

**TITLU: Studii Imunohistochimice si de Biologie Moleculara privind Toxicitatea Ochratoxinelor si Aflatoxinelor la Pasari**

Acronim **OCRABIOMOL**

**Director**

**Conf. dr Carmen SOLCAN**

**Sinteza Faza 2**

**Studiul histochimic a reactivitatii tesutului limfoid la puii de gaina sub influenta ochratoxinei A**

Ochratoxinele sunt metaboliți secundari ai unor muceți din genul *Aspergillus* și *Penicillium* care au efectul nefrototoxic, hepatotoxic și imunotoxic.

S-a evidențiat efectul imunosupresiv al OTA, asupra țesutului limfoid asociat mucoasei digestive, pielii, bursei Fabricius și timusului la puii de găină din prima zi postecozional până la 21 de zile

Investigațiile s-au efectuat pe 60 pui broileri, de găină, grupați randomizat în patru loturi: 3 experimentale: E1, E2, E3 și martor (M). Loturile experimentale au primit ochratoxina A, pe cale orală, sub formă de suspensie în ulei vegetal, zilnic, timp de 21 zile, în doze de: 5μg /Kg LE1, 30μg /Kg LE2, 200μg /Kg LE3. Lotul martor a primit doar ulei vegetal. Toate loturile au primit aceeași hrană comercială și apă *ad libitum*, fiind întreținute în condiții de mediu identice. S-au sacrificat câte 5 pui din fiecare lot la vârstele de: 7, 14 și 21 zile și s-au recoltat pentru examen histologic: piele, duoden, jejun, amigdale cecale, saci cecali, bursă Fabricius și timus. Piesele au fost fixate în formaldehidă 10%, impregnate cu parafină, secționare la 5μm, colorate prin metodele: HEA, PAS, Alabastru Alcian PAS, May Grunwald Giemsa, montate și examinate la microscopul optic.

Au fost recoltate fragmente de piele din zona capului, sternului, aripilor și coccigienă. S-au remarcat limfocite, heterofile, macrofage în număr foarte mic, altele absente. Modificările pielii, indiferent de zonă, au fost remarcate la puii din LE2 și LE3 la vârsta de 7 zile. Acestea au constat în edem al dermului, capilare ectaziate pline cu eritrocite, elemente figurate extravazate (fig. 1, 2).

La 2 pui din LE3, în vârstă de 14 zile, s-a remarcat epiderma denudată, foliculi plumiferi degenerați, hemoragii în derm și numeroase fibre conjunctive orientate (fig.3). La ceilalți pui, în derm se pot observa capilare multe, ectaziate, înconjurate de epiteliu cubic simplu (fig. 4). Pielea din celelate zone prezintă edem la nivelul dermului și fibre conjunctive rare (fig. 5).

Modificări apar și la **pielea din zona sternului la puii de 21 zile** din LE1. Epiderma este normală, în derm se pot observa rare limfocite, capilare în număr mare, ectaziate, pline cu elemente figurate (fig.6). Hemoragii în derm se evidențiază la puii din LE3, în zona aripei (fig.7). În zona coccigienă epiderma este subțire, dermul este format din țesut conjunctiv bogat în fibre, capilarele sunt ectaziate pline cu elemente figurate, iar în jurul lor se poate observa edem (fig.8).

**Duodenul** puilor din lotul martor în vârstă de 7 zile, prezintă o mucoasă formată din vilozități lungi și cripte duodenale scurte. La puii în vârstă de 7 zile, din LE3, apar modificări ale mucoasei caracterizate prin ruperea joncțiunilor intercelulare, degenerarea membranei bazale și uneori a enterocitelor, picături de lipide în lamina propria, numeroase eritrocite intracapilare și extravazate (Fig. 9, 10). Criptele din lamina propria prezintă celule tinere, imature, cu nucleul

bogat în eucromatină, cu 3-4 nucleoli, care vor înlocui epiteliul degenerat (fig. 11). Aceste celule imature pot fi observate și în lamina propria a mucoasei, atât interglandular cât în axul vilozităților intestinale. Epiteliul prismatic cu platou striat este format din enterocite, cu nucleu mărit în volum, ovalar-alungit, bogat în eucromatină, cu 3-4 nucleoli și numeroase celule caliciforme. Modificările mucoasei duodenului la puii de 7 zile din LE3 au fost constatate și la LE2 și LE3 la toate categoriile de vârstă. Pe măsura avansării în vârstă cresc picăturile de lipidele din axul vilozităților și proporția enterocitelor degenerate iar epiteliul prismatic cu platou striat este înlocuit de un epiteliu stratificat, format din celule imature.

