

VALORES HEMATOLÓGICOS EN POLLOS DE ENGODE EXPUESTOS DE FORMA CONTINUA A BAJAS DOSIS DE AFLATOXINA B₁ EN EL ESTADO ZULIA, VENEZUELA

Haematological Values in Broiler Chicks during Long Time - Low Level Exposure to Aflatoxin B₁ in Zulia State, Venezuela

F., Perozo, J., Ferrer, M., Alvarado, H., Rincón, Y. Mavarez y M., Gil

Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia.

RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar el efecto de bajas concentraciones (70 $\mu\text{g/kg}$) de Aflatoxina B₁ purificada (AFB₁) sobre los valores hematológicos de pollos de engorde, la exposición a niveles subclínicos de AFB₁ es causa de bajo rendimiento en la industria avícola a consecuencia de sintomatología que va desde anemia hasta un comprometimiento de la respuesta inmune. Se utilizaron 480 pollos de la línea Hubbard x Hubbard de un día de edad y se dividieron en dos grupos de 240 animales: Control (T1) alimento comercial sin niveles detectables de AFB₁ y Tratamiento (T2) alimento contaminado con 70 $\mu\text{g/kg}$ de AFB₁. El día 42 se tomaron muestras de sangre a 32 aves de cada grupo para determinar: Proteínas Totales (PT) Hematocrito (Hcto), Hemoglobina (Hem), Recuento de Glóbulos Rojos (GR), Recuento de Glóbulos Blancos (GB) y Hemograma (DIF). La base de datos fue analizada para un diseño completamente aleatorizado a través de una análisis de la variancia y comparaciones de medias utilizando la opción GLM del SAS. Los valores para el T1 fueron: (PT) 3,18 \pm 0,42 g/dl; (Hcto) 28,9 \pm 2,48%; (Hem) 9,05 \pm 1,10 g/dl; (GR) 2,65 \pm 0,41 millones /mL; (GB) 6951,56 \pm 3435 glóbulos /mL, los cuales no difieren de los resultados del T2. Todas las aves del ensayo presentaron linfopenia, heterofilia y monocitosis, lo que es compatible con un hemograma de stress calorico. Se concluye que 70 $\mu\text{g/kg}$ AFB₁ durante seis semanas no es capaz de afectar significativamente la respuesta hematológica en pollos de engorde.

Palabras clave: Aflatoxina B₁, pollos de engorde, Valores hematológicos.

ABSTRACT

Sub-clinical aflatoxin exposure induces losses in the poultry industry due to an impairment in immune response and anaemia. In order to determine the haematological response of broilers over continuous low level exposure to Aflatoxin B₁ (AFB₁) a study was realized. An experiment utilized 480 one day old male hubbard x hubbard chicks. 240 chicks were assigned to each of two treatments that were established: Control (T1) non Aflatoxin detectable level commercial diet and the treatment group (T2) fed with a 70 ($\mu\text{g/kg}$) AFB₁ contaminated diet. At day 42 blood samples were taken from 32 chicks of each group to determine Total Protein (TP), Haematocrit (Hct), Haemoglobin (Hb), Red blood cells count (RBC), White blood cells count (WBC), Haemogram (DIF). Statistical analysis of data was carried out for a completely randomised design (CRD), using the SAS general lineal model procedure. Mean values for T1 were: (TP) 3.18 \pm 0.42 g/dl; (Hcto) 28.9 \pm 2.48%; (Hb) 9.05 \pm 1.10 g/dl; (RBC) 2.65 \pm 0.41 millions /mL; (WBC) 6951.56 \pm 3435 cells /mL. None of them presented significant differences with T2 results. Linfopenia with heterophylia and monocytosis was observed in all birds sampled. This behaviour is compatible with stress mediated response to high environmental temperatures. This study indicates that a six week long continuous exposure to 70 $\mu\text{g/kg}$ of aflatoxin B₁ had no significant effect on haematological response in broiler chicks.

Key words: Aflatoxin B₁, Broiler chicks, haematological values.

