

EXPERIMENTAL DIRECT AND INDIRECT PROLONGED OCHRATOXIN A INTOXICATION IN SWINE

OSSERVAZIONI E RILIEVI SULL'INTOSSICAZIONE PROTRATTA, DIRETTA ED INDIRETTA, DA OCRATOSSINA IN SUINI. CONTRIBUTO SPERIMENTALE

Cabassi E.¹, Miduri F.¹, Valente L.², Corradi A.¹, Cantoni A.M.¹, Fusari A.¹, Gregori A.³

PAROLE CHIAVE:

suino, ocratossina A (OTA), linfociti, immunotossicosi, nefropatia.
swine, ochratoxin A (OTA), lymphocytes, immunotoxicosis, nephropathy.

Premesse

Lo stimolo per lo studio di nuove indagini sperimentali per la dimostrazione e per un più preciso inquadramento del potere immunotossico esercitato dalle micotossine sul suino, nasce dalle osservazioni di campo che evidenziano come gli animali esposti a tali tossici siano in realtà più sensibili a diverse malattie intercorrenti e trova suggerimenti da prove concluse in altre specie domestiche (C.A.S.T. Report n°139, Ames, Iowa, 2003).

In siffatto contesto si inserisce il nostro interesse per un ampliamento ed approfondimento di questa tematica, del rapporto eziopatogenetico tra micotossine di varia natura ed insorgenza di disfunzioni nella risposta immunitaria, senza trascurare il comportamento ematoclinico, nonché l'assetto morfostrutturale.

Com'è noto, le micotossine sono molecole tossiche derivanti dal metabolismo secondario di alcuni funghi appartenenti alle specie *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, e possono entrare nella catena alimentare attraverso cereali inquinati, latte, carne, uova ottenuti da animali alimentati con mangimi contaminati. Devegowda G. et al. (1996) riportano che queste tossine sono presenti nel 25% circa del raccolto mondiale di cereali.

Tra le micotossine, le più note e più studiate sono l'aflatossina B1 (AFB1), l'ocratossina A (OTA), la fumonisina B1 (FB1), lo zearalenone (ZEN), il deoxynivalenolo (DON) e la tossina T2. I loro principali effetti tossici riguardano la potenziale attività cancerogena, genotossica, teratogena ed immunosoppressiva. Tuttavia, gli effetti morbosi evidenziati nell'uomo e negli animali domestici si

¹ Dipartimento di Salute Animale - Sezione di Patologia Generale ed Anatomia Patologica Veterinaria, Università degli Studi di Parma

² Consulente Servizio Veterinario di Ateneo per il Controllo del Benessere Animale

³ IZLER, Brescia

possono manifestare, sia come forme patologiche ben definite, quali la sindrome di Reye nell'uomo (riferibile all'AFB1), la leucoencefalomalacia dell'equino e l'edema polmonare del suino (assegnabili alla FB1), l'iperestrogenismo delle scrofette (ascrivibile allo ZEN) e la nefropatia endemica dei Balcani (attribuibile all'OTA), ma ancor più possono apparire come stati di tossicità subacuta o cronica, non sempre clinicamente riconoscibili, capaci, però, di alterare più o meno gravemente la funzionalità dell'organismo e compromettere così le produzioni zoeconomiche (Galvano F. et al., 2001; Piva G. & Pietri A., 2002).

Gli animali domestici mostrano suscettibilità diversa nei confronti delle micotossine a seconda della specie, della dose assunta, della durata dell'esposizione, dell'età, del sesso, dello stato fisiologico in cui si trova l'animale, nonché dell'eventuale sinergismo con altre micotossine contemporaneamente presenti nell'alimento (O'Brien E. et al., 2005).

Nell'ambito delle micotossicosi un ruolo importante rivestono le ocratossine, non solo per l'influenza negativa che possono determinare sulle performances e sul benessere degli animali, ma soprattutto per gli effetti deleteri che possono provocare nell'uomo a seguito del consumo di alimenti contaminati.

Le ocratossine, derivati isocumarinici legati alla L-β-fenilalanina, sono classificate come pentacetidi e sono prodotte principalmente da due specie di miceti, *Penicillium verrucosum* ed *Aspergillus ochraceus* (*A.alutaceus*). In letteratura si segnalano almeno otto forme di ocratossine, che variano per tossicità in base alla costante di dissociazione del gruppo fenolico. Le ocratossine A (OTA) e C (OTC) sono le più tossiche, con costante di dissociazione molto simile, mentre l'ocratossina B (OTB) è circa 10 volte meno tossica dell'OTA. OTA e OTB sono le uniche ocratossine presenti nelle piante. Un'altra tossina prodotta da *Penicillium verrucosum* è la citrinina, che agisce in sinergismo con l'OTA provocando gravi danni renali.