**Jejunul** mai ales la LE2 și LE3, la puii în vârstă de 7, 14, 21 zile, prezintă modificările menționate la duoden

**Amigdalele cecale** la puii din lotul martor în vârstă de 7 zile, prezintă mucoasa pliată, cu vilozități lungi care alternează cu unele mai scurte. Vilozitățile intestinale au un ax de țesut conjunctiv în care se pot observa celule conjunctive, rare limfocite, macrofage. În lamina propria a mucoasei se evidențiază cripte scurte. Puii din LE1 și LE2, la vârsta de 7 zile, nu prezintă modificări comparativ cu lotul martor. Amigdalele cecale la LE3, de 7 zile, au lumen larg, populația limfoidă redusă, celulele epiteliale se deplasează spre vârful vilozităților intestinale, de unde se exfoliază în număr mare. În axul vilozităților se pot observa heterofile, rare eozinofile, limfocite, macrofage (fig.12). Alături de enterocite apar multe celule caliciforme. Celulele care se exfoliază vor fi înlocuite de celule imature, rotund ovalare care se formează în criptele din lamina propria.

Amigdalele cecale la puii din LE2, în vârstă de 14 zile au lamina propria populată cu limfocite mici, dispuse difuz. O parte din limfocite au modificări nucleare, caracterizate prin cariorexă, cariolidă, altele prezintă modificări caracteristice apoptozei (fig.13).

În aglomerările limfoide apar și celule cu nucleul bogat în eucromatină, cu 4-5 nucleoli (fig.14). Aceste celule imature sunt asemănătoare celor observate în intestin. Aglomerările limfoepiteliale sunt acoperite de epiteliu prismatic simplu cu platou striat. Criptele din lamina propria sunt lungi și rare, dispuse printe aglomerările limfoide.

**În sacii cecali** modificările țesutului limfoid asociat mucoasei au fost semnalate la puii din LE3 începând de la vârsta de 7 zile, iar la LE2 la 14 și 21 zile. Țesutul limfoid la 7 zile la LE3, este difuz, în lamina propria a mucoasei. Limfocite observate sunt unele imature, mature și cu modificări apoptotice. Criptele din lamina propria prezintă un număr mare de celule imature, așezate stratificat. Aceleași modificări apar și la puii de 14 și 21 zile din LE2 și LE3.

Frecvența redusă a limfocitelor din intestinul puilor din loturile experimentale în primele două săptămâni posteclozional poate fi motivată de modificările fiziologice ale intestinului asociate cu efectul imunosupresiv al OTA. Maturarea funcțională a LT și a LB se face în timpul primelor două săptămâni posteclozional. Aceste modificări par a fi consecința colonizării intestinului cu floră microbiană la pui. În timpul primelor 4 săptămâni se observă importante modificări în proporția diferitelor subseturi de limfocite din intestin (5, 10).

Multe toxine, printre care și OTA, cauzează distrugerea membranelor celulare din intestin și din celelalte segmente ale tubului digestiv, prin formarea de radicali liberi care cauzează peroxidarea lipidelor membranare. Acumularea lipidelor se face atât intraepitelial cât și în lamina propria. Permeabilitatea celulelor este mare, se produce perturbarea funcției platoului striat care conduce la moartea celulelor afectate. În epiteliul prismatic cu platou striat la puii din loturile experimentale se pot observa enterocite degenerate. În anumite circumstanțe radicalii liberi existenți nu sunt eliberați și incită lipidele existente local determinând peroxidarea lipidelor. Peroxidarea conduce la formarea de aldehide și radicali liberi adiționali și determină distrugerea ADN, enzimelor și proteinelor structurale.(10, 11). G. Kamp (11) demonstrează ca OA induce prin stresul oxidativ degenerarea ADN, citotoxicitatea și apoptoza unei linii celulare din rinichi (V79, CV1) de la mamifere. Diferențele de proporție LT immature și mature sugerează ca OA întârzie diferențierea LT (22). Tratamentul cu OA supresează funcția imuna, reducând numărul subpopulațiilor de limfocite în organele limfoide (23).