INTRODUCCIÓN

Las Aflatoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos, producidos por hongos del genero *Aspergillus sp*, fun-

damentalmente: *A. flavus* y *A. parasiticus*. La Aflatoxina B₁ (AFB₁) es muy importante debido a su amplia distribución y alta ocurrencia en países de clima tropical y subtropical donde las condiciones de temperatura y almacenamiento favorecen la aparición de la toxina en la materia prima utilizada para elaborar el alimento que consumen tanto los animales como el hombre [15, 33].

La aflatoxicosis ha sido reportada y descrita en pollos de engorde, así como sus consecuencias en la salud y capacidad productiva del ave; La toxina llega al ave a través del alimento y afecta negativamente tanto su salud como su rendimiento productivo [22, 27].

La utilización de concentrados como única fuente de alimentación, en los pollos criados intensivamente, se transforma en un importante factor de riesgo para la industria avícola. En ocasiones la diferencia entre el éxito o el fracaso económico de una explotación avícola es el adecuado manejo de la aflatoxicosis y sus consecuencias [13]. Esto se debe a que las aflatoxinas inducen una alteración generalizada en el ave que conlleva a pérdida de peso, depresión, alteración de la conversión alimenticia e inmunosupresión, esta última aumenta la susceptibilidad del ave a los desafíos con enfermedades virales y bacterianas [4, 6, 17, 22, 27, 28].

Las aflatoxinas transforman al ave en un riesgo potencial para la salud pública, debido al acumulo de la toxina en los órganos que son consumidos como alimento por el hombre [18]. El órgano blanco por excelencia de las aflatoxinas es el hígado en el que se presentan lesiones muy serias, caracterizadas por infiltración grasa, degeneración vacuolar y proliferación de los canalículos biliares [26]. Lo cual genera cambios en el metabolismo hepático, disminución en la síntesis de proteínas debido a la afinidad de la toxina a regiones específicas del ADN del núcleo del hepatocito, bloqueando así el proceso de transcripción requerido para la síntesis proteica [17,32]. En base a este mecanismo de acción las aflatoxinas determinan alteraciones en la constitución y química sanguínea de las aves [9].

Los valores hematológicos de pollos de engorde que consumen AFB₁ se ven afectados significativamente por la toxina lo que compromete el estado de salud y la capacidad de respuesta del ave [22]. Lanza y col [16] reportaron una disminución progresiva de los valores hematológicos en relación a incrementos en los niveles de exposición. Las aflatoxinas han demostrado afectar tanto la vía extrínseca, como la intrínseca de la coagulación, además de la integridad del endotelio lo cual produce hematomas en tejidos y pérdidas económicas por descarte [11]. Además de los efectos antes descritos la aflatoxina induce una supresión hemopoyética que afecta tanto a glóbulos blancos como rojos, lo que genera leucopenia y anemia, su gravedad dependerá de factores como la concentración y el tiempo de exposición [28].

Las alteraciones que se presentan durante el curso de una aflatoxicosis dependen de un conjunto de factores tales como: Tiempo de exposición y concentración de la toxina. [22,

28], interacción con otras micotoxinas [5,11], composición del alimento y valor nutricional [33], estado sanitario y nutricional del ave [17], factores genéticos [16]. La mayor parte de la información que se posee sobre la aflatoxicosis proviene de estudios circunscritos a las tres primeras semanas de vida, momento en el cual el ave es más susceptible [1], donde se utilizaron concentraciones superiores a 1.000 ($\mu\text{g}/\text{kg}$), [10, 21, 22, 29]. En la actualidad el reto al cual se enfrenta la industria avícola moderna es distinto, pues como consecuencia de la conciencia colectiva que se ha alcanzado sobre el tema y los controles que se aplican a las materias primas y el alimento, los casos agudos causados por altas concentraciones de AFB₁, son cada vez más esporádicos, por el contrario una aflatoxicosis crónica, inducida por el consumo de bajas concentraciones de la toxina por un largo tiempo, es la que afecta a las aves, [22, 28].

