

ПРОУЧВАНЕ НА ЕФЕКТА НА АФЛАТОКСИН В₁ ВЪРХУ ХЕМАТОЛОГИЧНИТЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ПАТЕТА МЮЛАРИ

ИВАН ВЪЛЧЕВ

Тракийски университет, Ветеринарномедицински факултет,
Катедра „Вътрешни незаразни болести” - Стара Загора

Микотоксините са структурно различни съединения, продуцирани от нишковидни гъбички, които се различават с различна химична структура и биологични ефекти (Sudakin, 2003). Афлатоксините, охратоксините, трихотецените, зеараленонът и фумонизините са значимо важните микотоксините за здравето на хората и продуктивността на животните (Hussein and Brasel, 2001). С термина микотоксикози се формулират някои заболявания при животните и хората, които се причиняват след приемане на микотоксини (Hussein and Brasel, 2001). Излагането на селскостопанските животни на токсичното действие на плесенните гъбички и техните токсини се среща основно при храненето с контаминирани фуражи, съдържащи зърнени и маслодайни култури (Kamei and Watanabe, 2005; Tuzcu et al., 2010). Афлатоксините са вторични токсични метаболити, продуцирани от плесенни гъбички, принадлежащи към род *Aspergillus* (*A. flavus*, *A. parasiticus* и *A. niger*) (Kurtzman et al., 1987). Тези плесенни гъбички принадлежат към складовите плесени. При полски условия преди жътвата и складирането на зърнените фуражи растат плесенни гъбички, принадлежащи към род *Fusarium* (*Graminearum*, *Culmorum*, *Claviceps purpurea*), продуциращи зеараленон, фумонизини и трихотецени, докато по време на съхранението на зърнените фуражи растат плесенни гъбички, принадлежащи към род *Aspergillus* и *Penicillium* (*Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Penicillium verrucosum*), продуциращи афлатоксини (В₁, В₂, G₁, G₂) и охратоксини (Hashmi et al., 2006). Температурните граници, в които *A. flavus* and *A. parasiticus* продуцират афлатоксини са от 12 до 41°C, с оптимална температура в диапазона 25 – 32°C (Lillehoj, 1983), влажност на околната среда по-висока от 62% и влажност на фуражите по-висока от 14% (Royes and Yanong, 2002). Афлатоксините са флуорисцентни съединения с определена характеристика. Афлатоксин В₁ (AFB₁) и афлатоксин В₂ (AFB₂) имат синя флуорисценция, а афлатоксин G₁ (AFG₁) и афлатоксин G₂ (AFG₂) имат зелена флуорисценция при въздействие с ултравиолетови лъчи (Hussein and Brasel, 2001). Афлатоксините са силно токсични за човека и животните и в същото време са най-силните природни отрови. Подобно на останалите микотоксини те са термоустойчиви (Cheeke, 1998). Според законодателството на Европейския съюз максимално допустимите количества на AFB₁ във фуражите за птици е 10 ppb. Според законодателството на Европейския съюз и страни като Чили, Канада и Съединените Американски Щати е прието за максимално допустимо количество

от 20 ppb на общия афлатоксин (AFB₁ + AFG₁ + AFB₂ + AFG₂) във фуражните смеси, предназначени за птицевъдния отрасъл (Fonseca, 2003; Directive 2002/32/EC). Идентифицирани са повече от 18 различни афлатоксини (В₁, В₂, G₁, G₂, Р, Q, М₁, М₂, В₂а и т.н.). Най-често срещаните афлатоксини с токсикологично значение, продуцирани в плесенни култури, растящи върху фуражите при естествени условия, са В₁, В₂, G₁ и G₂, а в млякото - М₁ и М₂ (IARC, 2002). Афлатоксин В₁ (AFB₁) е най-токсичният метаболит за хора, животни и водни организми (Kennedy et al., 1998). Афлатоксин В₁ е силен природен хепатотоксин, канцероген, тератоген и мутаген (Han et al., 2008). Terao and Ueno (1978) установяват, че токсичността на AFG₂, AFB₂ и AFG₁ се равнява съответно на 10%, 20% и 50% спрямо тази на AFB₁. Афлатоксините се установяват като естествени контаминанти основно в зърнените и маслодайните култури, дървесните ядки и млякото (Wu et al., 2009). От друга страна, е установено, че 77% от количеството на афлатоксините, срещани при естествени условия, се пада на афлатоксин В₁ (Wilson and Payne, 1994). Афлатоксините са потенциална заплаха за здравето на птиците и тяхната продуктивност при консумирането на контаминирани фуражни смеси (Huff et al., 1986). Птиците и от тях подрастващите патета, гъсета, пуйчета и пилета са по-чувствителни към токсичното действие на афлатоксините. Токсичните ефекти на афлатоксините се локализируют основно в черния дроб и се характеризират с некрози, кръвоизливи и пролиферация на епитела на жлъчните каналчета. Хронично протичащата афлатоксикоза при тези видове птици се характеризира със загуба на живо тяло, намалена конверсия на фураж, повишена чувствителност към инфекциозни заболявания и намалена продукция на яйца (Dalvi, 1986). В експеримент с пилета бройлери Al-Daraji et al. (2004) установяват промени в хематологичните и химичните показатели на кръвта (еритроцити, левкоцити, тромбоцити, хематокрит, концентрация на хемоглобин, процент на хетерофилни левкоцити и лимфоцити, пикочна киселина, глюкоза, холестерол, общ белтък, калций, фосфор, активността на: гама глутамил-трансферазата и алкалната фосфатаза).