Micotoxinele la nivel intestinal afectează bariera funcțională a acestuia prin reducerea integrității epitelului intestinal, datorită modificării proteinelor de la nivelul joncțiunilor închise. Apoptoza, creșterea colonizării cu agenți patogeni, stresul oxidativ și citotoxicitatea, inhibarea sintezei proteinelor și peroxidarea lipidelor sunt atribuite efectului micotoxinelor la nivelul epitelului intestinal (8).

Celulele epiteliale tinere sunt produse în criptele mucoasei intestinale și migrează în lungul vilozităților în locul celor exfoliate. În timpul infecției acest proces metabolic poate fi sporit, pentru a proteja lamina propria și a înlocui celulele infectate sau distruse. Această multiplicare a celulelor din cripte poate fi observată și la puii intoxicați cu ochratoxina A. Celulele imature destinate înlocuirii epitelului distrus sunt în număr mare și la nivelul vilozităților, mai ales spre apex.

La pui imunosupresia digestivă cauzată de micotoxine ca ochratoxina A, aflatoxina B1, T2, tricotecene cauzează în funcție de doza necroză, depleția limfocitelor tisulare din tractusul digestiv. Deși se produce repopularea cu limfocite, țesuturi cum ar fi tonsilele cecale pot avea o depleție permanentă a limfocitelor difuze din lamina propria. Acest lucru a fost semnalat și la puii intoxicați cu Ochtratoxina A. Efectul imunosupresor al Ochtratoxinei A a crescut susceptibilitatea puilor la coccidiază atât la E. acervulina cât și la E. Tenella. Ochtratoxina A crește fragilitatea intestinală a puilor probabil prin reducerea sintezei colagenului. (10). Creșterea fragilității intestinale se datorează și creșterii conținutului total de lipide la o doză de 8μg/kg corp de ochratoxină A. Creșterea lipidelor și scăderea colagenului (care are structura primară proteică) este vizibilă la examenul microscopic.

Modificările degenerative ale bursei lui Fabricius la puii tratați cu 4ppmOA, până la atrofie determină reducerea populării mucoaselor cu limfocite. Puii hrăniți cu 0,5 ppm sau 2 ppm /kg furaj de OA au înregistrat o scădere a LT din numărul total al limfocitelor. Scăderea numărului de celule T s-ar putea datora eliberării în număr redus a acestora din timus (18). Se produce astfel o scădere a răspunsului imun celular și umoral la păsări ca urmare a administrării ochratoxinei A, păsările fiind astfel susceptibile bolilor bacteriene, virale și parazitare (6, 19, 20, 21).

Doerr (citată de 7) descrie coagulopatie asociată cu ochratoxina A care poate fi foarte severă. Modificările biochimice ale factorilor de coagulare V, VII, X, a protrombinei, tromboplastinei și fibrinogenului au fost constatate în timpul ochratoxicozei A. Fibrinogenemia este asociată cu ochratoxina A. Hemoragiile din derm pot fi datorate acestei acestor modificări (6).

**Bursa lui Fabricius** la puii în vârstă de 7 zile din LE1 se caracterizează prin scăderea limfocitelor din zona centrală a foliculilor (depleție limfoidă). Nucleii limfocitelor prezintă modificări nucleare reprezentate de: picnoză, cariorexa, indicatori ai morții celulare. Aceste modificări apar la 20% din foliculii limfoizi.

În bursa Fabricius la puii de 7 zile din LE2 se evidențiază edem perifolicular la jumătate din pliurile mucoasei, limfonoduli reduși în dimensiune comparativ cu cei de la LM, depleție limfoidă severă la 50% din foliculi (fig. 18), modificări semnalate și de alți autori (7, 14, 19).

La puii din LE3 bursa Fabricius prezintă modificări evidente la 75% din foliculi. Perifolicular se evidențiază edem, iar la unii foliculi în acest spațiu apare proliferare conjunctivă, epitelizarea tuturor foliculilor și cavități mici chistice în stroma reticulară. Ca și la loturile experimentale anterioare, zona corticală este redusă la 1-2 rânduri de limfocite iar în medulară apare depleție limfoidă. Epiteliul asociat foliculilor este cubic. În medulară sunt prezente histiocite ce conțin resturi celulare, indicator al activității limfocitoclastice (14) (fig 19, 20 ).

