del tejido conectivo, epitelio engrosado y con pliegues. Grado 5 = pérdida total de la estructura folicular y marcada fibroplasia.

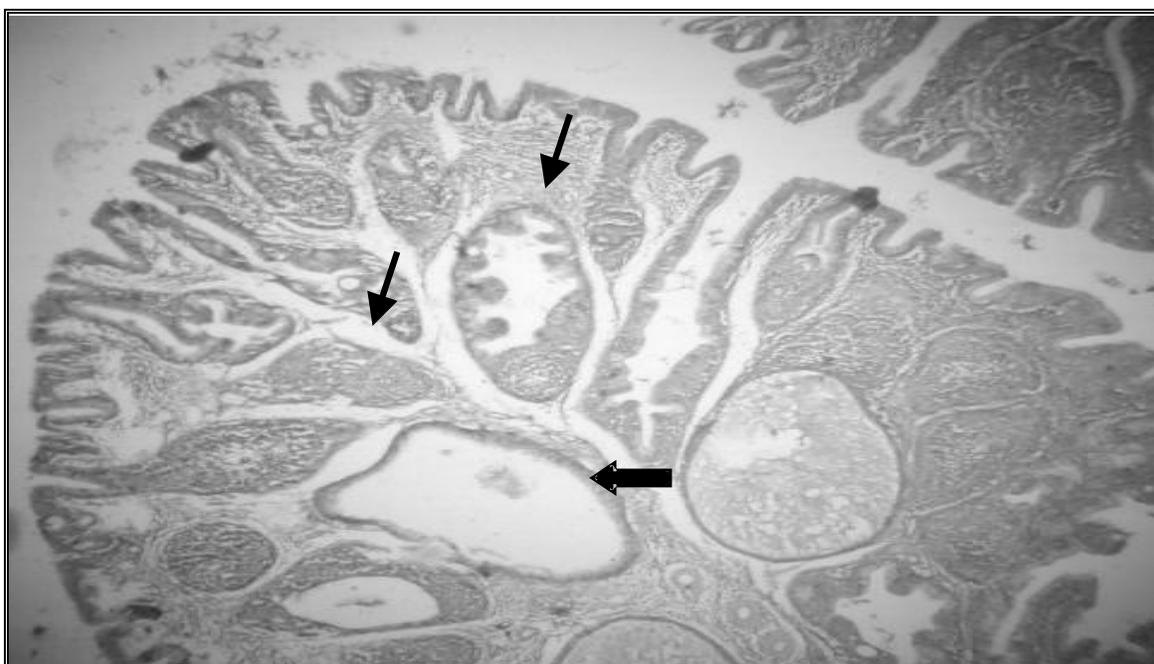


FIGURA 1. BOLSA DE FABRICIO GRADO 3. PERTENECIENTE AL TRATAMIENTO 2. SE OBSERVAN LOS FOLÍCULOS LINFOIDES CON LINFOPENIA Y PÉRDIDA DE LA ESTRUCTURA FOLICULAR (←), PRESENCIA DE QUISTES (↘). H-E. 65X.

En el presente ensayo la aflatoxina indujo una tendencia a la leucopenia. Este resultado concuerda con varios autores [21, 33, 47] quienes reportaron leucopenia y una consecuente disminución de la inmunidad celular en aves expuestas a distintas concentraciones de AFB₁. Contrariamente Fernández y col. [16] no consiguieron variación alguna en el recuento de glóbulos blancos, mientras Oguz [44] demostró un aumento significativo en la cuenta blanca, ambos como resultado de la administración por tres semanas a las aves de 2.500 µg/Kg de AFB₁. La leucopenia podría explicarse por la disminución en la producción de las sustancias estimuladoras de la leucopoyesis a consecuencia de la interferencia de la AFB₁ a nivel del ADN de los leucocitos [10, 30].