Един от най-практичните методи за детоксикация на контаминирани микотоксини фуражи е използването на нехранителни абсорбенти, които имат способността да се свързват с тях и да инхибират абсорбцията им от стомашно-чревния тракт, като по този начин свеждат до минимум токсичните им ефекти върху животните и тяхното пренасяне в органите на животните и продуктите

от животински произход (Ramos et al., 1996; Bintvihot et al., 2002, Kana et al., 2011; Oguz, 2012). Един добър микосорбент трябва да може да възстанови хранителните стойности на контаминирания с афлатоксин фураж. Качеството на микосорбентите се изразява в четири основни параметри, а именно свързващ капацитет, абсорбционна ефективност, време за активиране и степен на свързване (Van Kessel and Hiang-Chek, 2004). Процесът на свързване на афлатоксините от микосорбентите се основава на принципа на електрическия поляритет. Отрицателният електрически заряд на микотоксина се свързва с положителния електрически заряд на микосорбента и по този начин микотоксините се обездвижват и впоследствие изхвърлят от организма на животните. Действието на алуминосиликатите, активния въглен и дрождите са обширно проучени, като са получени обнадеждаващи резултати (Ramos et al., 1996; Huwig et al., 2001; Mabbet, 2005; Girish and Devegowda, 2006; Oguz, 2012).

Целта на настоящото проучване бе да се проследят промените в хематологичните показатели след експериментално възпроизведена афлатоксикоза B_1 при патета мюлари. Едновременно с това друга наша цел бе да се проучи възможността за превенция на токсичните ефекти на AFB₁, чрез прибавяне към фуража на микосорбента Mucotox NG (Ceva Sante Animale, France).

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИ

За реализиране на целта беше осъществен експеримент с 80 броя десетдневни патета мюлари от женски пол.

Експериментът беше проведен по следната схема:

I група – контролна. Мюларите от контролната група бяха хранени с балансирана фуражна смеска, съобразена с възрастта им, производство на фуражен завод „Зоохранивест“ – Стара Загора. Те бяха хранени с гранулирани стартер, гроуер и финишер;

II група – експериментална, в която мюларите получаваха със стандартната фуражна смеска 0.5 mg/kg фураж афлатоксин B_1 ;

III група – експериментална, в която мюларите получаваха със стандартната фуражна смеска 0.8 mg/kg фураж афлатоксин B_1 ;

IV група – експериментална, в която мюларите получаваха със стандартната фуражна смеска 0.5 mg/kg фураж афлатоксин B_1 и 2g/kg фураж Mucotox NG (Ceva Sante Animale, France).

Използваният в експеримента афлатоксин B_1 е продуциран от *Aspergillus flavus* (99% чистота) и беше закупен от Sigma-Aldrich, Germany. При опитните групи мюлари, за по-добро размесване на афлатоксин B_1 , фуражът бе смлян. Осигурени бяха оптимални микроклиматични параметри, еднакви за всички групи. В началото на експеримента температурата на въздуха в жизнената зона на мюларите беше 35°C и до 15-тия ден се понижаваше с 1°C на ден; до 28-мия ден беше 20°C, а след това +18°C при относителна влажност на въздуха 60-75% (Наредба №44/20.04.2006г). Продължителността на светлинния ден беше 24 h от началото до края експеримента. Контролната и опитните групи патета бяха разположени в

различни секции, с площ по 4 m² в едно и също помещение. Отделните секции бяха застлани с чисти и сухи стърготини с дебелина на слоя 5 cm. През първата седмица фронтът на хранене беше 1 cm а след това 10 cm. Кръвни проби бяха получени от *v. metatarsalis medialis* на 21-ия и 42-ия ден след началото на експеримента с помощта на стерилни контейнери, съдържащи K₂EDTA (FL medical, Italy) за определяне стойностите на: хемоглобина (фотометричен-колориметричен тест-Human Diagnostica Germany), хематокрита (микроцентрофужен метод, описан от Ангелов и сътр.) (Ангелов и др. 1999), броя на еритроцитите, тромбоцитите и левкоцитите (камерен метод, описан от Ангелов и сътр. 1999). Морфологичното диференциране на левкоцитите (ДКК %) бе извършено чрез приготвяне на кръвна разстилка. Експерименталните проучвания бяха извършени с одобрението на комисията по етика и хуманно отношение към животните при Ветеринарномедицински факултет на Тракийския университет (Разрешително No 42.10.10.2011).

Вариационно-статистическата обработка беше осъществена с еднофакторен модел на Anova, а статистическата достоверност беше определена с Tukey-Kramer test ($P < 0.05$).

РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

Промените в хематологичните показатели от червената кръвна картина (еритроцити, хемоглобин, хематокрит и тромбоцити) между контролната и експерименталните групи патета са представени в табл. 1. Стойностите на еритроцитите при II и III експериментална група бяха статистически достоверно по-ниски и през двата периода на проследяване (21-ия и 42-ия ден) в сравнение с контролната група ($P < 0.001$). Стойностите им на 21-ия ден бяха съответно – 2.52±0.05 T/l (17.92%) и 2.34±0.05 T/l (23.78%) в сравнение с контролната група 3.07±0.07 T/l, а на 42-ия ден наблюдаваните промени се задълбочиха, като отчетените стойности при II опитна група бяха 2.31±0.02 T/l (21.96%), а при III опитна група – 2.10±0.05 T/l (29.06%) в сравнение с контролната група 2.96±0.06 T/l. Стойностите на хемоглобина бяха достоверно по-ниски при II и III експериментална група в сравнение с контролната група ($P < 0.001$). Стойностите на 21-ия ден бяха, както следва: 137.57±1.27 g/l при контролната група, 117.63±1.10 g/l (14.5%) при II опитна група и 111.53±1.35 g/l (18.93%) при III опитна група. На 42-ия ден наблюдаваните промени се задълбочиха, като измерените стойности бяха съответно – 107.76±2.60 g/l (20.18%) при II опитна група и 96.96±3.85 g/l (28.18%) при III опитна група в сравнение с контролната група 135.00±1.34 g/l. При патетата, третирани самостоятелно с AFB₁ (II и III експериментална група) стойностите на хематокрита бяха статистически достоверно по-ниски и през двата периода на проследяване ($P < 0.001$). През първия период на проследяване (21-ия ден) стойностите при II експериментална група бяха съответно 32.4±1.23% (18.39%), а при III експериментална група 28.9±0.79% (27.21%) в сравнение с контролната група 39.7±0.81%. През втория период на проследяване (42-ия ден) стойностите бяха, както след-