La norma COVENIN, [7] regula los niveles máximos de Aflatoxina B₁ en las materias primas y los alimentos concentrados en Venezuela e indica que valores superiores a 20 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) no deben suministrarse a los animales por el riesgo implícito de inducir aflatoxicosis subclínica. En la presente investigación se pretende probar el efecto de la administración de 70 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de AFB₁ purificada, durante seis semanas, sobre los siguientes valores hematológicos en pollos de engorde: Proteínas Totales (PT) Hematocrito (Hcto), Hemoglobina (Hem), Recuento de Glóbulos Rojos (GR), Recuento de Glóbulos Blancos (GB) y la Proporción de Linfocitos, Heterófilos, Monocitos, y Eosinófilos por cada cien células. (DIF).

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Ensayo

El experimento se llevó a cabo en el Centro Experimental de Producción Animal (CEPA) perteneciente a la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad del Zulia, ubicado en el Municipio La Cañada de Urdaneta del Estado Zulia; la zona con una densa población avícola es clasificada como un bosque muy seco tropical con una temperatura promedio de 30°C y una precipitación que oscila entre 125 y 500 mm / año [8].

Experimento

Se realizó en un galpón cubierto con una cama de concha de arroz de 35 metros de largo por 6 metros de ancho, cerrado con malla anti-pájaro y cortinas de polietileno, a fin de garantizar una temperatura interna adecuada para la recepción y primeros días de vida de las aves. Este galpón se dividió en dos filas de 16 cubículos de tres metros cuadrados (2 x 1.5 mts), para un total de 32 corrales considerados como las unidades experimentales del ensayo donde se asignaron aleatoriamente 15 aves por corral, separadas por un pasillo central de aproximadamente dos metros de ancho, los cuales contenían un comedero plástico tubular y un bebedero de galón para los primeros días que posteriormente fue sustituido por bebederos tipo Plasson.

Aves

Se utilizaron pollitos de un día de edad sexados macho, de raza Hubbard-Hubbard, obtenidos de una incubadora comercial de la zona. Una vez nacidas las aves fueron seleccionadas de manera aleatoria, contadas y vacunadas individualmente contra Gumboro y contra la enfermedad de Marek (Herpes virus de pavo), para ser colocadas en cajas donde se les aplicó por aspersión la vacuna contra Newcastle (Cepa La sota). Posteriormente se realizó el traslado hasta el lugar del experimento donde fueron pesados y distribuidos al azar, en el galpón experimental donde se les dio acceso *ad libitum* a las dietas (T1 y T2) y al agua.

Los pollitos BB al día uno se recibieron con apoyo de criadoras, agua y alimento. A través de las seis semanas de duración del ensayo, el manejo se limitó a un monitoreo constante del estado de salud, las mortalidades de la parvada y a proveer a los pollos del alimento correspondiente al tratamiento asignado dos veces por día. Se garantizó también el suministro y calidad del agua lavando diariamente los bebederos. Se usaron ventiladores y la manipulación de las cortinas como herramientas para aminorar los efectos de las variaciones climáticas características de la zona.

El manejo individual de las aves se evitó al máximo y las vacunaciones se realizaron por vía oral en el agua de bebida, siguiendo el plan de vacunación de la empresa proveedora de las aves, que consiste en una dosis de Newcastle cepa La Sota y Gumboro a los 7 y 14 días, lo que complementa la vacunación recibida en la incubadora.

Alimento

El alimento utilizado se produjo en una fábrica de alimento balanceado comercial, el análisis proximal resultó en 3250 Kcal de energía metabolizable y un 22% de proteínas, la determinación de aflatoxina se realizó mediante la utilización del equipo denominado Fluorómetro especialmente diseñado para análisis de micotoxinas con las columnas de inmunoafinidad VICAM, resultando no detectable para AFB₁. La mitad del alimento concentrado fue contaminado con AFB₁ purificada de Laboratorios Sigma (USA), en cantidad suficiente para obtener las concentraciones de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el alimento a consumirse en el ensayo, el nivel de AFB₁ fue monitoreado por el método antes mencionado a lo largo de las seis semanas del ensayo para garantizar que las aves consumiesen lo deseado.