Bursa lui Fabricius la puii în vârstă de 14 zile din LE1 se caracterizează de asemenea prin depleție limfoidă. Nucleii limfocitelor prezintă modificări reprezentate de picnoză, cariorexa, indicatori ai morții celulare. Aceste modificări nu apar la toți foliculii limfoizi.

În bursa Fabricius la puii de 14 zile din LE2, se evidențiază edem perifolicular la jumătate din pliurile mucoasei, limfonoduli reduși în dimensiuni comparativ cu cei de la LM, depleție limfoidă severă, la 50% din foliculi, modificări asemănătoare celor constatate de alți autori (7, 11).

La puii din LE3 bursa Fabricius prezintă modificări evidente, caracterizate prin edem perifolicular. La unii foliculi în acest spațiu apare proliferare conjunctivă, însoțită de cavități mici chistice în stroma reticulară, pline cu secreție PAS pozitivă, leziuni asemănătoare celor semnalate și de alți autori (14). Zona corticală este redusă la 1-2 rânduri de limfocite iar în medulară apare depleție limfoidă. Epiteliul asociat foliculilor este cubic evident. În medulară sunt prezente histiocite ce conțin resturi celulare, indicator al activității limfocitoclastice (14) (fig. 21, 22, 23).

La puii în vârstă de 21 zile din LE1 bursa lui Fabricius se caracterizează prin scăderea limfocitelor din zona centrală a foliculilor. Nucleii limfocitelor prezintă modificări reprezentate de picnoză și cariorexa. Aceste modificări apar la majoritatea foliculilor limfoizi.

În bursa Fabricius la puii de 21 zile din LE2 se evidențiază edem perifolicular, limfonoduli reduși în dimensiuni comparativ cu cei de la LM, depleție limfoidă severă modificări asemănătoare celor descrise de Perozo Marin și col. (14).

La puii din LE3 bursa Fabricius prezintă modificări evidente. Perifolicular se evidențiază edem și proliferare a țesutului conjunctiv, epitelizarea tuturor foliculilor și mici cavități chistice în stroma reticulară. Zona corticală dispăre, în medulară apare depleție limfoidă, iar epiteliul asociat foliculilor este situat la periferia acestora. În medulară sunt prezente histiocite ce conțin resturi celulare, indicator al activității limfocitoclastice (13) (fig. 24, 25, 26, 27). Epiteliul mucosei este stratificat cu secreție PAS pozitivă. Leziuni asemănătoare sunt semnalate și de alți autori (2, 14)

Dintre cele trei tipuri de ochratoxine A, B, C, ochratoxina A este cea mai toxică (1,4, 19). Diferențe de toxicitate apar în funcție de specie, sex, doză și durata expunerii. OTA are un efect dăunător asupra puilor chiar și în concentrație mică. Doza letală medie este de 5,9-16,5mg/kg greutate corporală la curci și prepelițe japoneze și de 0,5-2-4mg/kg greutate corporală la puii de găină (1).

O singură doză de 0,04mg/kg greutate vie administrată intraperitoneal, determină în primele 3 ore după administrare o scădere semnificativă a limfocitelor circulante mai ales a limfocitelor T helper circulante, ca urmare a efectului citotoxic (15). Dozele mai mari de 2mg/kg determină reducerea greutății relative a bursei Fabricius. Descreșterea relativă a organelor limfoide la păsările care au primit în dietă OTA poate fi atribuită efectului limfocitoclastic. O leziune biochimică indusă de OTA este peroxidarea lipidelor. Toxicitatea ochratoxinelor se exercită prin perturbarea homeostaziei calciului, procese de peroxidare a lipidelor și inhibiția respirației mitocondriale și a ARNt sintetazei. Este posibil ca ochratoxina să nu inhibe direct fenilalanil ARNt sintetaza ci prin competiție cu fenilalanina din structura ochratoxinei A. OTA inhibă probabil Aminoacyl ARNt în mod indirect prin inhibarea producerii ATP în mitocondrii. ATP este necesar activării aminoacizilor (1, 7)

OTA determină atrofia bursei Fabricius. Pe de altă parte se produce proliferarea țesutului conjunctiv perifolicular, scăderea limfocitelor din zona centrală a foliculilor (depleție limfoidă), prezența unui număr mare de histiocite ce conțin resturi celulare, indicator al activității limfocitoclastice pronunțate (13). Nucleii limfocitelor prezintă modificări reprezentate de picnoză, cariorexa, indicatori ai morții celulare (18).