Таблица 1. Промени в стойностите на хематологичните показатели (еритроцити, хемоглобин, хематокрит и тромбоцити) при патета мюлари третиранни посредством фуража самостоятелно с афлатоксин B₁ (AFB₁) и в комбинация с Mycotox NG

Table 1. Changes in haematological parameters (red blood cells, haemoglobin, haematocrit and platelets) in broiler chickens whose feed was supplemented either with aflatoxin B₁ (AFB₁) or with AFB₁ and Mycotox NG

Групи	Еритроцити T/l		Хемоглобин g/l		Хематокрит %		Тромбоцити G/l	
	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден
I	3.07± 0.07	2.96± 0.06	137.57± 1.27	135.00± 1.34	39.7± 0.81	38.4± 0.76	83.09± 2.93	83.26± 6.38
II	2.52± 0.05 ^{1c}	2.31± 0.02 ^{1c}	117.63± 1.10 ^{1c}	107.76± 2.60 ^{1c}	32.4± 1.23 ^{1c}	29.6± 1.07 ^{1c}	60.69± 2.99 ^{1c}	55.00± 1.75 ^{1c}
III	2.34± 0.05 ^{1c}	2.10± 0.05 ^{1c,2a}	111.53± 1.35 ^{1c,2a}	96.96± 3.85 ^{1c,2a}	28.9± 0.79 ^{1c,2a}	24.9± 0.95 ^{1c,2b}	44.29± 2.80 ^{1c,2c}	40.56± 1.48 ^{1c,2a}
IV	2.80± 0.06 ^{1a,2a,3c}	2.77± 0.04 ^{1a,2c,3c}	130.85± 1.64 ^{1b,2c,3c}	124.49± 2.47 ^{1a,2a,3c}	36.2± 0.72 ^{1a,2a,3c}	34.9± 0.73 ^{1a,2c,3c}	71.74± 2.07 ^{1a,2a,3c}	68.61± 2.23 ^{1a,2a,3c}

Резултатите са представени като средни стойности (mean) ± стандартна грешка (SEM); n=20 патета във всяка група; ^aP<0.05; ^bP<0.01; ^cP<0.001; 1 – в сравнение с контролната група; 2 – в сравнение с I опитна група; 3 – в сравнение с II опитна група.

Таблица 2. Промени в стойностите на левкоцитите и левкоцитните класове (% хетерофилни Le, % еозинофилни, % лимфоцити, % моноцити и % базофилни Le) при патета мюлари третиранни посредством фуража самостоятелно с афлатоксин B₁ (AFB₁) и в комбинация с Mycotox NG

Table 2. Changes in total and differential leukocyte counts (% heterophil, % eosinophil, % lymphocyte, % monocyte and % basophil) in broiler chickens whose feed was supplemented either with aflatoxin B₁ (AFB₁) or with AFB₁ and Mycotox NG.

Групи	Левкоцити G/l		Хетерофилни Le %		Еозинофилни Le %		Лимфоцити %		Моноцити %		Базофилни Le %	
	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден
I	20.41± 1.04	22.39± 1.19	30.00± 1.57	31.2± 1.81	2.70± 0.36	2.60± 0.13	62.3± 1.07	61.3± 1.07	3.60± 0.30	3.70± 0.36	1.40± 0.30	1.20± 0.29
II	28.08± 0.79 ^{1c}	32.95± 0.98 ^{1c}	41.6± 0.93 ^{1c}	44.5± 1.00 ^{1c}	2.30± 0.21	2.40± 0.33	51.00± 1.47 ^{1c}	48.00± 2.07 ^{1c}	3.80± 0.38	3.60± 0.26	1.30± 0.36	1.50± 0.34
III	31.85± 0.76 ^{1c,2a}	38.25± 1.18 ^{1c,2a}	45.1± 1.29 ^{1c}	48.1± 1.73 ^{1c}	2.50± 0.22	2.40± 0.50	47.2± 1.34 ^{1c,2a}	45.00± 1.07 ^{1c}	3.60± 0.34	3.40± 0.54	1.60± 0.45	1.10± 0.23
IV	24.32± 1.07 ^{1a,2a,3c}	27.69± 1.74 ^{1a,2a,3c}	36.2± 1.57 ^{1a,2a,3c}	37.1± 1.44 ^{1a,2b,3c}	2.40± 0.45	2.20± 0.41	57.1± 1.15 ^{1a,2a,3c}	55.6± 1.19 ^{1a,2b,3c}	3.00± 0.47	3.50± 0.34	1.30± 0.33	1.60± 0.40

Резултатите са представени като средни стойности (mean) ± стандартна грешка (SEM); n=20 патета във всяка група; ^aP<0.05; ^bP<0.01; ^cP<0.001; 1 – в сравнение с контролната група; 2 – в сравнение с I опитна група; 3 – в сравнение с II опитна група.

