

Науковий вісник Львівського національного університету
ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького

Scientific Messenger of Lviv National University
of Veterinary Medicine and Biotechnologies

ISSN 2518–7554 print
ISSN 2518–1327 online

doi: 10.15421/nvlvet8373
<http://nvlvet.com.ua/>

UDC 616.091. 615.9:54

Analysis of biochemical and hematological parameters of blood, clinical signs and pathoanatomical changes for spontaneous poisoning of turkeys with diazinon

V.V. Tumanov

Stepan Gzhytskyi National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies Lviv, Ukraine

Article info

Received 01.02.2018
Received in revised form
05.03.2018
Accepted 12.03.2018

Stepan Gzhytskyi National
University of Veterinary Medicine
and Biotechnologies Lviv,
Pekarska Str., 50, Lviv,
79010, Ukraine.
Tel.: +38-067-574-68-01
E-mail: borisfent1980@gmail.com

Tumanov, V.V. (2018). Analysis of biochemical and hematological parameters of blood, clinical signs and pathoanatomical changes for spontaneous poisoning of turkeys with diazinon. Scientific Messenger of Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies. 20(83), 370–375. doi: 10.15421/nvlvet8373

For today, the actual problem of veterinary medicine is the diagnosis of animal poisoning with organophosphorus pesticides, which are used as insecticides and acaricides, fungicides, herbicides, rodenticides, nematocides. One of the highly effective nonspecific organophosphorus insecticides is diazinon, falling into the body causing poisoning of various species of birds. The basis of the toxic action of diazinon is the ability to block the enzyme acetylcholinesterase. As a result, acetylcholine is accumulated in cholinergic synapses, excessive stimulation of the nerves and muscles is noted, and in the future, a violation of the normal passage of nerve impulses develops. Complex research was carried out of Domestic Turkeys (*Meleagris gallopavo*) in which spontaneous poisoning with diazinon was recorded. Biochemical examination of the serum was carried out using the biochemistry analyzer «Cobas Integra 400 plus». The activity of the serum acetylcholinesterase was determined by the Method of Hestrin, 1949. In the stabilized blood, the hemoglobin content was determined by the hemoglobin-cyanide methods, the number of red blood cells and leukocytes was counted in Gorjaev's count chamber and the leukogram - after microscopy of blood smears, painted according to the Romanovsky-Gimza methods. The breeding of birds was carried out using the Shores method. The organs were fixed in 10% neutral formalin, 96% ethanols and Carnoy's solution. The histological sections were made using a sown and freezing microtome, stained hematoxylin and eosin. The histological study of the preparations and their photographing was performed using microscope Leica DM 2500, and camera Leica DFC 450 C., Application Suite Version 4.4.0. Clinically ill turkeys poisoned by diazinon showed oppression, tremor and paresis of wings. Later, the coordination of movements was disturbed: sick birds fell on their backs, marked swimming movements of the pelvic limbs, cramps and spastic contractions of the limb muscles. From the oral cavity was allocated a rare mucous mass. After acute attacks and spastic contractions of the muscles, muscle weakness developed. In the terminal periods of the disease, there were also spasms of various muscle groups, paralysis, difficulty and frequent breathing accompanied by wheezing, cyanosis of the skin. During the conducted biochemical examination of serum, a marked decrease in the level of acetylcholinesterase, an increase in the level of AST, cholesterol and uric acid was observed. In the pathoanatomical study, expressed discirculatory processes in the form of acute congestive hyperemia, stasis, perivascular edema and hemorrhages, as well as necrotic changes in cardiomyocytes, hepatocytes, nephrocytes and brain neurons were found. Quality positive reaction on diazinon was received as a result of the bird crop content research by the method of thin-layer chromatography paper manifestation of iodine bismuth.

Key words: organophosphate, diazinon, poisoning, Domestic Turkey, anatomical pathomorphology, acetylcholinesterase, congestive hyperemia, necrosis.