L'OTA è un composto relativamente stabile, poco solubile in acqua, mediamente in blande soluzioni di bicarbonato e molto solubile nei solventi organici (Hollinger K. & Ekperigin H.E., 1999).

La quantità di ocratossine prodotte dalle suddette specie fungine può essere influenzata principalmente da alcuni fattori, quali: la temperatura, il tipo di substrato e la presenza di una flora competitiva. In cereali stoccati è stato individuato che il *range* di temperatura ottimale per la produzione di OTA da parte di *A.ochraceus* è compreso tra 12° e 37°C, e per *P.verrucosum* tra 4° e 31°C; quest'ultimo sembra essere il maggior responsabile della produzione di OTA nei cereali nelle zone a clima più freddo, mentre *A.ochraceus* sembra essere coinvolto nella produzione di OTA nei paesi a clima medio-caldo (Krogh P., 1992).

Il substrato su cui le due specie fungine crescono è di fondamentale importanza per la produzione di ocratossine. In uno studio in vitro, si è dimostrato che i semi di soia e di arachidi costituiscono il substrato ottimale per la produzione di OTA ed OTB da parte di *A.ochraceus.*, mentre l'orzo ed il frumento fungono da miglior substrato per la produzione di OTA e citrinina da parte di *P.verrucosum*; è stato inoltre evidenziato che non esiste un rapporto diretto tra lo sviluppo del micete e la quantità di micotossina prodotta (Madhyastha M.S. et al., 1990)

La presenza di una microflora competitiva all'interno di cereali interferisce

con la produzione di ocratossine da parte di *A.ochraceus*; Chelack W.S. et al. (1991) hanno, infatti, osservato che la produzione di OTA su un substrato sterile di orzo è maggiore rispetto a quella prodotta su analogo substrato non sterilizzato e che il reintegro del microbiota indigeno in questo substrato colturale, determina una graduale diminuzione della produzione della tossina stessa.

L'OTA viene rapidamente assorbita dal tratto gastroenterico di tutti gli animali ad eccezione dei ruminanti, la cui microflora ruminale la idrolizza rapidamente in un metabolita meno tossico (ocratossina- α), prima di essere assorbita (Patterson D.S.P. et al., 1981; Xiao H. et al., 1991a,b). Entrata in circolo, l'OTA si lega all'albumina plasmatica e si distribuisce nei vari tessuti, in concentrazioni decrescenti: polmone, fegato, rene, cuore, tessuto adiposo, intestino, etc. Le concentrazioni più basse di OTA si rinvennero a livello di muscoli, milza e cervello. Il ricircolo entero-epatico ed il forte legame che l'OTA crea con le albumine sono i maggiori responsabili del prolungamento dell'emivita plasmatica della tossina stessa. Inoltre è stato dimostrato che l'OTA può attraversare la placenta ed essere quindi trasferita alla prole nel ratto, nel topo e nel suino; residui della stessa tossina si possono altresì ritrovare nel latte e nelle uova (Hollinger K. & Ekperigin H.E., 1999).

L'azione tossica dell'OTA si esplica su diversi processi enzimatici più o meno congiunti, che riguardano: a) il metabolismo della fenilalanina, quali la fenilalanina-transferasi e fenilalanina-idrossilasi (Dirheimer G. et al., 1991); b) la perossidazione lipidica, con modificazioni della permeabilità di membrana e di conseguenza necrosi cellulare (Creppy E. et al., 1995); c) l'attività mitocondriale, con alterazione nella produzione di ATP; d) il danneggiamento del DNA, dell'RNA e della sintesi proteica di molti organismi viventi (Creppy E. et al., 1986; Meisner H. & Polsinelli L., 1986).

Alcuni AA (Schaaf G.J. et al., 2002; Baldi A. et al., 2004), ritengono che il danno cellulare provocato dall'OTA sia principalmente da ricondursi alla produzione di radicali attivi dell'ossigeno (ROS), unitamente alla sua potenziale capacità di attivare la citocromo p450 (enzima in grado di metabolizzare un gran numero di composti generalmente liposolubili), che stimolano la perossidazione OTA-dipendente dei lipidi e determinano la trasformazione dell'ocratossina A nei suoi metaboliti mutageni.