El leucograma obtenido difiere de lo reportado como normal por varios autores [4, 5, 6, 38] quienes observaron una proporción mayor de linfocitos que de heterófilos en sangre (TABLA I). Se observa un predominio de heterófilos sobre el resto de los grupos celulares en las aves. La AFB₁ suministrada a 70 µg/Kg indujo un incremento relativo de linfocitos, a expensas de una disminución marcada de los heterófilos. Al contrario de lo observado por Campbell y col. [6] quienes reportaron una linfocitopenia marcada. Sin embargo, los resultados de este experimento coinciden con otros expuestos por Carabaño [7] quien reportó un aumento en la proporción de linfocitos al someter a pollos de engorde a una concentración de 100 µg/Kg de AFB₁ por 4 semanas. Por su parte Oguz y col. [44] utilizando una concentración de 2.500 µg/Kg observaron una marcada heterofilia. La respuesta observada en los leucocitos a la exposición a bajas concentraciones de la toxina puede deberse a una movilización del pool circulante de heterófilos hacia los sitios de daño tisular [27, 31]. Mientras que a mayores concentraciones de la toxina se compromete la funcionalidad de los heterófilos, lo cual induce una respuesta compensatoria que incrementa su número [7, 27, 31].

El proceso inflamatorio causado por el daño tisular que genera la intoxicación, induce un incremento en el número de monocitos en sangre periférica (TABLA II). Esto concuerda con lo expuesto por Kaneko [27] y Latimer y col. [31] quienes reportaron un aumento en la participación de los monocitos en las intoxicaciones con AFB₁, pero difiere de lo reportado por Carabaño [7] cuyos resultados mostraron una disminución significativa de los monocitos. Las proporciones celulares del leucograma son afectadas de manera diferente por distintas concentraciones de la toxina en respuesta a factores medio-ambientales, de manejo y condiciones individuales del ave.

Uno de los efectos más notorios de la exposición de las aves a la AFB₁, fue una disminución de las proteínas séricas y una alteración del patrón de proteínas. Este resultado concuerda con lo expuesto por varios investigadores [8, 12, 39, 43, 49, 70] es importante señalar que estos autores utilizaron concentraciones muy superiores a las 70 µg/Kg. De los resultados se extrae que la exposición constante a concentraciones subclínicas de AFB₁ es capaz de afectar las proteínas séricas en las

aves. Contrariamente Carabaño [7] no consiguió efectos significativos sobre el nivel de proteínas séricas utilizando niveles de inclusión de AFB₁ en un rango entre 100 y 300 µg/Kg. Sin embargo advirtió una alteración del perfil proteico reportando cambios para el análisis de la proteína fraccionada.

Las gammaglobulinas mostraron una tendencia al incremento en los tratamientos en los cuales estuvo presente la AFB₁, lo que concuerda con lo indicado por Kaneko [27] quien explicó que ante un proceso inflamatorio como el que ocurre a nivel tisular, por causa de la exposición a dosis subclínicas de AFB₁, se presenta un leve incremento de las gammaglobulinas, probablemente esto sea la explicación a los resultados obtenidos en el presente ensayo.

La relación albúmina/globulina en el ave es un indicador de alta significancia clínica para evaluar la respuesta inflamatoria en caso de enfermedad [27]. En procesos inflamatorios, tanto agudos como crónicos, es común observar un incremento de las alfa, beta y gamma globulinas y un decrecimiento de la albúmina plasmática, máxime si el proceso inflamatorio compromete al hígado, que es el único lugar de síntesis de la albúmina [27, 65]. En la TABLA III se evidencia la tendencia a una disminución del índice albúmina/globulina en las aves expuestas a la AFB₁. Estos resultados probablemente encuentren explicación en una disminución en la síntesis de albúmina por parte del hígado, acompañada del incremento de las alfa 1 glicoproteínas, alfa 2 macroglobulinas y beta globulinas, todas presentes en procesos inflamatorios [5, 27]. No se encontraron en la literatura reportes sobre el status albúmina/globulina en aves expuestas a AFB₁.