Greutatea bursei Fabricius descrește semnificativ la 2ppm OTA, de asemenea scade cu 50% digestibilitatea proteinelor și se produce o modificare semnificativă a organelor vitale. OTA începând de la 0,05ppm descrește semnificativ greutatea vie a puilor tineri, posteclozional (7).

În bursă se mai poate observa depleție limfoidă severă la 50% din foliculi, epitelizarea tuturor foliculilor și cavități chistice în stroma reticulară (14).

**Timusul** puilor din LE1 la vârsta de 7 zile, prezintă corticala cu dimensiuni apropiate de a LM. Zona medulară are un număr mare de celule reticulare care sunt așezate sub formă de aglomerări și puține limfocite mature. La puii din LE2, în timus apar grupuri de celule reticulare și în zona corticală. Celulele din zona corticală au nucleii colorați mai deschiși și sunt neuniforme ca diametru. În zona medulară alături de celulele reticulare numeroase apar și zone de necroză. Limfocitele mature din această zonă sunt foarte reduse numeric (fig. 27, 28, 29).

Timusul puilor din LE3 prezintă o corticală neuniformă ca diametru, dar mai redusă decât la lotul martor și nucleii celulelor colorați mai deschiși decât la LE2. Printre limfocitele din zona corticală apar celule reticulare grupate, asemănătoare corpusculilor Hassal. În zona corticală, dar și la limita zonei corticale cu medulara apar mici zone hemoragice. În zona medulară predomină celulele reticulare grupate care alternează cu mici zone de necroză.

Elementele de noutate în această lucrare sunt modificările histologice observate în timus după 7 zile de administrare a OTA mai ales la LE2 și LE3. Aceste modificări sunt menționate în literatură după 14 zile de tratament (2, 13, 16, 20).

Timusul puilor în vârstă de 14 zile din LE1, prezintă corticala cu dimensiuni apropiate de a celor din LM. Medulara este modificată, fiind ocupată de un număr mare de celule reticulate, dispuse sub forma unor aglomerări. Alături de aceste celule se observă și zone mici de necroză. Numărul limfocitelor din această zonă este foarte mic. La puii din LE2, corticala și medulara timusului au dimensiuni variabile, iar zona de demarcație are un aspect ondulat. În zona corticală apar celule reticulare aglomerate (fig. 30, 31, 32). În centrul acestor aglomerări se evidențiază și spații mici de necroză. În zona medulară predomină celulele reticulare, se pot observa mici hemoragii și un număr foarte mic de limfocite mature. Zona medulară ocupă cea mai mare parte a lobulului timic.

Timusul puilor din LE3 prezintă zona corticală redusă și arii multifocale de hemoragii, atât în corticală cât și în medulară. Zona medulară deși ocupă cea mai mare parte a lobulului timic, are un număr foarte mic de limfocite, restul fiind ocupat de celule reticulare. În centrul aglomerării de celule reticulare se pot observa zone de necroză (fig. 33, 34, 35). Rezultate asemănătoare sunt menționate de diverși autori ((2, 13, 16, 20).

La 21 zile, timusul puilor din LE1 are corticala redusă, iar medulara este ocupată de celule reticulare și mici zone de necroză. Timusul puilor din LE2 are o zonă corticală redusă, care se întrepătrunde cu medulara. Zona medulară este ocupată de aglomerări de celule reticulare, zone de necroză și mici hemoragii. Timusul puilor din LE3 este caracterizat printr-o corticală foarte subțire, la nivelul căreia pătrund aglomerările de celule reticulare din zona medulară. Aglomerările de celule reticulare prezintă zone de necroză centrală (care sunt probabil corpusculi Hassal degenerați) și arii multifocale de hemoragii în lobulul timic. Nucleii limfocitelor sunt colorați deschiși. Histiocitele din zona medulară au resturi celulare intracitoplasmice, semn al limfocitoclaziei din zona medulară a lobulului timic. Modificările histologice descrise au fost observate și menționate și în literatură după 2 săptămâni de administrare a OTA (13).