In rapporto al tempo ed alla modalità di ingestione, l'OTA può causare fenomeni di tossicità acuta in molte specie animali quali suini, pecore, ratti, polli, tacchini e trote.

La tossicità orale acuta, espressa come dose letale LD50 (mg/kg di p.v.), varia da 1 a 6 per il suino, 3,3 per il pollo e 0,2 per il cane (Kuiper-Goodman T. & Scott P.M., 1989); non sono riportati valori di tossicità acuta per i ruminanti, tuttavia è stato evidenziato che dosaggi superiori a 2 mg/kg di OTA sembrano determinare nei vitelli depressione del sensorio, diminuzione del peso corporeo e disidratazione (Marquardt R.R. & Frohlich A.A., 1992). I principali sintomi clinici associati ad una forma acuta di ocratossicosi includono: anoressia, perdita di peso, vomito, tenesmo, proctite, congiuntivite, tonsillite, polidipsia, poliuria, ipertermia, disidratazione, prostrazione e morte dopo circa due settimane dall'assunzione della tossina (Chu F.S., 1974).

Apprezzabili e precoci espressioni di ocratossicosi sembrano essere il decremento ponderale e l'ipofunzionalità renale, fino ad una grave insufficienza conseguente alla progressiva nefrosclerosi. Huff W.E. et al. (1988) ritengono che i livelli sierici delle proteine totali, nonché delle albumine, siano da considerarsi indicatori sensibili per la valutazione dell'ocratossicosi nel pollo. Altri ricercatori hanno dimostrato che la diminuzione dell'attività dell'enzima renale fosfoenolpiruvato carbochinasi (PEPCK) sembra essere il segnale più mirato e specifico per l'identificazione di uno stato di intossicazione da OTA nella specie suina (Krogh P. et al., 1988).

Processi di tossicità cronica, oltre il rene, coinvolgono vari altri organi che possono comportare quadri genotossici, carcinogenetici, teratogenetici o disfunzioni immunitarie. Fenomeni di tossicità cronica da OTA sono stati evidenziati soprattutto nella specie suina. Krogh P. et al. (1974) riportano che dopo 4 mesi di esposizione a vari dosaggi di OTA, suini alimentati con diete contenenti da 200 a 4000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ di tossico, sviluppano quadri nefropatici. In questa specie sembra che le lesioni più imponenti siano caratterizzate da degenerazione dei microvilli dei tubuli contorti prossimali, accompagnati da sparsi fenomeni di fibroplasia connettivale dell'interstizio, fino alla nefrosclerosi (Marquardt R.R. & Frohlich A.A., 1992). Le modificazioni a carico delle componenti tubulari renali determinano glicosuria, ipercreatinemia ed iperazotemia, associate a ridotta capacità di concentrare le urine. Studi analoghi sui polli hanno evidenziato che, anche in questa specie, l'organo maggiormente colpito dall'azione tossica cronica dell'OTA è il rene anche se altri organi quali fegato, tratto gastrointestinale, linfonodi, midollo osseo, timo, apparato scheletrico ed organi riproduttivi possono essere coinvolti (Burns R.P. & Dwivedi P., 1986).

Tra gli animali di interesse zootecnico, il suino è probabilmente quello che manifesta la più alta sensibilità nei riguardi dell'OTA, presentando oltre al quadro nefropatico ("nefropatia micotossica del suino") frequenti lesioni anche in altri parenchimi quali fegato, milza, timo (Hussein M.S. et al., 2001). Va da sé che in tale ottica di coinvolgimento di organi emolinfopoietici sia presumibile che anche il sistema immunitario possa risentirne, sia direttamente con la formazione di addotti con il DNA, capaci di interferire sulle funzioni cellulari della produzione anticorpale o della citolisi cellulo-mediata, sia indirettamente per gli effetti tossici generalizzati a più organi (Robens J.F. et al., 1992).

Per quanto attiene le alterazioni della risposta immunitaria, ricerche effettuate su polli hanno evidenziato che l'OTA determina deplezione delle cellule linfoidi nel timo, nella Borsa di Fabrizio, nella milza e nelle placche del Peyer. La deplezione delle cellule timiche è accompagnata da fenomeni di ipersensibilità ritardata, suggerendo, in questo modo, una possibile soppressione dell'immunità cellulo-mediata (Dwivedi P. & Burns R.P., 1984, 1985).