Distintos investigadores [2, 3, 18, 35, 56, 72] consiguieron una disminución de los títulos de anticuerpos contra la enfermedad infecciosa de la Bursa y la enfermedad de Newcastle en aves expuestas a concentraciones de AFB₁ en un rango entre 100 y 2.500 µg/Kg. Contrariamente autores como: Sklan y col. [59] y Campbell y col. [6] no evidenciaron diferencias significativas entre los controles y animales intoxicados con concentraciones desde 200 hasta 2.500 µg/Kg de AFB₁, lo que concuerda con el presente ensayo donde se utilizó una concentración menor (70 µg/Kg) sin que se afectaran los títulos de anticuerpos. Igualmente Saume y col. [56] si bien reportaron disminución en los títulos de anticuerpos, sólo fue posible a partir de una concentración de 200 µg/Kg. La concentración de 70 g/Kg adicionada al alimento en este experimento, probablemente es insuficiente para inducir alteraciones en los títulos de anticuerpos.

La AFB₁ disminuyó el índice Bursa/peso corporal (B/PC) el cual es un indicador muy útil de inmunocompetencia en el ave, esto se atribuye a una disminución en el tamaño de la Bursa como consecuencia de la acción tóxica de la AFB₁ sobre el tejido bursal, lo que demuestra que aún a niveles tan bajos de inclusión en la dieta la inmunocompetencia del ave se ve comprometida. Este resultado es acorde con lo encontrado por varios autores [6, 20, 22, 45, 56]. Por su parte la determi-

nación del porcentaje de linfocitos viables en la Bursa (PLV) permite evaluar el daño ocasionado por la AFB₁ en el tejido de la Bursa y es una medida ajustada de la capacidad de respuesta inmune del ave [41]. En el presente ensayo se obtuvieron valores por debajo de 25% para las aves que consumieron el alimento contaminado con AFB₁ sin aditivos, lo que es bajo si se compara con el control que estuvo en promedio por encima del 28%. La utilización de la determinación del porcentaje de linfocitos viables, en la investigación de las consecuencias biológicas de la aflatoxicosis es novedosa y sin duda de gran utilidad. Se evidenció un alto grado de asociación entre los resultados del PLV y el grado de lesión inducido por la toxina sobre la estructura de la Bursa de Fabricio ($P < 0,001$) lo cual permite con gran rapidez y exactitud evaluar el status inmunológico del ave a través de tecnología emergente. Sin embargo, no se encontraron en la literatura referencias a la utilización de esta técnica, como indicador de inmunocompetencia en casos de intoxicación con AFB₁ o cualquier otra micotoxina, probablemente debido a lo reciente de su implementación.

La acción de la AFB₁ sobre el grado de alteración histopatológica, es el efecto más dramático observado en el presente ensayo, las aves pertenecientes al grupo T₂ (expuesto a AFB₁) mostraron un mayor grado de alteración histopatológica que el resto de los grupos. Esto concuerda con lo reportado por varios autores [6, 8, 15, 29, 45, 53, 59, 68, 71], quienes realizaron sus experimentos utilizando concentraciones de AFB₁ en un rango entre 400 y 5.000 µg/Kg y reseñaron alteraciones en la Bursa de Fabricio tales como: disminución en el número de células presentes en el centro del folículo de la Bursa (depleción linfoide) picnosis y cariorexis de las células linfoides, lesiones quísticas, aumento del tejido conectivo, epitelio engrosado e incluso pérdida total de la estructura folicular y marcada fibroplasia de la Bursa de Fabricio. En el presente ensayo las lesiones observadas en Bursa fueron: depleción linfoide severa en más del 50% de los folículos, epitelización de los folículos y cavidades quísticas en el estroma folicular. La aparición de lesiones a tan bajas concentraciones, probablemente es debido a que el tiempo de exposición (toda la vida productiva) generó un efecto aditivo que indujo los daños tisulares mencionados. Contrariamente, Micco y col. [37] realizaron un experimento alimentando pollos y gallinas con bajas concentraciones (50 µg/Kg) de AFB₁ y no encontraron lesiones en ningún órgano, pero el tiempo de exposición utilizado fue de sólo tres semanas.