Deoarece timusul are un rol important în imunitatea mediată celular, aceasta este scăzută în timpul ochratoxicozei. Supresia imunității celulare și umorale prin OTA reduce răspunsul imun la puii vaccinați împotriva bolii Newcastle cu tulpina B1 (19, 20) sau La Sota (17) și permite dezvoltarea infecțiilor bacteriene secundare (13).

OTA are efect citotoxic direct prin necroză, sau prin inducerea apoptozei. Ambele produc o reducere a numărului de celule producătoare de anticorpi și o scădere a imunoglobulinelor serice. OTA inhibă sinteza proteică, diviziunea celulară și regenerarea țesutului limfoid degenerat. Creșterea citokinelor proapoptotice TNF $\alpha$  și IL6 poate determina depleția limfocitelor (16).

Activitatea immunosupresoare a OTA determină o creștere a susceptibilității păsărilor la infecțiile virale, bacteriene și parazitare (7, 12).

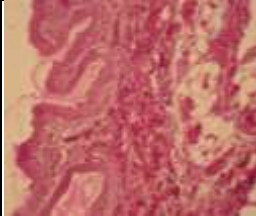
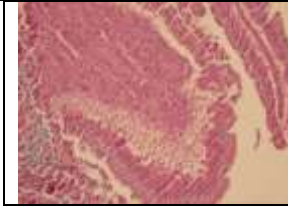


OTA administrată în dietă în concentrație de 400 și 800ppb determină o reducere a consumului de furaje și a greutateii corporale. Modificările histologice ale organelor imune au fost mult mai severe la puii care au primit OTA în dietă urmată de infecția experimentală cu *E.coli* O78, comparativ cu alți antigeni (7). La doza de 400 și 800ppb în furaj se observă o reducere semnificativă a timusului, a hranei consumate, a ratei de conversie a hranei, a concentrației de tiroxină. De asemenea s-a înregistrat o scădere semnificativă a leucocitelor, a răspunsului imun mediat umoral și celular (7).

Rezultate similare au fost semnalate după administrarea OTA la puii Plymouth Roch liberi de germeni de la 1 la 6ppm (20), sau la broiler în doze de 2 și 4ppm (7, 13). Reducerea

timusului se realizează și la doze mai mici: 130, 305, 790 ppb (19). Toate aceste doze scad semnificativ greutatea relativă a timusului, induc depleția limfocitelor, cauzând modificări histologice ale puilor expuși la aceste toxine timp de 70 zile. Reducerea numărului de leucocite și a greutății timusului determină alterarea funcției imunitare de tip celular.

Are loc și regresia altor organe limfoide: Bursa Fabricius, splina, precum și a altor organe ce produc imunoglobuline. Histopatologic se relevă modificări în centrul germinativ al timusului, splinei și de aici explicația plauzibilă pentru inducerea limfocitopeniei de către OTA (19, 20).

De aceea O'Brien și Dietrich (16) atribuie OTA scăderea imunității prin reducerea proliferării, activării și diferențierii limfocitelor. Se știe ca OTA induce o creștere a greutății la organele care iau parte la detoxifierea sau eliminarea acesteia (rinichi și ficat) precum și o scădere a greutății organelor limfoide și a greutății corporale.

|   |   |   |  |
|---|---|---|--|
|  |    |    |    |
| Fig.1.Piele din regiunea aripii. Hemoragii in derm.Col PAS x100                   | Fig.8.Duoden la pui în vârstă de 14 zile din LE2. Enterocite degenerate, picături de lipide în lamina propria, numeroase eritrocite intracapilare și extravazate Col.PAS-Albastru Alcian x100 | Fig. 21. Bursa Fabricius la pui în vârstă de 21 zile, LE3. Epiteliul mucoasei stratificat, corticala foliculilor bursali absentă, depleție limfoidă severă. Col PAS x60 | Fig.35 Timusul la puii în vârstă de 21 zile din LE3. Zona corticală cu diametru diferit. Hemoragii focale în medulară. Col. M.G.Giemsa x100. |

## Concluzii

1. Ochratoxina A produce modificări ale țesutului limfoid din amigdalele și sacii cecali la puii în vârstă de 7 zile din LE3. Modificări similare se constată și la puii din LE2 și LE3 la vârstele de 14 și 21 zile.