Аналіз біохімічних та гематологічних показників крові, клінічних ознак та патологоанатомічних змін за спонтанного отруєння індиків діазиноном

В.В. Туманов

Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького,

м. Львів, Україна

На сьогоднішній день актуальною проблемою ветеринарної медицини є діагностика отруєнь тварин фосфорорганічними пестицидами, які використовуються у якості інсектицидів та акарицидів, фунгіцидів, гербіцидів, родентицидів, нематоцидів. Одним з високоефективних неспецифічних фосфорорганічних інсектицидів є діазинон, потрапляння якого в організм стає причиною отруєння різних видів птахів. В основі токсичної дії діазинону лежить здатність блокувати фермент ацетилхолінестеразу. Унаслідок цього ацетилхолін нагромаджується в холінергічних синапсах, відзначається надмірна стимуляція нервів та м'язів, а надалі розвивається порушення нормального проходження нервових імпульсів. Проведено комплексне дослідження домашніх індиків (*Meleagris galloravo*) у яких реєстрували спонтанне отруєння діазиноном. Біохімічне дослідження сироватки крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора «Cobas Integra 400 plus». Активність ацетилхолінестерази плазми крові визначали методом Хестрина. У стабілізованій крові вміст гемоглобіну визначали гемоглобінціанідним методом, кількість еритроцитів та лейкоцитів підраховували у камері з сіткою Горяєва, а лейкограму – після мікроскопії мазків крові, зафарбованих за методом Романовського-Гімза. Розтин птахів, які загинули проводили за методом Шора. Шматочки органів фіксували у 10% нейтральному формаліні, 96% етиловому спирті та рідині Карнуа. Гістозрізи виготовляли за допомогою санного та заморожуючого мікротомів, фарбували гематоксилином та еозинном, суданом-III. Гістологічне дослідження препаратів та їх фотографування проводили з використанням мікроскопа Leica DM-2500 (Switzerland), фотокамери Leica DFC450C і програмного забезпечення Leica Application Suite Version 4.4. За отруєння діазиноном клінічно у хворих індиків реєстрували пригнічення, тремор та парези крил. Надалі порушувалась координація рухів: хворі птахи падали на спину, відзначали плавальні рухи тазовими кінцівками, з'являлись судороги та спастичні скорочення м'язів кінцівок. З ротової порожнини виділялась рідка слизиста маса. Після приступів збудження розвивалась м'язова слабкість. У термінальні періоди хвороби також відзначали спазми різних груп м'язів, паралічі, утруднене та часте дихання, що супроводжувалось хрипами, ціаноз шкіри. Під час проведеного біохімічного дослідження сироватки крові встановлено достовірне виражене зниження рівня ацетилхолінестерази, зростання рівня АСАТ, холестерину та сечової кислоти. За патологоанатомічного дослідження виявили виражені дисциркуляторні процеси у вигляді гострої застійної гіперемії, стазів, периваскулярних набряків та крововиливів, а також альтеративні зміни кардіоміоцитів, гепатоцитів, нефроцитів та нейронів головного мозку. Унаслідок проведення токсикологічного дослідження екстракту з відібраного вмісту вола індиків методом тонкошарової хроматографії на папері з проявленням йодвісмутовим реактивом отримано якісну позитивну реакцію щодо сполуки діазинон. Чутливість реакції 4 мкг/см².

Ключові слова: фосфорорганічні сполуки, діазинон, отруєння, індик домашній, ацетилхолінестераза, патоморфологія, застійна гіперемія, некроз.