ва: 29.6±1.07% (22.92%) при II експериментална група и 24.9±0.95% (35.16%) при III експериментална група (P<0.001) в сравнение със стойностите при контролната група 38.4±0.76%. Аналогични бяха и промените в стойностите на тромбоцитите. Стойностите им на 21-ия ден бяха 60.69±2.99 G/l (26.96%) при II опитна група и 44.29±2.80 G/l (46.7%) при III опитна група (P<0.001) в сравнение с контролната група 83.09±2.93 G/l. На 42-ия ден наблюдаваните промени се задълбочиха, като измерените стойности бяха 55.00±1.75 G/l (33.95%) при II опитна група и 40.56±1.48 G/l (51.29%) при III опитна група (P<0.001) в сравнение с контролната група 83.26±6.38 G/l. При IV опитна група промените в стойностите на еритроцитите, хемоглобина, хематокрита и тромбоцитите бяха редуцирани (P<0.05 – P<0.01), в сравнение с контролната група. Стойностите на еритроцитите бяха съответно

– 2.80±0.06 T/l (8.80%) на 21-ия и 2.77±0.04 T/l (6.42%) на 42-ия ден. Измереното количество на хемоглобина беше съответно – 130.85±1.64 g/l (4.89%) на 21-ия ден и 124.49±2.47 g/l (7.79%) на 42-ия ден. На 21-ия ден измерените стойности на хематокрита бяха 36.2±0.72 % (8.81%), а на 42-ия ден 34.9±0.73%. (9.12%) Броят на тромбоцитите беше, както следва: 71.74±2.07 G/l (13.66%) на 21-ия ден и 68.61±2.23 G/l (17.6%) на 42-ия ден.

В табл. 2 са представени резултатите относно промените в броя на левкоцитите и процентното съотношение между левкоцитните класове между контролната и опитните групи патета. Броят на левкоцитите (WBC) бе достоверно по-висок при II и III експериментална група и през двата периода на проследяване в сравнение с контролната група. При II опитна група измерените стойности бяха съответно – 28.08±0.79 G/l (37.57%) на 21-ия ден

и 32.95 ± 0.98 G/l (47.16%) на 42-ия ден ($P < 0.001$). При III опитна група броят на левкоцитите беше 31.85 ± 0.76 G/l (56.05%) на 21-ия ден и 38.25 ± 1.18 G/l (70.83%) на 42-ия ден ($P < 0.001$). Добавянето на микосорбент към дажбата на IV опитна група намалява отчасти вредните ефекти на AFB₁ върху броя на левкоцитите. Броят на 21-ия ден беше 24.32 ± 1.07 G/l (19.15%) и 27.69 ± 1.74 G/l (23.67%) на 42-ия ден ($P < 0.05$). Данните от изследванията върху процентното съотношение на левкоцитните класове (Диференциална кръвна картина – ДКК) регистрираха достоверни промени в класовете на хетерофилните левкоцити и лимфоцитите (Lym). Броят на хетерофилните левкоцити беше достоверно по-висок при II и III експериментална група на 21-ия ден съответно – $41.6 \pm 0.93\%$ (38.66%) и $45.1 \pm 1.29\%$ (50.33%), а на 42-ия ден съответно – $44.5 \pm 1.00\%$ (44.62%) и $48.1 \pm 1.73\%$ (54.16%) ($P < 0.001$) в сравнение с контролната група ($30.00 \pm 1.57\%$ и $31.2 \pm 1.81\%$). По-силно наблюдаваните промени бяха изразени на 42-ия ден. При IV група промените в класа на хетерофилните левкоцити отчасти са редуцирани след добавянето на микосорбент, $P < 0.05$. Измерените стойности бяха съответно – $36.2 \pm 1.57\%$ на 21-ия ден и $37.1 \pm 1.44\%$. В сравнение с контролната група понижението бе съответно с 20.66% и 18.91%. Делът на лимфоцитите на 21-ия ден бе $51.00 \pm 1.47\%$ (18.14%) при II група и $47.2 \pm 1.34\%$ (24.24%) при III група ($P < 0.001$). На 42-ия ден този дял при II група бе $48.00 \pm 2.07\%$ (21.70%) и $45.00 \pm 1.07\%$ (26.60 %) при III група ($P < 0.001$). При IV група промените в класовете на лимфоцитите отчасти са намалени след добавянето на микосорбент ($P < 0.05$). На 21-ия ден стойностите бяха съответно – $57.1 \pm 1.15\%$, а на 42-ия ден $55.6 \pm 1.19\%$. Понижението бе съответно с 8.34% и 9.30%. Достоверни промени в класа на моноцитите, еозинофилните и базофилните Le % между контролната и опитните групи не бяха установени ($P > 0.05$).

Достоверни промени в стойностите на средния обем на еритроцитите (MCV), средната концентрация на хемоглобин в еритроцитите (MCHC) и средното съдържание на хемоглобин в един еритроцит (MCH) между контролната група пилета и експерименталните групи не бяха установени ($P > 0.05$). (табл. 3).

Афлатоксините, техните метаболити, както и продуцираните от тях реактивни кислородни видове (ROS), увреждат хемопоезата в костния мозък и лимфните органи, където се образуват кръвните клетки и другите компоненти на кръвта (Halliwell, 2007). Афлатоксините причиняват хематологични увреждания (Dieter et al., 1983). Установено е, че афлатоксините причиняват лимфо и моноцитопения и същото време повишаване на процента на неутрофилните левкоцити (Donmez et al., 2012). При говедата е наблюдавано нарушение в хемокоагулацията и удължаване на протромбиновото време (Thrasher, 2012).