2. Țesutul limfoid asociat mucoasei digestive constă în depleție limfoidă, apoptoză și necroza limfocitelor și absența limfonodulilor.

3. Epiteliul criptelor intestinale este stratificat format din celule imature care inlocuiesc epiteliul intestinal afectat de acțiunea OA. Epiteliul intestinal, parțial, devine stratificat format din celule imature.

4. La nivelul dermului la puii din LE2, LE3, la 14 și 21 zile apar hemoragii. Limfocitele apar în număr redus.

5.Ochratoxina A produce modificări leziuni ale bursei Fabricius în funcție de doza administrată și perioada expunerii.

6. Doza de 5 μg/kg greutate vie produce edem perifolicular și depleție limfoidă, la puii în vârstă de 14 zile și 21 zile.

7. Bursa Fabricius suferă modificări mai severe la doza de 35 μg/Kg greutate vie, la 14 și 21 zile. Acestea constau în scăderea limfocitelor din zona corticală și medulară a foliculilor (depleție limfoidă), prezența unui număr mare de histiocite ce conțin resturi celulare, indicator al activității limfocitoclastice pronunțate.

8. Doza de 100 µg/Kg greutate vie determină în plus comparativ cu LE2 atrofia bursei Fabricius, dispariția zonei corticale, o proliferare a celulelor reticulare în zona corticală, chiști intraepiteliali și intrafoliculari.

9. Timusul puilor din lotul E1, intoxicați cu 5µg OTA/kg corp la 7 și 14 zile după intoxicație prezintă medulara modificată, ocupată de un număr mare de celule reticulate, dispuse sub forma unor grămezi și zone mici de necroză. La 21 zile, corticala este redusă, iar medulara ocupată de celule reticulare și mici zone de necroză.

10. La puii din lotul E2, tratat cu 35µg OTA/kg corp, corticala și medulara timusului, au dimensiuni variabile iar zona de demarcație are un aspect ondulat. Zona medulară ocupă cea mai mare parte a lobulului timic fiind formată din aglomerări de celule reticulare, zone de necroză și mici hemoragii. În zona corticală apar celule reticulare aglomerate, cu mici zone de necroză.

11. Timusul puilor din LE3, tratat cu 35µg OTA/kg corp este caracterizat printr-o corticală foarte subțire, la nivelul căreia pătrund aglomerările de celule reticulare din zona medulară. Aglomerările de celule reticulare prezintă zone de necroză centrală, care sunt probabil corpusculi Hassal degenerați, precum și arii multifocale de hemoragii în lobulul timic. Histiocitele din zona medulară au resturi celulare intracitoplasmatică, semn al limfocitoclaziei din zona medulară a lobulului timic.