Вступ

На сьогоднішній день глобального значення набуває проблема забруднення навколишнього середовища ксенобіотиками та їх негативного впливу на організм різних видів тварин та людини (Alam Nur et al., 2015; Botha et al., 2015; Nozdrenko et al., 2015; Al-Attar et al., 2017). Досить часто трапляються гострі та хронічні спонтанні отруєння птахів та ссавців фосфорорганічними пестицидами, які використовуються у якості інсектицидів та акарицидів, фунгіцидів, гербіцидів, родентицидів, нематоцидів тощо. Одним з високоефективних неспецифічних фосфорорганічних інсектицидів є діазинон, що належить до сполук контактної та кишкової дії. За перорального потрапляння діазинон, швидко всмоктується у шлунково-кишковому тракті, метаболізує з утворенням діазоксону. В основі токсичної дії діазинону та його метаболітів лежить здатність блокувати фермент ацетилхолінестеразу. Унаслідок цього ацетилхолін нагромаджується в холінергічних синапсах, відзначається надмірна стимуляція нервів та м'язів, а надалі розвивається порушення нормального проходження нервових імпульсів (Cox, 2000; maleki et al., 2016).

Патологоанатомічні зміни за отруєння діазиноном охоплюють різні органи і системи, оскільки відзначається холінергічна дія в усіх нервових структурах, у яких передача імпульсів здійснюється завдяки ацетилхоліну (Rady, 2009; Proskocil et al., 2010; Majeed and Al-Sereah Bahaa, 2012; Tongo et al., 2012; Dankovych and Tumanov, 2016). Вираженість структурних змін залежить від дози та кратності надходження діазинону, тривалості інтоксикації тощо. У сучасній ветеринарній практиці під час діагностики хвороб різного генезу (у тому числі отруєнь) слід використовувати

комплексний підхід, за якого необхідно детально зібрати анамнез, вивчити клінічні ознаки, провести аналіз біохімічних та гематологічних показників крові, а також виявлених патологоанатомічних змін. Також слід відбирати матеріал для проведення додаткових лабораторних досліджень: у випадку підозріння на отруєння – токсикологічних, а за необхідності проведення диференційної діагностики – бактеріологічних, вірусологічних, паразитологічних тощо.

Матеріал та методи досліджень

Дослідження провели на домашніх індиках (*Meleagris galloravo*). Хвора птиця (n = 8) надійшла на кафедру нормальної та патологічної морфології і судової ветеринарії Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького для встановлення діагнозу.

Перед дослідженням детально збирали анамнез. Кров для біохімічного та гематологічного дослідження відбирали з підкрильцевої вени. Біохімічне дослідження сироватки крові проводили за допомогою біохімічного аналізатора «Cobas Integra 400 plus». Активність ацетилхолінестерази сироватки крові визначали за методом Сестрина, 1949, що описаний у посібнику Лемперга М.Д. (Lemperd, 1968). У стабілізованій крові вміст гемоглобіну визначали гемоглобінціанідним методом, кількість еритроцитів та лейкоцитів підраховували у камері з сіткою Горяєва, а лейкограму – після мікроскопії мазків крові, зафарбованих за методом Романовського-Гімза. Розтин птахів, які загинули проводили за методом Шора. Шматочки органів фіксували у 10% нейтральному формаліні, 96% етиловому спирті та рідині Карнуа. Гістозрізи виготовляли за допомогою санного та заморожуючого

мікромів, фарбували гематоксилином та еозином, суданом-III (Merkulov, 1969; Mulish and Welsh, 2010). Гістологічне дослідження препаратів та їх фотографування проводили з використанням мікроскопа Leica DM-2500 (Switzerland), фотокамери Leica DFC450C і програмного забезпечення Leica Application Suite Version 4.4. Також проводили хіміко-токсикологічне дослідження екстракту вмістимого вола методом тонкошарової хроматографії на папері з проявленням йодвісмутним реактивом (експрес-метод) для визначення наявності діазинону (Filov, 1964).

Отриманий цифровий матеріал обробляли статистично за допомогою комп'ютерної програми з визначенням середньої арифметичної (M), статистичної помилки середньої арифметичної (m), вірогідності різниці (P) між середніми арифметичними двох варіаційних рядів за критерієм достовірності (t) за таблицями Стьюдента. Різницю між двома величинами вважали вірогідною за $P < 0,05$; $P < 0,01$; $P < 0,001$.