Намаляването на стойностите на хематокрита, хемоглобина, еритроцитите, тромбоцитите и процента на лимфоцитите, наблюдавано при пилета бройлери с експериментално възпроизведена афлатоксикоза, вероятно се дължи на потискащия ефект на афлатоксините върху хемопоезичните органи (Campbell et al., 1983, Huff et al., 1986, 1988, Kubena et al., 1990, Kecci et al., 1995; 1998; Oguz et al., 2000; Sakhare et al., 2007; Mohamed and Mohamed, 2009). Аналогични промени бяха установени и в настоящото проучване. От друга страна, това понижение в стойностите на показателите от червената кръвна картина е резултат от инхибиране на протеиновия синтез, установено в предишни проучвания (Kubena et al., 1993; Abdel-Wahhab, et al., 2002). Установено е, че афлатоксин B₁ намалява желязосвързващия капацитет на еритроцитите (Harvey et al., 1991) и нарушава метаболизма на някои микроелементи (Cu и Zn), участващи в хемопоезата (Abdel-Wahhab, et al., 2002). Тези данни са в подкрепа на

Таблица 3. Промени в стойностите на средния обем на еритроцитите (MCV), средната концентрация на хемоглобин в еритроцитите (MCHC) и средното съдържание на хемоглобин в един еритроцит (MCH), при патета мюлари третиранни посредством фуража самостоятелно с афлатоксин B₁ (AFB₁) и в комбинация с Mycotox NG

Table 3. Changes in mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC) and mean corpuscular haemoglobin (MCH) in broiler chickens whose feed was supplemented either with aflatoxin B₁ (AFB₁) or with AFB₁ and Mycotox NG

Групи	MCV pg		MCHC g/l		MCH f/l	
	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден	21-ви ден	42-ри ден
I	129.94± 4.80	130.26± 4.06	347.62± 6.59	351.95± 7.74	45.05± 1.57	45.80± 1.21
II	128.28± 4.14	128.57± 4.10	367.42± 13.13	369.02± 17.34	47.15± 1.21	46.62± 1.29
III	123.53± 2.90	118.89± 4.40	388.56± 11.69	394.21± 20.31	47.75± 0.78	46.36± 1.96
IV	129.58± 4.00	126.06± 3.72	363.00± 9.47	357.33± 6.62	46.79± 1.05	44.98± 1.35

Резултатите са представени като средни стойности (mean) ± стандартна грешка (SEM); n=20 патета във всяка група; ^aP<0.05; ^bP<0.01; ^cP<0.001; 1 – в сравнение с контролната група; 2 – в сравнение с I опитна група; 3 – в сравнение с II опитна група.

нашите резултати, че афлатоксините причиняват анемия. Намаляване на броя на еритроцитите и средния обем на еритроцитите е наблюдавано при пилета бройлери, получавали за храна фуражи, контаминирани с афлатоксини (Singh et al., 1992), охратоксини (Doerr and Huff, 1980; Aved et al., 1991) или комбинацията от двата микотоксина (Sawarkar et al., 2011). Аналогични промени в броя на еритроцитите и средния обем на еритроцитите са наблюдавани и при риби, приемали фуражи, контаминирани с афлатоксини (El-Bouhy et al., 1993).

Повишаването на стойностите на левкоцитите и процента на хетерофилните левкоцити се предполага, че се дължи на дразнещото действие на афлатоксините върху лигавицата на храносмилателния канал, предизвикващо нейното възпаление (El-Lethey and El-Zorb, 2004; Sakhare et al., 2007; Safamehr, 2008). Наблюдаваната лимфоцитопения може да се обясни с токсичното въздействие на афлатоксините върху циркулиращи в периферната кръв клетки или с потискане на функцията на костния мозък и лимфоидните органи (Oguz et al., 2000; Mohamed and Mohamed, 2009). Увеличаването на броя на левкоцитите и процента на хетерофилните левкоцити освен с възпалителната реакция би могло да се обясни и с промените в костния мозък (Abdel-Wahhab et al., 2002). При мишки, третирани с Т-2 токсин Sinozuka et al. (1998) са наблюдавали намаляване на клетъчната плътност плътност в хемопоеитичния паренхим. Тези промени са установени в областта на мегафизата и диафизата. Наблюдавано е намаляване на миелоцитите, незрелите гранулоцити, еритробластите и лимфоцитите. Миелоцитите са показали кареорексис, кареопикнозис фрагментация и поглъщане от съседните макрофаги неутрофили. В мегакариоцитите са установени ядра с неправилни размери, увеличен брой ядра и интрацелуларни кисти.

За разлика от резултатите, получени в настоящото проучване, Aved et al. (1991), Mohamed and Mohamed (2009), Mohiuddin et al. (1993) установяват намаляване на броя на левкоцитите при пилета бройлери, получавали фураж, контаминирани с афла и охратоксини.

Отсъствието на достоверни промени в класа на еозинофилите, моноцитите и базофилните, наблюдавани в настоящото проучване, е в съответствие с резултатите и на други автори (Oguz et al., 2000; Mohamed and Mohamed, 2009).

Установената липса на промени в стойностите на средното съдържание на хемоглобин в един еритроцит (МСН), средното съдържание на хемоглобин в еритроцитите (МСНС) и средния обем на еритроцитите (МСВ) са в съответствие с резултатите на други автори (Oguz et al., 2000; Basmacioglu et al., 2005).