De los dos aditivos utilizados en el ensayo, el selenio resultó ser más eficiente previniendo las consecuencias de la exposición a 70 µg/Kg de AFB₁ que el *Saccharomyces cerevisiae*. En el experimento, la suplementación con 2,5 mg/Kg de selenito de sodio previno el daño tisular de la Bursa inducido por la aflatoxina, esto concuerda con los efectos positivos del selenio sobre la inmunocompetencia y la capacidad de respuesta general de las aves expuestas a AFB₁ reportados por varios autores [22, 32, 35, 66, 67]. A su vez indujo un

incremento en los niveles de heterófilos y monocitos en las aves expuestas a AFB₁, lo que concuerda con lo reportado por Surai [66] quien observó un incremento en variables relacionadas con la respuesta inmune celular, como consecuencia de la suplementación con selenio. Los efectos positivos probablemente encuentren su explicación en que el selenio produce una inhibición del mecanismo de acción celular de la aflatoxina. El selenio es capaz de impedir la formación de los enlaces entre la forma activa de la AFB₁ (8,9-epóxido) y los residuos de guanina del ADN nuclear, impidiendo la inhibición de la síntesis proteica y el daño celular [34, 58]. A su vez el selenio es considerado como el mineral más importante en el mecanismo de detoxificación de AFB₁ catalizado por la glutatión-s-transferasa, debido a que es constituyente per se de la selenioproteína glutatión peroxidasa y además está relacionado con la regulación post-transcripcional de los genes de la glutatión peroxidasa [34,40, 58].

El *Saccharomyces cerevisiae* al 0,1% indujo una disminución en el nivel de proteínas séricas y en la relación albúmina-globulina, siendo incapaz de mejorar los indicadores inmunológicos evaluados en el ensayo. Esto difiere de lo expuesto por varios autores [12, 51, 63] quienes reportaron un marcado incremento en las proteínas séricas y el nivel de albúmina plasmática en respuesta a la suplementación con *Saccharomyces cerevisiae* al 0,1% en aves expuestas a 2,5 y 5 mg/Kg de AFB₁. La diferencia entre los resultados de este ensayo y lo reportado en la literatura puede deberse a que, a una concentración de 70 µg/Kg de aflatoxina, se alcanzó una saturación de la levadura a la concentración utilizada en el ensayo.