Muestras

El día de sacrificio (día 42) se procedió a tomar una sub-muestra de 2 animales por unidad experimental (corral) con lo que se cubrió satisfactoriamente los grados de libertad requeridos para estimar el error. Obteniéndose 32 muestras por tratamiento. De estos animales se procedió a extraer por punción cardíaca muestras de sangre (con y sin anticoagulante), con la finalidad de obtener suero para la determinación de proteínas sericas y sangre completa para el resto de los análisis,

se utilizaron para tubos colectores estériles con y sin anticoagulante (Etilen-diamino-tetracetato de Potasio). [23]. Las muestras fueron conservadas en refrigeración (hielo) por aproximadamente 2 horas, hasta su procesamiento en el laboratorio de Diagnóstico Clínico de la Policlínica Veterinaria Universitaria. De la muestra sin anticoagulante una vez formado el coagulo se procedió a extraer el suero, el cual se refrigeró hasta su evaluación para determinar Proteínas totales (PT) con el uso de un refractómetro (TS meter) numero 10400, American Optical Buffalo según la técnica de Medway [23].

Para el Recuento de glóbulos rojos (CR) y de células blancas (CB), se utilizaron pipetas dilutoras de Thomas, el Hemocitómetro o cámara de Neubauer y líquido dilutor de Natt and Herricks, el cual tiñe los leucocitos para diferenciarlos de los glóbulos rojos nucleados de las aves [23]. El volumen del paquete celular o hematocrito (Hct), se determinó mediante el método del microhematocrito mientras que para la determinación de los valores de hemoglobina (HEM) se utilizó el método de la Cianometahemoglobina [23]. El recuento total de leucocitos se obtuvo con la fórmula: Glóbulos Blancos contados + 10% x 200. El hemograma o diferencial (DIF) se realizó sobre la base de 100 células mediante frotis delgados, teñidos con colorante Dip Quick Stain, (Jorgensen Laboratory) [23].

Análisis estadístico

La base de datos se estructuró en Excel. Se verificó el supuesto de igualdad de varianzas entre los grupos por medio de la prueba de Levene. El análisis estadístico se llevó a cabo para un diseño completamente aleatorizado a través de un análisis de la variancia y comparaciones de medias utilizando la opción General Lineal Model del sistema estadístico SAS. [30].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los efectos tóxicos de la exposición a AFB₁ son dependientes tanto de la concentración como del tiempo de exposición [28]. Aun cuando en el experimento se utilizó AFB₁ purificada durante todo el periodo productivo del ave (seis semanas), la concentración de 70 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) no fue capaz de inducir alteraciones que generen diferencias significativas en los valores hematológicos, de donde se extrae que niveles de inclusión tan bajos no afectan la salud del pollo de engorde probablemente debido a la resistencia propia de la especie [1].

En la TABLA I se observa una tendencia a favor del grupo control en el recuento de los glóbulos rojos (GR) aun que sin significancia estadística, este comportamiento de la variable se explica por el efecto negativo de la aflatoxina sobre la síntesis de las citocinas a nivel hepático, encargadas de la estimulación de la hemopoyesis [14]. Por su parte Mohuidin [19] reportó una disminución significativa en el número de glóbulos rojos en pollos de engorde como consecuencia de la intoxicación con 20 mg/kg por 12 semanas; La concentración utilizada equivale a un volumen total de AFB₁ consumida mucho mayor

al del presente experimento. Contrariamente Fernández y col. [9] reportaron no conseguir ninguna variación en el recuento de glóbulos rojos, ni en ningún otro valor hematológico en pollos de engorde de tres semanas expuestos desde el nacimiento a dosis de 2.500 y 5.000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ lo que concuerda con los resultados de este trabajo. Tanto el control como el grupo tratado se ubican dentro de los parámetros idóneos de glóbulos rojos para la especie [3].