L'attività immunotossica dell'OTA è stata studiata in diversi modelli sperimentali, utilizzando vari dosaggi e vie di somministrazione, con risultati spesso di difficile interpretazione. E' stato osservato che l'esposizione all'OTA: a) interferisce con i livelli plasmatici delle immunoglobuline nei ratti e nei polli (Dortant P.M. et al., 2001; Dwivedi P. & Burns R.P., 1984); b) comporta, nel topo, soppressione della risposta anticorpale agli eritrociti di pecora (SRBC) (Creppy E.E. et al., 1983;

Thuvander A. et al., 1995); c) non determina modificazioni della risposta proliferativa dei linfociti B nel ratto (Dortant P.M. et al., 2001) e nel topo (Thuvander A. et al., 1995), mentre inibisce quella dell'uomo (Lea T. et al., 1989). Relativamente alla risposta immunitaria cellulo-mediata, è stato osservato nei roditori che l'esposizione all'OTA per quasi un mese non modifica la risposta ai mitogeni delle cellule T, mentre risulta diminuita dopo 90 giorni (Luster M.I. et al., 1987; Dortant P.M. et al., 2001; Thuvander A. et al., 1995). Ricerche effettuate sul suino e sul pollo hanno messo in evidenza un forte decremento della risposta proliferativa ai mitogeni da parte dei linfociti T, a seguito dell'esposizione all'OTA (Harvey R.B. et al., 1992; Elissalde M.H. et al., 1994). I risultati relativi agli effetti dell'OTA sull'attività delle cellule NK sono talvolta contraddittori; infatti una diminuzione della loro attività è stata osservata nel topo, ma non in altri roditori (Luster M.I. et al., 1987; Dortant P.M. et al., 2001; Thuvander A. et al., 1995). Sempre nel topo, l'attività dei linfociti T ad azione citotossica sembra non essere modificata dall'esposizione all'OTA, mentre disfunzioni sono state osservate a carico dei macrofagi sia nel topo che nel pollo (Campbell M.L. et al., 1983; Boorman G.A. et al., 1984; Luster M.I. et al., 1987; Muller G. et al., 1995). Recentemente Alvarez L. et al. (2004), in ratti intossicati con dosi di OTA comprese tra 50 e 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v. per 28 giorni, oltre al quadro nefrotossico, hanno osservato riduzione del potere macrofagico nonché dell'attività citotossica dei linfociti.

Nella specie suina è tuttora in fase di studio l'esistenza di un eventuale rapporto eziopatogenetico tra ocratossina e disfunzioni del sistema immunitario. In lavori su suini trattati con OTA (7-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v.) sono stati evidenziati: riduzione della componente leucocitaria, aumento dei fenomeni di apoptosi dei fagociti, incremento nella produzione dei ROS nel sangue, nonché alterazioni nella ripartizione delle sottopopolazioni linfocitarie (Muller G. et al., 1999; Muller G. et al., 2004).

In ordine ai frequenti riscontri di OTA negli alimenti destinati agli animali allevati in produzione zootecnica si inserisce la presente ricerca, intesa ad analizzare l'efficacia di potenziali trattamenti ocratossina protettivo-detossificanti nell'alimentazione animale. In particolare, nel contesto presente, si intende valutare il comportamento della risposta immunitaria e le eventuali alterazioni morfofunzionali in scrofe, direttamente intossicate con OTA, con o senza supplementazione di vitamine A ed E, durante il periodo di gestazione e lattazione, nonché nella loro prole indirettamente esposta.

Metodologia

Il protocollo sperimentale, approvato dal Comitato etico d'Ateneo, ha previsto l'utilizzo di 15 scrofe primipare e gravide da almeno 40 giorni, appartenenti alla stessa linea genetica (Duroc x (LWxL)) e tenute nelle stesse condizioni ambientali e di alimentazione. Quattro scrofe sono state adibite a controllo (gruppo A) ed alimentate *ad libitum* con mangime testato privo di micotossine; le rimanenti 11 sono state suddivise in tre sottogruppi: uno di 3 scrofe (gruppo B) e due di 4 soggetti ciascuno (gruppo C e gruppo D); questi ultimi hanno ricevuto *ad libitum*, per circa 100 giorni