CONCLUSIONES

1. La Aflatoxina B₁ suministrada a una concentración de 70 µg/Kg por 42 días afectó el recuento de glóbulos blancos y la distribución del leucograma generando linfocitosis y heteropenia, disminuyó el nivel de proteínas séricas y la relación entre el peso de la Bursa y el peso corporal, además de incrementar el grado de alteración histopatológica de la Bursa de Fabricio en pollos de engorde. En consecuencia es capaz de comprometer la respuesta inmune del ave.
2. El selenio suministrado a una concentración de 2,5 mg/Kg demostró prevenir los efectos negativos de la aflatoxicosis mejorando la respuesta inmune a través del incremento de los heterófilos y monocitos, de aumentar el nivel de proteínas séricas y disminuir el grado de alteración histopatológica de la Bursa de Fabricio.
3. El *Saccharomyces cerevisiae* al 0,1% no previno las alteraciones en ninguna de las variables afectadas por la Aflatoxina B₁.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMIST (AOAC) **Official Methods of Analysis**. 991.31. Aflatoxin in Corn, Raw, Peanuts and Peanut butter. Inmunoaffinity Coulomb (Aflatest-Method) Ed. Mery Trucksess. Cap 49. Sub- capítulo 2. 22-23 pp. 2000.
- [2] AZZAM, A.; GABAL, M. Aflatoxin and Immunity in Layer Hens. **Avian Path.** 27:570-577. 1998.
- [3] AZZAM, A.; GABAL, M. Interaction of Aflatoxin in the Feed and Immunization Against Selected Infectious Diseases: Infectious Bursal Disease. **Avian Path.** 26:317-325. 1997.
- [4] BARTHOLOMEW, A.; LATSHAW, D.; SWAYNE, D. Changes in Blood Chemistry, Hematology and Histology caused by Selenium/ Vit E Deficiency and Recovery in Chick. **Biol. Trace. Elemen. Res.** 62:7-16. 1998.
- [5] BOUNUS, D; STEDMAN, N. Normal Avian Hematology: Chicken and Turkey In. **Schalm's Vet Hema.** 5th Edition Lippincot Williams & Wilkins. 1145-1156 pp. 2000.
- [6] CAMPBELL, M.; MAY, J.; HUFF, J.; DOERR, J. Evaluation of Immunity of Young Broiler Chickens During Simultaneous Aflatoxicosis and Ochratoxicosis. **Poult. Sci.** 62:2138-2144. 1983.
- [7] CARABAÑO, J. Efecto de Tres Niveles (100, 200 y 300 ppb) de Aflatoxina B₁ sobre los Pollos de Engorde Durante la Etapa de Iniciación (0 a 4 semanas). **FCV. UCV. (Trabajo de ascenso)** 183 pp. 1999.
- [8] CELIK, I.; OGUZ, H.; DEMET, O.; DONMEZ, H.; BOYDAK, M. Efficacy Of Polyvinylpyrrolidone in Reducing the Immunotoxicity of Aflatoxin in Growing Broilers. **British Poult. Sci.** 41:430-439. 2000.
- [9] CHIPLEY, J.; MABEE, M.; APPLGATE, K.; DREYFUSS, M. Further Characterization of Tissue Distribution and Metabolism of ¹⁴C Aflatoxin B₁ in Chickens. **Appl. Microbiol.** 28:1027-1029. 1974.
- [10] CORRIER, D. Mycotoxicosis: Mechanisms of Immunosuppression. **Vet. Immunol. Immunopath.** 30:73-87. 1991.
- [11] COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES (COVENIN). **Alimento completo para aves.** Norma 1881-83. 1983.