El valor de hematocrito resultante no difiere significativamente entre los grupos y se encuentra circunscrito en los rangos expresados en la literatura que van entre un 22 y un 35%. [3]. Existe una gran variabilidad en cuanto a los reportes de valores hematológicos de las aves en general, el hematocrito, hemoglobina, el recuento de rojos y blancos en las aves fluctúan en torno a niveles característicos para cada individuo y en función al método utilizado para la estimación [31].

Urdaneta [34] reportó un hematocrito promedio de $30,46\% \pm 3,32$ en una población de pollos de engorde en el Estado Zulia y estableció que valores por debajo de 27% deben ser considerados como cuadros de anemia. Los resultados de esta investigación indican que las 64 aves muestreadas se ubicaron por encima de este umbral, por lo que no es posible reportar anemia como consecuencia de la aflatoxina, contrario a lo reportado por diversos autores que efectivamente enuncian un efecto negativo de la aflatoxina sobre el hematocrito de los pollos [4, 10, 19, 20]. Esta diferencia puede deberse a que en estos experimentos se trabajó con niveles y tiempo de exposición distintos a los de la presente investigación.

Los niveles de hemoglobina obtenidos no difieren entre sí y se enmarcan en el contexto de lo normal para la especie [3]. No obstante Huff, [10] reportó una disminución dependiente de la dosis administrada de la hemoglobina en grupos de aves que consumieron distintas concentraciones de AFB₁: 625, 1250, 2500 y 10000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, estos resultados difieren de los observados en este ensayo, probablemente debido a diferencias en la concentración y origen de la toxina, dado que este investigador utilizó el producto de la fermentación de arroz contaminado con *Aspergillus flavus* el cual contiene aflatoxinas B₁ B₂ G₁ y G₂ lo que difiere a la AFB₁ purificada utilizada en este ensayo.

Las proteínas totales son sin duda uno de los parámetros hematológicos más relacionados con la ocurrencia de la aflatoxicosis y permite monitorear el grado de exposición de una parvada a las micotoxinas. [17,22]. Esto se explica gracias al mecanismo de acción de la aflatoxina, la cual una vez transformada por la enzima citocromo p-450 a nivel del hepatocito, es capaz de interactuar con el ADN, el ARN y con proteínas intracelulares, inhibiendo la transcripción y síntesis proteica [12]. Las proteínas totales en el ensayo no se vieron afectadas por las concentraciones de AFB₁ utilizadas. Estos resultados difieren de lo reportado por Oguz [20] quien utilizó 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁ y monitoreó las proteínas totales las cuales se afectaron severamente probablemente debido a la alta concentración utilizada en ese ensayo.

TABLA I
VALORES HEMATOLÓGICOS EN POLLOS DE ENGORDE
A LOS 42 DÍAS DE EDAD EXPUESTOS O NO A AFB₁

	Sin aflatoxina (control) X ± ES	Con aflatoxina (70 mg/kg) X ± ES
Eritrocitos Millones por mL	2,65 ± 0,41	2,63 ± 0,57
Hemoglobina (g /dl)	9,05 ± 1,10	8,83 ± 0,99
Hematocrito (%)	28,90 ± 2,48	28,93 ± 2,06
Proteínas Totales (g/dl)	3,18 ± 0,42	3,37 ± 0,42
Glóbulos Blancos por MI	6951,56 ± 3435	6718,75 ± 4755

Cada valor corresponde a la media de 32 aves ± el error standard. No existe una diferencia significativa $P < 0,05$ para ninguna de las medias entre el grupo tratado y el control.

Raju y col [24] reportaron una disminución de las proteínas totales en animales expuestos a 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de aflatoxina, mas no en animales expuestos a una dosis similar de ochratoxinas lo cual apoya el hecho de que la disminución en los niveles séricos se debe a fallas en la síntesis hepática de proteínas, ya que el órgano blanco de la ochratoxina es el riñón. Sin embargo contrario a lo antes expuesto y en concordancia con esta investigación la exposición de pollos de engorde durante 42 días a 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁ no generó efecto alguno sobre las proteínas totales según lo reportado por Santurio y col. [25].