Рис. 1. Тремор та парези крил

Слід зазначити, що провідною ланкою в механізмі токсичної дії фосфорорганічних сполук на організм є порушення каталітичної функції ацетилхолінестерази. У результаті проведеного нами дослідження встановлено достовірне виражене зниження рівня ацетилхолінестерази сироватки крові (табл. 1). Унаслідок різкого пригнічення активності ацетилхолінестерази у дослідних тварин відзначали порушення проведення нервових імпульсів, розвивалась виражена нервова симптоматика. Також виявили зростання рівня АсАТ, що вказує на розвиток альтеративних змін в печінці, міокарді, а також у скелетних м'язах. Підвищення рівня холестерину сироватки крові, на нашу думку, зумовлене холестазом, а також структурними змінами у нирках. Збільшення рівню лужної фосфатази – ураженням печінки.

Основними продуктами метаболізму азотистих сполук у птахів є сечова кислота та урати. У процесі проведеного нами дослідження виявлено достовірне зростання рівня сечової кислоти сироватки крові, що виникло унаслідок ураження нирок та печінки, а також зниженням споживання води, що відзначали під час клінічного перебігу хвороби.

Зміни гематологічних показників були менш вираженими і характеризувались тромбоцитопенією, незначним зростанням кількості юних та паличкоядерних гетерофілів у порівнянні з контролем (табл. 2).

Результати та їх обговорення

Клінічно у хворих індиків на початкових етапах захворювання реєстрували блідість слизових оболонок, пригнічення, птахи сиділи опутивши крила, не поїдали корм, гірше пили воду, розвивався пронос. Надалі виникали тремор та парези крил (рис. 1). Порушувалась координація рухів. Хворі птахи падали на спину, відзначали плавальні рухи тазовими кінцівками, наростали судоми та спастичні скорочення м'язів кінцівок. З ротової порожнини виділялась рідка слизиста маса. Після приступів збудження та спастичних скорочень м'язів, з'являлась м'язова слабкість. У термінальні періоди хвороби відзначали виражені некоординовані рухи, птахи падали на спину, не могли підвестись, у них реєстрували спазми різних груп м'язів, паралічі, утруднене та часте дихання, що супроводжувалось хрипами, у період агонії розвивався ціаноз шкіри (рис. 2).



Рис. 2. Виражений ціаноз шкіри

Під час зовнішнього огляду трупів індиків виявили виражену гостру застійну гіперемію шкіри, що була найбільш вираженою в ділянці шиї та вола, підгрудка та крил. Унаслідок цього шкіра забарвлювалась у темно-вишневий колір з ціанотичним відтінком. За гістологічного дослідження виявили різке розширення переважно венозних судин шкіри, периваскулярні набряки.

У ротовій порожнині виявляли незначну кількість кормів та слизу. Вола було помірно наповнене кормами. У м'язовому шлунку локалізувалась незначна кількість кормових мас. Слизова оболонка залозистого шлунка була дещо набухла, почервоніла, покрита надмірною кількістю слизу світло-сірого кольору.

Печінка була збільшена, дрябкої консистенції, неоднорідно забарвлена у коричнево-червоний колір, з незначним жовтуватим відтінком, з поверхні розрізу стікала венозна кров. Відзначали значне розширення та переповнення жовчного міхура жовчю. За гістологічного дослідження печінки виявили переповнення міжчасточкових вен та внутрідолькових капілярів синусоїдного типу кров'ю, дистрофічні (вакуольну, а подекуди жирову дегенерацію) та некротичні зміни гепатоцитів. У стромі збільшувалась кількість макрофагів та лімфоцитів.

За дослідження серця встановили помірне розширення і переповнення кров'ю правого передсердя та шлуночка, незначне потоншення їх стінки. Міокард

був нерівномірно забарвлений у червоно-сірий колір, ендокард – гладкий та блискучий. Гістологічного відзначали втарту посмугованості цитоплазми кардіоміоцитів. Окремі кардіоміоцити зазнавали некротич-

них змін. Судини міокарду були розширені, переповнені еритроцитами. Відзначали розвиток периваскулярних набряків.