Използването на различни микосорбенти се смята за един най-надежните методи за намаляване на токсичното действие на микотоксините върху животните (Dakovic et al., 2005). Адсорбентите имат висока способност за свързване с афлатоксините в стомашно-чревния тракт на животните, механизъм чрез който намаляват абсорбцията им и вредните ефекти върху птиците (Eraslan et al., 2005; Raju and Dewegowda, 2000). Редуциране на вредните ефекти на афлатоксин В₁ върху

хематологичните показатели е постигнато чрез прибавяне на микосорбенти към фуражните смеси на пилета бройлери (естерифициран глюкоманан, клиноптиолит) (Oguz et al., 2000; Aravind et al., 2003; Basmacioglu et al., 2005).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Самостоятелното включване на АFB₁ в нарастващи дози (0.5 или 0.8 mg/kg фураж) към комбинираната фуражна смеска за патета мюлари, предизвиква промени в хематологичните показатели (олигохромемия, еритропения, понижен хематокрит, тромбоцитопения, левкоцитоза с хетерофилия и лимфоцитопения).

Добавянето на 2 g/kg фураж Mucotox NG към дажба-та, съдържаща 0.5 mg/kg АFB₁, е в състояние ефективно да облекчи тежестта на промените в стойностите на проследените хематологични показатели.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ангелов А., Н. Ибришимов и С. Милашки, 1999. Клинико-лабораторни изследвания във ветеринарната медицина. "Проф. Марин Дринов", София.
2. Наредба №44/20.04.2006г. за ветеринарномедицинските изисквания към животновъдните обекти ДВ 41 Приложение № 9/II, стр.61-62.
3. Abdel-Wahhab, M. A., S. A. Nada, F. A. Khalil, 2002. "Physiological and toxicological responses in rats fed aflatoxincontaminated diet with or without sorbent materials," *Animal Feed Science and Technology*, 97, 3-4, 209-219.
4. Al-Daraji, H. J., I. A. Al-Ani, J. K. Minati, H. E. Al-Hiti, 2004. The use of different methods to suppress the effect of aflatoxicosis and its influence on certain blood traits in broiler. *Iraqi Journal of Agricultural Science*, 35, 2, 103-112.
5. Aravind, K. L., V. S. Patil, G. Dewegowda, B. Umakantha, S. P. Ganpule, 2003: Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poultry Science*, 82, 4, 571-576.
6. Aved, I. A. M., R. Dafella, A. F. Yogi, S. E. I. Adam, 1991. Effect of ochratoxin A on Lohaman type chicks. *Veterinary and Human Toxicology*, 33, 357-360.
7. Basmacioglu, H., H. Oguz, M. Ergul, R. Sol, Y. O. Birdane, 2005. Effect of dietary esterified glucomannan on performance, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to aflatoxin. *Czech Journal of Animal Science*, 50, 1, 31-39.
8. Bintvihok, A., S. Thiengnin, K. Doi K, S. Kumagai, 2002. Residues of Aflatoxins in the Liver, muscle and Eggs of Domestic Fowls. *Journal of Veterinary Medical Science*, 64, 11,
9. Campbell, M. L., J. D. May, W. E. Huff, J. A. Doevr, 1983. Evaluation of immunity of young broiler chickens during aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poultry Science*, 62, 2138-2144.
10. Cheeke, P. R., 1998. Natural toxicants in Feed, forages and Poisonous Plants. 2nd ed. Interstate publishers, Danville, IL