- [12] DEVEGOWDA, G.; ARAVINID, B.; MORTON, M. Immunosuppression in Poultry Caused by Aflatoxins and its Alleviation by *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc 1026) and Mannanligosaccharides (Mycosorb). In **Proc. Alltechs 13th Annual Symposium on Biotechnology in the feed Industry.** Ed T.P. Lyons and K.A. Jacques. Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK: 205-215 pp.1997.
- [13] DOERR, J.; HUFF, W.; WABECK, C.; CHALOUPAKA, G.; MAY, J.; MERKLEY, J. Effects of Low Level Chronic Aflatoxicosis in Broiler Chickens. **Poult. Sci.** 62:1971-1977. 1983.
- [14] EWEL, J.; MADRIZ, A.; TOSI, Y. **Zonas de Vida de Venezuela.** MAC- FONAIAP. Segunda Edición. Caracas. 266 pp. 1968.
- [15] ESPADA, Y.; DOMINGO, M.; GOMEZ, J.; CALVO, A. Pathological Lesions Following an Experimental Intoxication with Aflatoxin B₁ in Broiler Chickens. **Res. Vet. Sci.** 53 (3):275-279. 1992.
- [16] FERNÁNDEZ, A.; VERDE, M.; GÓMEZ, J.; GASCON, M.; RAMOS, J. Changes in the Prothrombin, Hematology and Serum Proteins during Experimental Aflatoxicosis in Hens and Broiler Chickens **British Poult. Sci.** 68 (1):119-122. 1995.
- [17] FERNÁNDEZ, G.; NEGRÓN, G.; ISEA, G.; SÁNCHEZ, E. Reporte de Análisis Cuantitativo de Aflatoxinas por el Método Elisa en Muestras de Materias Primas de Alimento Balanceado para Aves Provenientes de una Planta Ubicada en el Municipio Mara del Estado Zulia, Venezuela. **Revista Científica, FCV-LUZ.** X (1): 63-68. 2000.
- [18] GABAL, M.; AZZAM, A. Effect on One-Day Old Layer Chicks simultaneously Vaccinated Against Newcastle Disease, Infectious Bronchitis and Infectious Bursa Disease. **Avian Path.** 26:290-295. 1998.
- [19] GLADE, M.; FIST, M. Dietary Yeast Culture Supplementation Enhances Urea Recycling in the Equine Large Intestine. **Nutr. Rep. Int.** 37:11-17. 1988.
- [20] GIAMBRONE, J.; CLOSSER, J. Efficacy of live vaccines against serologic subtype of infections bursal diseases virus. **Avian Dis.** 34:7-11. 1990.
- [21] GHOSH, R.; CHAUHAN, H.; JHA, G. Suppression of Cell-mediated Immunity by Purified Aflatoxin B₁ in Broiler Chicks. **Vet. Immunol. Immunopath.** 28:165-172. 1991.
- [22] HEGAZY, M.; ADACHIT Y. Comparison of the Effects of Dietary Selenium, Zinc, and Selenium and Zinc Supplementation on Growth and Immune Response between Chick Groups that were Inoculated with Salmonella and Aflatoxin or Salmonella. **Poult. Sci.** 79:331-335. 2000.
- [23] HENRY, C.; BREWER, R.; EDGAR, S.; GRAY, B. Studies on Infectious Bursal Disease in Chickens. 2. Scoring Microscopic Lesions in the Bursa of Fabricius, Thymus, Spleen, and Kidney in Gnotobiotic and Battery Reared White Leghorns Experimentally Infected with Infectious Bursal Disease Virus. **Poult. Sci.** 59:1006-1007. 1980.
- [24] HUFF, W.; KUBENA, L.; HARVEY, B.; CORRIER, D.; MOLLENHAUER, H. Progression of Aflatoxicosis in Broiler Chickens. **Poult. Sci.** 65:1891-1899. 1986.