Unas de las consecuencias mayores de la aflatoxicosis tanto aguda como crónica es el efecto que tiene sobre la inmunocompetencia de los animales, los efectos sobre la respuesta inmune están bien documentados [6, 22, 27, 28]. Indican que las aflatoxinas son capaces de suprimir la formación de sustancias humorales como las citocinas, lo que afecta la genesis de todas las células de la línea mieloide, que se evidencia en el ave por una disminución en el numero de glóbulos blancos (leucopenia), además afecta el proceso de fagocitosis en macrófagos, heterofilos y plaquetas lo que limita la capacidad de defensa del individuo. [6, 27]. En el presente ensayo la inclusión de 70 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁ de manera continua en el alimento, generó una tendencia no significativa a la leucopenia en el grupo tratado. Los valores correspondientes tanto al T1 como el T2 son bajos si se compara con lo reportado por Bounus, [3] quien establece un rango normal de entre 7.000 y 17.500 G.B. x/mL.

En la aflatoxicosis la leucopenia se explica como la consecuencia de la disminución de los estímulos para la leucopoyesis [6,14]. Pese a lo cual Fernández y col [9] reportaron que 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁ no afectan el numero de glóbulos blancos en Broilers, lo que concuerda con lo obtenido en este estudio; No obstante Oguz [20] reportó un incremento en la cuenta blanca, como el resultado de la administración por tres semanas de 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de AFB₁, este incremento fue explicado como el resultado de la heterofilia propia de la respuesta inflamatoria aguda, generada por tan alta dosis de exposición a la toxina.

TABLA II
TIPOS DE CELULAS BLANCAS POR CADA 100
(DIFERENCIAL) EN POLLOS DE ENGORDE A LOS 42 DIAS
DE EDAD EXPUESTOS O NO A AFB₁

	Sin aflatoxina (control) X ± ES	Con aflatoxina (70 mg/kg) X ± ES
Heterofilos (%)	61,18 ± 12,21	61,40 ± 14,49
Linfocitos (%)	19,71 ± 9,90	20,96 ± 11,45
Monocitos (%)	19,09 ± 9,65	17,46 ± 7,16
Eosinofilos (%)	0,15 ± 0,51	0,2 ± 0,72

Cada valor corresponde a la media de 32 aves ± el error standard. No existe una diferencia significativa $P < 0,05$ para ninguna de las medias entre el grupo tratado y el control.

En el presente ensayo el hemograma no mostró diferencias significativas entre T1 y T2 (TABLA II), lo que indica que la administración continua de AFB₁ a una dosis de 70 ($\mu\text{g/kg}$), no induce efectos sobre las proporciones de células blancas en los pollos de engorde. A su vez difiere de los últimos reportes de hemograma normal de pollos de engorde, los cuales indican el predominio de los linfocitos en sangre circulante, seguido en orden por los heterofilos, monocitos, eosinofilos y basófilos [2, 3, 5].

Cuando la linfopenia va acompañada de heterofilia como en las aves del ensayo es en respuesta a la liberación de la hormona adenocorticotropica (ACTH), como consecuencia del stress térmico [5], ya que para el día 42, las aves habían alcanzado un peso superior a los dos kilogramos y se encontraban en un medio ambiente donde las temperaturas diurnas superan los 35°C promedio. En consecuencia el hemograma de stress que se obtuvo, probablemente es el resultado de la actividad de los mineralocorticoides liberados por las aves [3, 31].

CONCLUSIONES

Concentraciones de 70 $\mu\text{g/kg}$ de AFB₁ administradas por seis semanas no induce cambios $P \leq 0,05$ en el patrón de respuesta hematológica de los pollos de engorde.