11. **Dakovic, A., M. Tomasevic-Canovic, V. Dondur, G. E. Rottinghaus, V. Medakovic, S. Zaric**, 2005. Adsorption of mycotoxins by organozeolites. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*, 46, 20-25.
12. **Dalvi, R. R.**, 1986. An overview of aflatoxicosis of poultry: its characteristics, prevention and reduction. *Veterinary Research Communications*, 10, 429-443.
13. **Dietert, R. R., S. E. Bloom, M. A. Qureshi, U. C. Nanna**, 1983. Hematological Toxicology following Embryonic Exposure to Aflatoxin-B₁. *Experimental Biology and Medicine*, 173, 4, 481-485.
14. **Directive 2002/32/EC of the European parliament and of the council of 7 may 2002 on undesirable substances and products in animal feed. Official Journal**, No., L 140, 30, 5, 2002.
15. **Doerr, J. A., R. B. Huff**, 1980. Interactive effects of aflatoxin and ochratoxin A on some blood constituents in broiler chickens. *Poultry Science*, 59:1600-1602.
16. **Donmez, N., H. H. Dönmez E. Keskin, Э. Кәсәдере**, 2012. Research Article Effects of Aflatoxin on Some Haematological Parameters and Protective Effectiveness of Esterified Glucomannan in Merino Rams. *The Scientific World Journal*, 10.1100/2012/342468, 1-4.
17. **El-Bouhy, Z. M., A. A. Ali, M. S. Helmy**, 1993. "Preliminary studies on aflatoxicosis of contaminated food". *Zagazig Veterinary Journal* 21, 4, 607-624.
18. **EL-Lethey, H. H. El-Zorb**, 2004. Effect of dimethyl diphenyl bicarbohylate (DOB) on roilers during experimental aflatoxicosis. In: *Proceedings 1rst Animal Conference, Faculty Veterinary Medicine, Moshtohor, Sept, 2004*, 215-233.
19. **Eraslan, G., D. Essiz, M. Akdogan, F. Sahindokuyucu, L. Altintas**, 2005. The Effects of Aflatoxin and Sodium Bentonite Combined and Alone on Some lood Electrolyte Levels in Broiler Chickens. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 29, 3, 601-605.
20. **Fonseca, H.**, 2003. Legislação sobre micotoxinas www.micotoxinas.com.br.
21. **Girish, C. K., G. Devegowda**, 2006. Efficacy of Glucomannan-containing yeast product (Mycosorb®) and hydrated sodium calcium aluminosilicate in preventing the individual and combined toxicity of aflatoxin and T-2 toxin in commercial broilers. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 19, 6, 877-883.
22. **Halliwell, B.**, 2007. Oxidative stress and cancer: have we moved forward? *Biochemistry Journal*, 401, 1-11.
23. **Han, X. Y., Q. C. Huang, W. E. Li, Z. R. Xu**, 2008. Changes in growth performance, digestive enzyme activities and nutrient digestibility of cherry valley ducks in response to aflatoxin B₁ levels. *Livestock Science*, 119,:216-220.
24. **Harvey, R. B., L. F. Kubena, T. D. Phillips, M. H. Elissalde, W. E. Huff**, 1991. Diminution of aflatoxin toxicity to growing lambs by dietary supplementation with hydrated sodium calcium aluminosilicate. *American Journal of Veterinary Research*, 52, 152-156.
25. **Hashmi, I., T. N. Pasha, M. A. Jabbar, M. Akram, A. S. Hashmi**, 2006. Study of adsorption potential of yeast sludge against aflatoxins in broiler chicks. *Journal of Animal and Plant Science*, 16, 1-2, 2006.
26. **Huff, W. E., L. F. Kubena, R. B. Harvey, W. M. Hagler, S. P. Sorenson, T. D. Phillips, C. R. Giegler**, 1986. Individual and combined effect of aflatoxin and deoxynivalenol (DON, Vomitoxin) in broiler chicken. *Poultry Science*, 65, 7, 1291-1298.
27. **Huff, W. E., R. B. Harvey, L. F. Kubena, G. E. Rottinghaus**, 1988. Toxic synergism between aflatoxin and T-2 toxin in broiler chicken. *Poultry Science*, 67, 1418-1420
28. **Hussein, H. S., J. M. Brasel**, 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 2, 101-134.
29. **Huwig, A., S. Freimund, O. Käppeli, H. Dultler**, 2001. Mycotoxin detoxication of animal feed by different absorbents. *Toxicology Letters*, 122: 691-699.
30. **International Agency for Research on Cancer (IARC)**, 2002. Summaries and evaluations: aflatoxins. Lyon: IARC Press, 82:171.
31. **Kamei, K., A. Watanabe**, 2005. *Aspergillus* mycotoxin and their effect on the host. *Medical Mycology Supplement*, 43: 95-99.
32. **Kana, J. R., A. Tegua, B. M. Mungfu, J. Tchoumboe**, 2011. Growth performance and carcass characteristics of broiler chickens fed diets supplemented with graded levels of charcoal from maize cob or seed of *Canarium schweinfurthii* Engl. *Tropical Animal Health and Production*, 43, 51-56.
33. **Kececi, T., Q. Demet, H. Oguz**, 1995. Single and combination effects of dietary aflatoxin and adsorbent (Mycofix Plus) on some hematological and serum biochemical parameters of broiler chickens *Journal of Veterinary Science*, 11, 95-101.
34. **Kececi, T., H. Oguz, V. Kurtoglu, O. Demet**, 1998. Effects of polyvinylpyrrolidone, synthetic zeolite and bentonite on serum biochemical and hematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis. *British Poultri Science*, 39, 3, 452-458.
35. **Kennedy, D., A. Delaney, G. Koren**, 1998. Mutagens, carcinogens and teratogens. In: *Goldfrank L (ed) Goldfrank's toxicologic emergencies*, 6th edn. Appleton & Lange, Stanford, pp 262-273
36. **Kubena, L., R. B. Harvey, T. D. Phillips, B. A. Clement**, 1993. Effect Of Hydrated Sodium Calcium Aluminosilicates On Aflatoxicosis In Broiler Chicks. *Poultry Science* 72, 4, 651-657.
37. **Kubena, L. F., R. B. Harvey, W. E. Huff, D. E. Corrier, T. D. Phillips, G. E. Rottinghaus**, 1990. Efficacy of a hydrated sodium calcium aluminosilicate to reduce the toxicity of aflatoxin and T-2 toxin. *Poultry Science*, 69, 7, 1078-1086.
38. **Kurtzman, C.P., B. W. Horn, C. W. Hesseltine**, 1987. *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamaritii*. *Antonie Leeuwenhoek*, 53, 147-158
39. **Lillehoj, E. B.**, 1983. "Effect of environmental and cultural factors of aflatoxin contamination of developing corn kernels." In: *V.L. Diener, R.L. Asquith and J.W. Dickens (Eds). Aflatoxin and A. flavus in corn. Southern Coop Serv. Bull. 279, Craftmaster, Opelika, Ala, 112P.*
40. **Mabbett, T.**, 2005. Integrated management of mycotoxins. *Poult. Int.*, 44, 8, 10-14.
41. **Mohamed, A. H., M. H. Mohamed**, 2009. Haemato-

Biochemical And Pathological Studies On Aflatoxicosis And Treatment Of Broiler Chicks In Egypt. Veterinaria Italiana, 45, 2, 323-37.

42. **Mohiuddin, S. M., S. M. A. Warasi, M. V. Reddy**, 1993. Haematological and biochemical changes in experimental ochratoxicosis in broiler chicken. Indian Veterinary Journal, 70, 613-617.

43. **Oguz, H.**, 2012. Detoxification of aflatoxin in poultry feed: a review from experimental trials. Lohmann Information, 47, 2, 45-56.