Таблиця 1

Біохімічні показники сироватки крові індиків за отруєння діазиноном

Показник	Контроль	Дослід
Гемоглобін, г/л	97,18 ± 0,98	94,48 ± 0,66
Глюкоза, ммоль/л	14,15 ± 0,02	6,12 ± 0,37***
Холестерин, ммоль/л	3,76 ± 0,22	5,74 ± 0,20***
Сечовина, ммоль/л	0,63 ± 0,10	1,36 ± 0,10***
Сечова кислота, ммоль/л	0,29 ± 0,017	3,21 ± 0,19***
АсАТ, ммоль/год/л	1,05 ± 0,61	3,67 ± 0,16***
Лужна фосфатаза, ммоль/год/л	5,52 ± 0,24	6,54 ± 0,29*
Ацетилхолінестераза, мкг/мл/год	204,22 ± 0,56	29,67 ± 0,50***

Таблиця 2

Гематологічні показники крові індиків за отруєння діазиноном, M ± m, n = 5

Показник	Контроль	Дослід
Еритроцити, Г/л	3,07 ± 0,07	2,88 ± 0,05
Тромбоцити, Т/л	37,92 ± 0,46	29,26 ± 0,53***
Лейкоцити, Т/л	31,09 ± 0,46	32,87 ± 0,67
Базофіли	2,62 ± 0,24	3,22 ± 0,12
Еозинофіли	3,41 ± 0,22	4,01 ± 0,15
М	-	-
Лейкограма, %	Ю	1,02 ± 0,10*
Гетерофіли	П	2,41 ± 0,13*
	С	15,07 ± 0,27
Лімфоцити	71,55 ± 0,34	70,91 ± 0,71
Моноцити	3,11 ± 0,3	3,36 ± 0,32

Легені були неспавші, неоднорідно забарвлені: траплялись ділянки світло-рожевого та рожево-червоного кольору. З поверхні розрізу легень стікала венозна кров. Ділянки рожево-червоного кольору занурено плавали у воді. За гістологічного дослідження легень виявили різке розширення венозних та артеріальних судин, переповнення їх кров'ю (рис. 3). Розвивались периваскулярні набряки. У бронхах нагромаджувалась надмірна кількість слизу, в якому візуалізувались десквамовані епітеліоцити, лімфоцити.

Нирки були дещо збільшені, нерівномірно забарвлені у сіро-жовтий колір з смугами та цятками черво-

ного кольору. Консистенція нирок була неоднорідною, здебільшого пружною, подекуди в'ялою. За гістологічного дослідження спостерігали виражене розширення та переповнення кров'ю венозних судин, а також капілярів перитубулярної сітки. Окрім цього, виявили некротичні зміни епітеліоцитів ниркових каналців (рис. 4), що були найбільш вираженими у проксимальному сегменті нефрона. Досить часто еритроцити у капілярах розташовувались у декілька рядів, склеюювались. Подекуди траплялись периваскулярні набряки та діapedезні крововиливи.