- [25] IWAKI, M.; KITAGAWA, T.; AKAMATSU, Y.; AIBARA, K. Cytotoxic Effects of Aflatoxin B₁ and its Association with Cellular Components in Chicken Embryo Primary Cultured Cells. **Biochim. Biophys. Acta.** 1035:146-153. 1990.
- [26] JONES, F.; HAGLER, W.; HAMILTON, P. Association of Low Levels of Aflatoxin in Feed with Productivity Losses in Commercial Broiler Operations. **Poult. Sci.** 61:861-868. 1982.
- [27] KANEKO, J. Serum Proteins and the Dysproteinemias. In: **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. Fifth Ed. Academic Press. San Diego. 117-138 pp. 1997.
- [28] KIESSLING, K. Biochemical Mechanism of Action of Mycotoxins. **Pure and Applied Chemistry** 58:327-338. 1986.
- [29] KIRAN, M.; DEMET, O.; ORTATATLI, M.; OGUZ, H. The Preventive Effect of Polyvinylpolypyrrolidone on Aflatoxicosis in Broilers. **Avian Path.** 27:250-255. 1998.
- [30] KLASING, K.; Avian Leucocytic Cytokines **Poult. Sci.** 73:1035-1043. 1994.
- [31] LATIMER, S.; TANG, K.; GOODWIN, M. Leukocytes changes associated with acute inflammation in chickens. **Avian Dis.** 32:760-762. 1988.
- [32] LEESON, R. Selenium. In **Poultry Nutrition**. Universities Book. Canada. 399-408 pp. 2001.
- [33] LEESON, R.; DIAZ, G.; SUMMERS, J. Aflatoxins. In **Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins**. Universities Book. Canada. 249-293 pp. 1995.
- [34] LEI, D.; WANG, L.; RUEBNER, B.; HSIEH, D.; WU, B.; ZHU, C.; DU, M. Effect of selenium on aflatoxin hepatocarcinogenesis in the rat. **Biomed. Environ. Sci.** 3:65-80. 1990.
- [35] MANI, K.; SUNDARESAN, K.; VISWANATHAN, K. Effect of Immunomodulators on the Performance of Broilers in Aflatoxicosis. **Indian Vet. J.** 78:1126-1129. 2001.
- [36] MAZZANI, C; BORGES, O; LUZÓN, O; BARRIENTO, V; QUIJADA, P. *Aspergillus flavus* y aflatoxinas en granos de cultivos de maíz blanco del estado Yaracuy (Venezuela). **Memorias del II Congreso Latinoamericano de Micotoxicología**. Maracay 14-16 Noviembre. 96-97 pp. 1997.
- [37] MICCO, C.; MIRAGLIA, L.; BENELLI, R.; ONORI, A.; IOPPOLO, A. Long Term Administration of Low Doses of Mycotoxins in Poultry. **Food Additives and contaminants.** 5 (3):309-314. 1988.
- [38] MITRUKA, B; RAWNSLEY, H. Hematology in chicks. In **Clinical Biochemical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals**. Ed. Masson Publishing USA, Inc. 73-76 pp. 1977.
- [39] MOHUDDIN, S.; REDDY, M.; REDDY, M.; RAMAKRISHNA, M. Studies on Phagocytes Activity and Hematological Changes in Aflatoxicosis in Poultry. **Indian Vet. J.** 63:442-445. 1986.
- [40] MOSS, E.; JUDAH, G.; PRZYBYLSKI, M.; NEAL, G. Mass spectral and NMR Analytical Studies of Glutathione Conjugate of Aflatoxin B₁. **Biochem. J.** 210: 227-233. 1983.
- [41] MUÑOZ, R. Utilización de Análisis de Imágenes Computarizadas para Medir Gumboro. Forth Dodge Animal Health. Overland Park USA. **Boletín Técnico.** 4 pp. 1998.
- [42] MUTHIAH, J.; REDDY, P.; CHANDRAN, N. Effects of Graded Levels of Aflatoxin B1 and the Effect of Direct Fed Microbial (DFM) on Egg Production in Egg Type Breeders. **Indian. Vet. J.** 75:231-233. 1998.
- [43] OBIOHA, W.; STAHR, H.; KRAFT, A. Distribution and Effects of Aflatoxins in Chicken Tissues after Feeding Radiolabelled (¹⁴C) Aflatoxin B₁. **J. Food Protec.** 49:799-805. 1986.
- [44] OGUZ, H.; RECECI, M.; REDDY, M.; RAMAKRISHNA, M. Effect of Cloptilolite on Serum Biochemical and Hematological Characters of broiler Chickens during Aflatoxicosis. **Res. Vet. Sci.** 69 (1):89-93. 2000.
- [45] ORTATATLI, M.; OGUZ, H. Ameliorative effects of dietary clinoptilolite on pathological changes in broiler chickens during aflatoxicosis. **Res. Vet. Sci.** 71:59-66. 2001.
- [46] OTT, R. An Introduction to Statistical Methods in Data Analysis 4ta. Ed Duxbury Press 562-564. pp 1992.
- [47] PIER, A.; McLOUGHLIN, M. Mycotoxic suppression of immunity. In **Trichothecenes and other Mycotoxins**. Ed. Wiley and Sons. Chichester 507-519. pp 1985.
- [48] PIER, A.; RICHARD, R.; CYSEWSKI, S. Implications of Mycotoxins in Animal Disease. **JAVMA.** 176:719-724. 1980.
- [49] PIER, A.; Major Biological Consequences of Aflatoxicosis in Animal Production. **J. Anim. Sci.** 70:3964-3967. 1992.
- [50] PIERSON, W. Laboratory techniques for avian hematology. In **Schalm's Veterinary Hematology**. Fifth edition. Ed. Lippincot, Williams & Wilkins. 1145- 1146 pp. 2000.
- [51] RAJU, M.; DEVEGOWDA, G. Influence of Esterified-Glucomannan on Performance and Organ Morphology, Serum Biochemistry and Hematology in Broilers Exposed to Individual and Combined Mycotoxicosis (Aflatoxin, Ochratoxin and T-2 Toxin). **British Poult. Sci.** 41:640-650. 2000.
- [52] RICHARD, J. *Aspergillus* In: **Disease of poultry** Ed. B.W. Calnek. Iowa State University Press, Ames.:326-334 pp. 1991.