## BIBLIOGRAFIE

1. **Al-Anati, L., Petzinger, E.**, 2006, *Immunotoxic activity of ochratoxin*, J. Vet. Pharmacol. Therap. 29, 79–90
2. **Bennett, J.W., Klich, M.**, 2003, *Mycotoxins*. Clinical Microbiology Reviews, 16, 497–516.
3. **Bozzo G., Ceci E., Bonerba E., Desantis S., TantilloBozzo G.**, 2008, *Ochratoxin A in Laying Hens: High-Performance Liquid Chromatography Detection and Cytological and Histological Analysis of Target Tissues*. J. Appl. Poult. Res., 17, 151-156
4. **Coman I., Popescu O.**, 1985, *Micotoxine și micotxicoze*. Ed. Ceres București.
5. **Davison F., B. Kaspers, K. A. Schat**, Avian Immunology- Elsevier, 2008
6. **Dwivedi, P., Burns R. B.**, 1985, *Immunosuppressive effects of ochratoxine A in young turkeys*. Avian Pathology, 14, 213-225
7. **Elaroussi M.A., Mohamed F.R., Barkouky E.M., Atta A.M.**, 2006, *Experimental ochratoxicosis in broiler chickens*, Avian Pathology, 35(4), 263-269
8. **Grish C.G., T.K. Smith**- Impact of feed –borne mycotoxins on avian cell mediated and humoral immune response. World Mycotoxins Journal, 2008. 5. *Hamilton, P. B., W.E. Huff, J.R. Harris, R.D. Wyatt*- Natural occurrence of ochratoxicosis . Poultry Science, 61, 1832 – 1841, 1982
9. **Harvey R.B., Kubena L.F., Naqi S.A., Gyimah J.E., Corrier D.E., Panigrahy B., Phillips T.D.**, 1987, *Immunologic effects of low levels of ochratoxin A in ovo: Utilization of a chicken embryo model*. Avian Dis., 31, 787–791.
10. **Hoerr F.J.**- Pathogenesis of enteric diseases, Poultry Science, 77: 1150-1155, 1998
11. **Kamp H.G., Eisenbrand G., Schlatter J., Wurth K., Janzowski, C.**, 2005, *Ochratoxin A: induction of (oxidative) DNA damage, cytotoxicity and apoptosis in mammalian cell lines and primary cells*. Toxicology, 206, 413–425.
12. **Kozaczynski, W.**, 1994, *Experimental ochratoxicosis A in chickens. Histopathological and histochemical study*. Arch. Vet. Pol., 34, 205–210
13. **Kumar, A., Jindal, N., Shukla, C.L., Asrani, R.K., Ledoux, D.R., Rottinghaus, G.E.**, 2004, *Pathological changes in broiler chickens fed ochratoxin A and inoculated with Escherichia coli*. Avian Pathology, 33, 413–417.
14. **Perozo Marín F., Rivera IS., Finol G., Mavárez Y.**, 2003, *Aflatoxin B1, Selenium and Saccharomyces cerevisiae in the Immune Response of Broiler Chickens in Zulia State, Venezuela*. Revista Científica, FCV-LUZ, 13, 5, 360-370
15. **Moura M.A., Machado C.H.**, 2004, *Effects of Ochratoxin A on Broiler Leukocytes*. Brazilian Journal of Poultry Science -Revista Brasileira de Ciência Avícola, 6, 3, 187 – 190
16. **O'Brien, E., Dietrich, D. R.**, 2005, *Ochratoxin A: the continuing enigma*. Critical Reviews In Toxicology, 35, 33-60.

- 17. Santin E., Paulillo A.C., Maiorka P.C., Alessi A.C., Krabbe E.L., Maiorka, A., 2002, *The effects of ochratoxin/aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers.* Avian Pathology, 31, 73–79.**
- 18. Singh, G.S., Chauhan, H.V., Jha, G.J., Singh, K.K., 1990, *Immunosuppression due to chronic ochratoxicosis in broiler chicks.* J. Comp. Pathol., 103, 399–410.**
- 19. Stoev S.D., M. Stefanov, S. Denev, B. Radic, A.M. Domijan, M.Peraica, 2004, *Experimental mycotoxicosis in chickens induced by ochratoxin A and penicilic acid and intervention with natural plant extracts.* Vet.Res. Comm., 28: 727-746.**
- 20. Stoev S.D., Anguelov G., Ivanov I., Pavlov D., 2000, *Influence of ochratoxin A and an extract of artichoke on the vaccinal immunity and health in broiler chicks,* Exp. Toxicol. Pathol. 52 43-55.**
- 21. Stoev, S.D., V. Koynarsky, P.G. Mantle, P.G. -Clinicomorphological studies in chicks fed ochratoxin A while simultaneously developing coccidiosis. Veterinary Research Communications, 26, 189–204, 2002.**
- 22. Thuvander, A., A. Breitholty-Emanuelsson, M. Olesen, M.- The effects of ochratoxin A on mouse immune system after subchronic exposure. Food and Chemical Toxicology, 33, 1005–1011, 1995.**
- 23. Thuvander, A., A. Breitholtz-Emanuelsson, D. Brabencova, I. Gadhasson- Prenatal exposure of Balb/c mice to ochratoxin A: effects on the immune system in the offspring. Food and Chemical Toxicology, 34, 547–554, 1996.**
- 24. Verma, J., T.S. Johri, B.K. Swain, S. Ameena- Effect of graded levels of aflatoxin, ochratoxin and their combinations on the performance and immune response in broilers. British Poultry Science, 45, 512–518, 2004.**