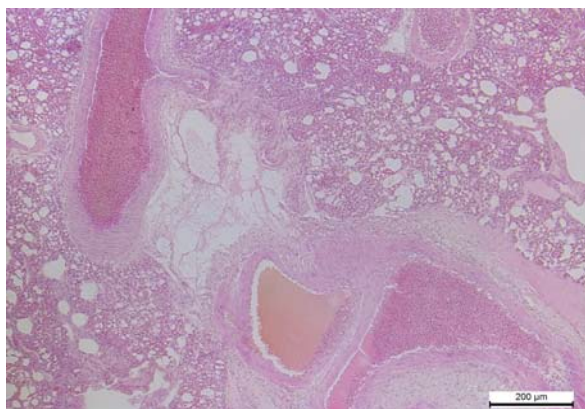


Рис. 3. Виражена гіперемія в судинах легень. Гематоксилін та еозин x 100

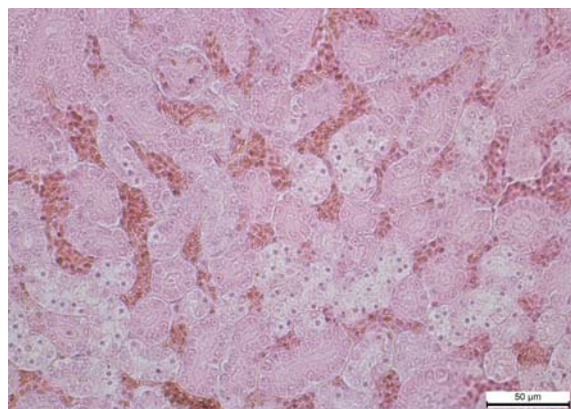


Рис. 4. Некротичні зміни епітелію ниркових каналців. Розширення та переповнення еритроцитами капілярів перитубулярної сітки. Гематоксилін та еозин x 400

За дослідження головного мозку виявили розширення та переповнення кров'ю судин (рис. 5). Досить виражені гістологічні зміни реєстрували у нейронах головного мозку та у судинній системі. Зокрема, спостерігали розширення та переповнення кров'ю вен та артерій середнього та дрібного калібру (рис. 6). Капіляри також були розширені, переповнені еритроцитами, які подекуди розташовувались у декілька рядів,



Рис. 5. Розширення та переповнення кров'ю судин головного мозку

Унаслідок проведення токсикологічного дослідження екстракту з відібраного вмісту вола індиків методом тонкошарової хроматографії на папері з проявленням йодвісмутним реактивом отримано якісну позитивну реакцію щодо сполуки діазинон [О, О-діетил-О-(2-ізопропіл-4-метилпіримідил-6)тіофосфат]. Чутливість реакції 4мкг/см².

Висновки

Під час отруєння діазиноном індиків виявлено зниження активності ацетилхолінестерази, виражену нервову симптоматику, а у термінальні періоди хвороби серцево-судинну недостатність, що супроводжувалась ціанозом шкіри. Також виявлено зміни, що вказують на цитотоксичну дію та порушення обміну сечової кислоти за впливу діазинону. За патологоанатомічного дослідження встановлено розвиток виражених дисциркуляторних змін у вигляді гострої застійної гіперемії, стазів, периваскулярних набряків та крововиливів, а також дистрофічних та некротичних змін кардіоміцитів, гепатоцитів, нефроцитів, нейронів головного мозку тощо.

Перспективи подальших досліджень. Перспективними напрямками подальших досліджень є вивчення патогенезу уражень внутрішніх органів, центральної та периферичної нервової системи птахів за дії діазинону. Також необхідно розробити ефективні методи лікування отруєнь фосфорорганічними пестицидами.

References

Dankovych, R.S., & Tumanov, V.V. (2016). Patomorfologichni zminy za spontannoho otruiennia holubiv diazynonom. Naukovyi visnyk Lvivskoho natsionalnoho universytetu veterynarnoi medytsyny ta

neridko sklejuvalys, sho vказує na rozvytok stazu. Rozvivalsy perivasкулярni nabryaki. Poдекуди візуалізувались діapedезні крововиливи. Цитоплазма окремих нейронів була неоднорідно забарвлена, нерідко містила дрібні вакуолі, що були заповнені просвітленою рідиною. В окремих нервових клітинах розвивались некротичні зміни. Траплялись клітини-тіні.