En las aves del ensayo se presentó una linfopenia acompañada de heterofilia y monocitosis, lo que es compatible con un hemograma de stress, causado por las condiciones climáticas.

De los resultados de la presente investigación se deriva la necesidad de realizar otros ensayos donde se prueben distintos niveles de consumo de la toxina con la finalidad de establecer el nivel capaz de afectar negativamente los parámetros fisiológicos y de salud del ave en el trópico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] ARAFA, A.S.; BLOOMER, R.J.; WILSON, H.R.; SIMPSON, C.F.; HARMS, R.H. Susceptibility of various poul-

try species to dietary Aflatoxin. **British Poultry Science**. 22: 431-436.1981.

- [2] BARTHOLOMEW, A.; LATSHAW, D.; SWAYNE, D. Changes in blood Chemistry, Hematology and Histology caused by Selenium / vit E Deficiency and Recovery in Chicks. **Biol. Trace. Elemen. Res.** 62: 7-16 1998.
- [3] BOUNUS, D.; STEDMAN, N. Normal Avian Hematology: Chicken and Turkey In. **Schalm's Veterinary Hematology**. Fifth Edition Lippincot Williams & Wilkins p. 1145-1146. 2000.
- [4] CAMPBELL, M.; MAY, J.; HUFF, J.; DOERR, J. Evaluation of Immunity of Young Broiler Chickens During Simultaneous Aflatoxicosis and Ochratoxicosis. **Poultry Science**. 2138-2144. 1983.
- [5] CAMPBELL, T. Hematology: Principles and application In: **Avian Medicine** Unabridged edition. Ed. Wingers Publishing. Inc. pg 326-330. 1997.
- [6] CORRIER, D.E. Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. **Vet. Immunol. Immunopathol** 30: 73-87. 1991.
- [7] COVENIN. Alimento completo para aves. **Norma 1881-83**. 1983.
- [8] EWEL, J.; MADRIZ, A.; TOSI, Y. Zonas de Vida de Venezuela. **MAC- FONAIAP**. Segunda Edición. Caracas pg. 266. 1968.
- [9] FERNÁNDEZ A.; VERDE, M.; GOMEZ, J.; GASCON M.; RAMOS J. Changes In the Prothrombin, Haematology and Serum Proteins during Experimental Aflatoxicosis in Hens and Broiler Chickens. **British Poultry Science**. 68 (1) 119-122. 1995.
- [10] HUFF, W.; KUBENA, L.; HARLVEY, R.; CORRIER, D.; MOLLEN, H. Progression of Aflatoxicosis in broiler chicken. **Poultry Science**. 65: 1891-1899. 1986.
- [11] HUFF, W.; DOERR, J.; WABEIK, C. Individual and Combined Effects of Aflatoxin and Ocharatoxin on Bruising in Broiler Chicken **Poultry Science** 62: 1764-1771. 1983.
- [12] 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.
- [13] JONES, F.; HAGLER, W.; HAMILTON, P. Association of Low Levels of Aflatoxin in Feed With Productivity Losses in Commercial Broiler Operations. **Poultry Science**. 61: 861-868. 1982.
- [14] KLASING, K. Avian Leukocyte Cytokines. **Poultry Science** 73: 1035-1043. 1994.