- [53] SANDHU, B.; SINGH, H.; SINGH, B. Pathological Studies in Broiler Chicks Fed Aflatoxin or Ochratoxin and Inoculated with Inclusion Body Hepatitis Virus Singly and Concurrence. **Vet. Res. Commun.** 19 (1):27-37. 1995.
- [54] SAMPIERI, R. Muestreo. En: **Metodología de la Investigación**. Ed Mac Graw Hill 123-144 pp. 2000.
- [55] SANTURIO, J.; MALLMANN, C.; ROSA, P.; APPEL, A. Effect of Sodium Bentonite on the Performance and Blood Variables of Broiler Chickens Intoxicated with Aflatoxins. **British Poul. Sci.** 40:115-119. 1999.
- [56] SAUME, E.; REQUENA, F.; CORDONES, C.; OCHOA, J. Efecto sobre Parámetros Productivos e Inmunosupresores en Pollos de Engorde por la Ingestión de Diferentes Niveles de Aflatoxina B1 en la Ración Alimenticia. **V Congreso Nacional de Ciencias Veterinarias**. Maracay, 25 al 29 de Septiembre Venezuela. 96-99 pp. 2001.
- [57] SHARMA, P. Immunotoxicity of Mycotoxins. **J. Dairy Sci.** 76:892-897. 1993.
- [58] SHI, C.; CHUA, S.; LEE, H.; ONG, C.; Inhibition of Aflatoxin B1-DNA binding and adduct formation by Selenium in rats. **Cancer Letters.** 82:203-208. 1994.
- [59] SKLAN, D.; KLIPPER, E.; FRIEDMAN, A.; SHELLY, M.; MAKOVSKY, B. The Effect of Chronic Feeding of Diacetoxyscirpenol, T-2 Toxin, and Aflatoxin on Performance, Health, and Antibody Production in Chicks. **J. Appl. Poultry Res.** 10:79-85. 2001.
- [60] SNYDER, D; MARQUARTD, W; MALLISON E. An Enzyme linked Immunoabsorbent Assay. Simultaneous Measurements of Antibody Titers to Infectious Bronchitis, Newcastle disease in a Single Serum Dilution. **Avian Dis.** 28:12-24. 1984.
- [61] SMITH, J.; HAMILTON, P. Aflatoxicosis in the Broiler Chicken. **Poult. Sci.** 49:207-215. 1970.
- [62] SMITH, J.; ROSS, K. The toxigenic Aspergilli. In: **Mycotoxins and Animal Foods** Ed. Smith, J.E. & Henderson, R.S. Boca Raton, CRC Press. 101-118 pp. 1991.
- [63] STANLEY, V.; OJO, R.; WOLDENSENBET, S.; HUTCHISTON, D. The Use of *Sacharomyces cerevisiae* to Suppress the Effect of Aflatoxicosis in Broiler Chicks. **Poult. Sci.** 72:1867-1872. 1993.
- [64] STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM INSTITUTE (SAS) User Guide. **SAS**® Cary N. C. USA Version 2,02. 1986.
- [65] STURKIE, P. Body Fluids: Blood. In. **Sturkie's Avian Physiology**. Ed Springer-Verlag. New York. 102-120 pp. 1986.
- [66] SURAI, P. Effect of Selenium and Vitamin E Content of the Material Diet on the Antioxidant System of the Yolk and the Developing Chick. **British Poul. Sci.** 41: 235-243. 2000.
- [67] SWAIN, B. Effect of Supplementation of Selenium and Vitamin E and their Different Combinations on the Performance and Immune Response of Broilers. **British Poul. Sci.** 41:287-292. 2000.
- [68] THAXTON, J.; THUNG, P.; HAMILTON, P. Immunosupresión in Chickens by Aflatoxin. **Poult. Sci.** 53:721-725. 1974.
- [69] TRENHOLM, H.; CHARMLEY, L.; PRELUSKY, D. Mycotoxin Binding agents: An update on what we know. In: **Proc. Alltechs 13th Annual Symposium on Biotechnology in the feed Industry** Ed. T.P. Lyons and K.A. Jacques. Nottingham University Press, Loughborough, UK.: 327-340 pp. 1997.
- [70] TUNG, H.; WYATT, R.; THAXTON, P.; HAMILTON, P. Concentrations of Serum Proteins during Aflatoxicosis. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 34:320-326. 1975.
- [71] VENKATA, K.; GOPALAKRISHNA, D; RAMA, P. Sequential Gross and Histological Changes of Bursa and Thymus in Acute and Chronic Experimental Aflatoxicosis of Broilers Birds. **Ind. J. Anim. Sci.** 58:1011-1018. 1988.
- [72] VIRDI, J.; TIWANI, R.; SAXENA, M.; KHANNA, V.; SINGH, G.; SAINI, S.; VADHERA, S. Effects of Aflatoxin on the Immune System of the Chick. **J. Apply Toxicology.** 9:271-275. 1989.