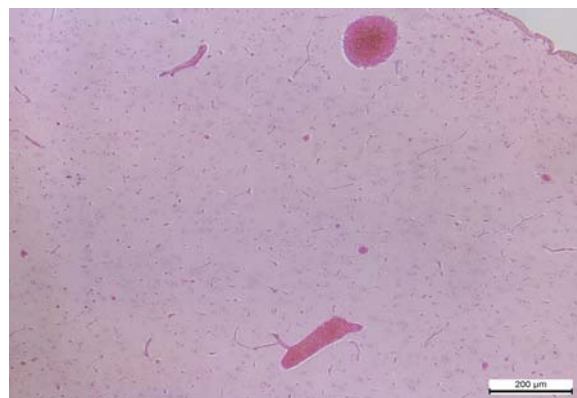


Рис. 6. Гостра застійна гіперемія та стази у судинах головного мозку. Гематоксилін та еозин x 100

biotekhnolohii im. S.Z. Hzytskoho. 18, 3(70), 74–77. doi: 10.15421/nvlvet7017 (in Ukrainian).
 Lemperd, M.D. (1968). Biohimicheskie metody issledovaniya. Kishinev: Karta Moldovenjaskje (in Russian).
 Merkulov, G.A. (1969). Kurs patogistologicheskoy tehniky. L.: Medicina (in Russian).
 Filov, V.A. (1964). Opredelenie jadohimikatov v biologicheskikh substratah. Leningrad, Nauka (in Russian).
 Alam Nur, Md., Chowdhury, Z.A., Hossain Sabir, M., et al. (2015). Detection of Residual Levels and Associated Health Risk of Seven Pesticides in Fresh Eggplant and Tomato Samples from Narayanganj District, Bangladesh. Journal of Chemistry. ID 243574, 7. doi: 10.1155/2015/243574.
 Al-Attar, A.M., Elnaggar, M.H.R., & Almal, E.A. (2017). Protective effect of some plant oils on diazinon induced hepatorenal toxicity in male rats. Saudi Journal of Biological Sciences. 24(6), 1162–1171 doi: 10.1016/j.sjbs.2016.10.013.
 Botha, C., Coetser, H., & Labuschagne, L. (2015). Confirmed organophosphorus and carbamate pesticide poisonings in South African wildlife (2009–2014) Journal of the South African Veterinary Association. 86(1), 1329–1335. doi: 10.4102/jsava.v86i1.1329.
 Cox, C. (2000). Diazinon: toxicology. Journal of pesticide reform. 20(2). 15–21. http://www.wolf.sk/dok/pesticidy/diazinontox.pdf.
 maleki, L., Sadrabadi Haghighi, R., & Bazregar, A.B (2016). The study of environmental impact quotient (EIQ) of pesticides used in wheat and barley farms in Mashhad. Būm/shināsī-i kishāvarzī. 7(1), 109–119. doi: 10.22067/jag.v7i1.48270.
 Majeed, S.K., & Al-Sereah Bahaa, A. (2012). Toxological and pathological study of diazinon on male wild pigeon (Columba livia gaddi) in Basrah City. Bas.J.Vet.Res. 11(1), 270–282.

- <https://www.iasj.net/iasj?func=fulltext&aId=54854>.
- Mulish, M., & Welsh, U. (2010). Romeis. Mikroskopische technic. Heidelberg. 127–154.
- Nozdrenko, D., Korchinska, L., & Soroka, V. (2015). Activity of Ca(2+),Mg(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum and contraction strength of the frog skeletal muscles under the effect of organophosphorus insecticides. Ukrainian Biochemical Journal. 87(4), 63–69. doi: 10.15407/ubj87.04.063.
- Proskocil, B.J., Bruun, D.A., Thompson, C.M., Fryer, A.D., & Lein, P.J. (2010). Organophosphorus pesticides decrease M2 muscarinic receptor function in guinea pig airway nerves via indirect mechanisms. PLoS ONE. 5(5), e10562. doi: 10.1371/journal.pone.0010562.
- Rady, M. (2009). Effects of exposure to Diazinon on the lung and small intestine of Guinea pig, histological and some histochemical changes. Brazilian Archives of Biology and Technology. 52(2), 317–326. doi: 10.1590/S1516-89132009000200008.
- Tongo, I., Ezemonye, L., & Ochei, U. (2012). Diazinon mediated biochemical changes in the African toad (*Bufo regularis*). Journal of Xenobiotics. 2(1), e4-e4. doi: 10.4081/xeno.2012.e4.