- [15] KUBENA, L.F.; HARVER, R.B.; BAILEY, R.H.; BUCKLER, S.A.; ROTTINGHEUS, G.E. Effects of a Hydrated Sodium Calcium Aluminisilicate (T-Bind) on Mycotoxicosis in Young Broiler Chickens. **Poultry Science**. 77: 1502-1509. 1998.
- [16] LANZA, G.; WASLBURN, K.; WAYT, T. Strain Variation in haematological response of broiler to aflatoxin. **Poultry Science** 59: 2686-2691 1989.
- [17] LEESON, R.C.; DIAZ, G.; SUMMERS, J. **Aflatoxins**. in Poultry Metabolic Disorders and Mycotoxins. Universities Book. Canada. pp. 249-293. 1995.
- [18] MICCO, C.; MIRAGLIA, L.; BENELLI, R.; ONORI, A.; IOPPOLO, A. Long Term Administration of Low Doses of Mycotoxins in Poultry. 2. Residues of Ochratoxin A and Aflatoxins in Broilers and Laying Hens after Combined Administration of Ochratoxin A and Aflatoxin B1. **Food Additives and contaminants**. Vol 5, No. 3, 309-314. 1988.
- [19] MOHUIDDIN, S.; REDDY, M.; RAMAKRISHNA, M. Studies on Phagocytic Activity and Hematological Changes in Aflatoxicosis in Poultry. **Indian Vet. J.** 63: 442-445. 1986.
- [20] OGUZ, H.; RECECI, T.; BIRDANE, Y.; ONDER, F.; KURTOGW V. Effect of Clinoptilolite on serum Biochemical and Haematological and histological characters of Broiler chickens during Aflatoxicosis **Res. Vet. Sci.** 69(1): 89-93 (2000).
- [21] PATTERSON, D. Metabolism as a Factor in Determining the Toxic Action of the Aflatoxins in Different Animal Species. **Fd. Cosmet. Toxicol.** 11: 287-294. 1973.
- [22] PIER, A.C.; Major Biological Consequences of Aflatoxicosis In Animal Production. **J. Anim. Sci.** 70: 3964-3967. 1992.
- [23] PIERSON, W. Laboratory techniques for avian Hematology. In. **Schalm's Veterinary Hematology**. Fifth Edition Lippincot Williams & Wilkins p. 1145-1146.2000.
- [24] RAJU, M.; DAVEGOWDA, G. Influence of Esterified-Glucomannan on Performance and Organ Morphology, Serum Biochemistry and Haematology In Broilers Exposed To Individual and Combined Mycotoxicosis (Aflatoxin, Ochratoxin And T-2 Toxin). **British Poultry Science**. 41: 640-650. 2000.
- [25] SANTURIO, J.; MALLMANN, C.; ROSA, P.; APPEL, A.; Effect of sodium bentonite on the performance and blood variables of broiler chickens intoxicated with aflatoxinas. **British Poultry Science** 40: 115-119. 1999.
- [26] SATHISH, M.; RAOD, D.; Histological changes in liver by aflatoxicosis and Fenvalerate treated broiler birds. **Indian Veterinary Journal** 78: 1152-1153. 2001.
- [27] HARMA, P.R. Inmunotoxicity of Mycotoxins. **J. Dairy Sci.** 76: 892-897. 1993.
- [28] 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.
- [29] SMITH, J.; HAMILTON, P. Aflatoxicosis in the Broiler Chicken. **Poult. Sci.** 49: 207-215. 1970.
- [30] STATISTICAL ANALISIS SYSTEM SAS User Guide. **SAS® Statistics Institute** Inc. Cary N. C. USA Version 2.02. 1986.
- [31] STURKIE, P. Body Fluids: Blood. In. Sturkie, P ed. **Avian Physiology**. New York: Springer-Verlag. p. 102 – 120. 1986.
- [32] THAXTON, J.; THUNG,P.; HAMILTON,P. Immunosuppression in Chickens by Aflatoxin. **Poultry Science**. 53: 721-725. 1974.
- [33] TRENHOLM, H.L.; CHARMLEY, L.; PRELUSKY, D. Mycotoxin Binding agents: An update on what we know. In: **Proc. Alltechs 13th Annual Symposiun** on Biotechnology in the feed Industry (T.P. Lyons and K.A. Jacques, eds) Nottingham University Press, Loughborough, Leics, Uk. pp: 327-340. 1997.
- [34] URDANETA, S.; ANDRADE, L.; PARRA, O. Detección de Anemia y Anticuerpos Séricos a Anemia Infección aviar en pollos de engorde en los Municipios Mara y la Cañada de Urdaneta del estado Zulia. **Revista Científica FCV. LUZ.** 8(03): 63-68. 1998.