44. **Oguz, H., T. Kececi, Y. O. Birdane, F. Onder, V. Kurtoglu**, 2000. Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. Research in Veterinary Science, 69, 1, 89-93.

45. **Raju, M., G. Devegoda**, 2000. 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.

46. **Ramos, A. J. E., fink-Gremmels, E. Hern6ndez**, 1996. Prevention of toxic effects of mycotoxins by means of nonnutritive absorbent compounds. Journal of Food Protection, 59, 631-641.

47. **Royes, J. B., R. P. Yanong**, 2002. "Molds in fish feeds and aflatoxicosis." Copyright by the University of Florida, Institute of Agricultural Science (UF/ IFAS).

48. **Safameher, A.**, 2008. Effects of clinoptilolite on performance, biochemical parameters and hepatic lesions in broiler chickens during aflatoxicosis. Journal of Animal and Veterinary Advances, 7, 4, 381-388.

49. **Sakhare, P. S., S. D. Harne, D. R. Kalorey, S. R. Warke, A. G. Bhandarkar, N. V. Kurkure**, 2007. Effect of Toxiroak polyherbal feed supplement during induced aflatoxicosis, ochratoxicosis and combined mycotoxicoses in broilers. Veterinarski arhiv, 77, 2, 129-146.

50. **Sawarkar, A. R., P. M. Sonkusale, N. V. Kurkure, C. R. Jangade, S. Maini, K. Ravikanth** 2011. Experimental

afla & ochratoxin-induced mixed mycotoxicosis in broiler and its amelioration with herbomineral toxin binder toxiroak gold. International Journal of Poultry Science, 10, 7, 560-566.

51. **Singh, A., K. C. Satija, S. K. Mahipal**, 1992. Haematological and biochemical studies on broiler chicks fed aflatoxin B₁ and after its withdrawal. Indian Journal of Poultry Science, 27: 153-156.

52. **Shinozuka, J., M. Suzuki, N. Noguchi, T. Sugimoto, K. Uetsuka, H. Nakayama, K. Doi**, 1998. T-2 toxin-induced apoptosis in hematopoietic tissues of mice. Toxicologic Pathology 26, 674-681.

53. **Sudakin, D. L.**, 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. Toxicology Letters, 143: 97-107.

54. **Terao, K., Y. Ueno**, 1978. Morphological and functional damage to cells and tissues. In Toxicology, Biochemistry, and Pathology of Mycotoxins. Uraguchi, K. and Yamazaki, M. Eds. John Wiley and Sons, New York. p.189

55. **Thrasher, J. D.**, 2012. Aflatoxicosis in animals. *Aflatoxins and Health*, www.alphaboostjuice.com/AFLATOXICOSIS_IN_ANIMALS.pdf.

56. **Tuzcu, M., E. Sur, I. Celik, Y. Oznurlu, M. K. Ciftci**, 2010. Effects of aflatoxin on the proportions of peripheral blood leukocyte and Alpha-Naphtyl Acetate Esterase (ANAE) positive lymphocyte in the mouse. Kafkas University Vetinaty Fakultesi Dergisi, 16, 337-341.

57. **Van Kessel, T. F. M., N. Hiang-Chek**, 2004. Aflatoxin binders-how to get the best value for money. International Poultry Production, 12, 4, 33-35.

58. **Wilson, D. M., G. A. Payne**, 1994. Factors affecting Aspergillus Flavus group infection and aflatoxin contamination of crops. In: Eaton, D.L. Groopman, J.D. (Eds.). The toxicology of Aflatoxins. Academic Press inc, San Diego, pp123-145.

59. **Wu, Q., A. Jezkova, Z. Yuan, L. Pavlikova, V. Dohnal, K. Kuca**, 2009. Biological degradation of aflatoxins. Drug Metabolism Reviews, 41, 1, 1-7.

INVESTIGATIONS THE EFFECTS OF AFLATOXIN B₁ ON HAEMATOLOGICAL PARAMETERS IN MULARD DUCKS

I. Valchev

Thrakia University, Faculty of Veterinary Medicine,

Department of Internal Non-Infectious Diseases - Stara Zagora

SUMMARY

In this experiment, the toxic effects of AFB₁ on some haematological parameters were investigated in mulard ducks, namely red blood cell counts (RBC), haemoglobin content (HGB), haematocrit (HCT), platelet counts (PLT), white blood cell counts (WBC), differential white blood cell counts (WBC %), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular haemoglobin (MCH) and mean corpuscular haemoglobin concentration (MCHC). Experiments were conducted with 4 groups of 20 10-day-old mulard ducks each. The groups were as followed: group I – control, fed a standard compound feed according to the species and the age; group II – experimental, whose feed was supplemented with 0.5 mg/kg AFB₁, group III – experimental, supplemented with 0.8 mg/kg AFB₁ and group IV – experimental, supplemented with 0.5 mg/kg AFB₁ and 2 g/kg Mycotox NG. The duration of the experiment was 42 days. Haematological analysis performed on the 21st day of the trial showed reduction in RBC, HCT, HGB and PLT and increased total WBC in groups II and III. The percentages of

the different leukocyte classes (differential leukocyte counts) demonstrated increased proportion of heterophils and lower percentages of lymphocytes. The observed changes tended to become more pronounced on the 42nd day of the experiment. There were no statistically significant changes in MCV, MCH, and MCHC, as well as in eosinophil, basophil, and monocyte percentages between control and treated groups ($p>0.05$). The supplementation of the feed with mycosorbent – Mycotox NG (experimental group IV) reduced partly the harmful effect of AFB₁ on studied haematological indices.

Key words: *Aflatoxin B₁, haematological changes, mallard ducklings Mycotox Ng.*