(dal 45° giorno di gestazione fino al termine dell'allattamento) lo stesso mangime del gruppo controllo contaminato però da ocratossina A. Alle scrofe del gruppo B sono state somministrate giornalmente nel mangime 160 ppb di ocratossina A, derivante da un substrato colturale di riso contaminato da *A.ochraceus*; i soggetti del gruppo C e del gruppo D hanno invece ricevuto un'alimentazione contenente complessivamente 500 ppb di ocratossina A, rappresentata da 160 ppb di tossico derivante dal predetto substrato colturale, e da 340 ppb di ocratossina cruda (SIGMA); inoltre, al fine di limitare i danni ossidativi determinati dall'OTA, la razione dei soggetti del gruppo D è stata supplementata con 60 UI di vitamina E associata ad 11.000 UI di vitamina A per Kg di alimento, quote vitaminiche che in nostre precedenti esperienze avevano dimostrato un'efficace azione protettivo-detossificante verso la contaminazione da aflatossina B1 (Cabassi E. et al., 2003). Su tutte le scrofe, quotidianamente seguite sotto il profilo clinico e comportamentale, sono stati effettuati prelievi di sangue al 65° ed al 95° giorno di gravidanza, nonché a 3 ed a 21 giorni dopo il parto. Inoltre, in 21ª giornata dal parto si è provveduto a prelevare da tutte le scrofe singole aliquote di latte per accertare l'eventuale passaggio di OTA dal mangime al latte materno. Al parto, da ogni scrofa sono stati scelti casualmente 4 suinetti, ai quali sono stati prelevati campioni di sangue al 3° ed al 21° giorno di vita.

Sul sangue raccolto (scrofe e suinetti) sono state effettuate valutazioni emocitometriche (emocromo e formula leucocitaria) ed ematochimiche (glucosio, lipidi totali, trigliceridi, urea, creatinina, metaemoglobina, albumina, bilirubina totale, calcio, fosforo, sodio, potassio), nonché dell'immunofenotipo riguardante le principali sottopopolazioni linfocitarie T (CD4, CD8, CD3, TCR $\gamma\delta$), B (CD21) e di quelle a carattere monocitario (CD14), mediante analisi citofluorimetrica, seguendo metodiche da noi già sperimentate in altre ricerche (Luppi A. et al., 2002). I campioni di latte prelevati sono stati analizzati per la ricerca dell'OTA, mediante HPLC, secondo le metodiche seguite da Turconi G. et al. (2004).

Su tutte le scrofe ed i suinetti esaminati, sacrificati in 22ª giornata dopo il parto mediante Tanax®, sono stati condotti accurati esami necroscopici, prelevando porzioni di fegato, rene, milza, ileo, linfonodi mesenterici e timo, che sono stati fissati in formalina tamponata, processati e colorati per l'allestimento di sezioni istologiche.

Risultati

Durante la sperimentazione non si sono osservati segni di sofferenza clinica, né anomalie comportamentali, sia a carico delle scrofe che della rispettiva prole.

Per quanto attiene i parametri ematologici ed immunofenotipici saggiati, non si sono evidenziate variazioni statisticamente significative nei valori ottenuti, pur con oscillazioni individuali, tra le scrofe controllo (gruppo A) e quelle intossicate (gruppi B, C, D); tuttavia nei gruppi C e D (500 ppb di OTA con e senza supplementazione vitaminica), sono stati rilevati modesti rialzi della metaemoglobinemia e della creatininemia, una lieve riduzione della componente eritrocitaria, dell'emoglobina, nonché dell'albuminemia ed un contenuto decremento delle principali sottopopolazioni

linfocitarie T (CD4+, CD8+), B (CD21) e monocitarie (CD14), parametri questi in parte espressione di un incremento dei processi ossidativi e dall'altra potenzialmente correlabili ad una diminuzione dell'attività funzionale renale e della capacità reattiva del sistema immunitario.

Anche le determinazioni ematologiche e del comportamento immunofenotipico delle principali sottopopolazioni linfocitarie T, B e monocitarie, effettuate su tutti i 60 suinetti in sperimentazione (controllo ed indirettamente intossicati), non hanno palesato differenze statisticamente significative, che pur oscillando nei valori individuali, mostrano propensioni per una riduzione dei valori eritro-leucocitari, nonché emoglobinici.

Le indagini sui campioni di latte delle scrofe dei gruppi C e D, alimentate con la dieta contenente 500 ppb di OTA con o senza supplementazione vitaminica, hanno mostrato rispettivamente livelli di residui di OTA dell'ordine medio di 5,2 e 5,6 ppb, senza particolari variazioni individuali.

Le indagini macroscopiche effettuate sulle scrofe trattate e su quelle controllo non hanno evidenziato lesioni degne di nota a carico degli organi e tessuti esaminati. Sul piano istologico, invece, nelle scrofe intossicate con il più alto dosaggio di OTA (500 ppb con e senza supplementazione vitaminica) si sono osservati nel rene fenomeni di infiltrazione interstiziale (Fig.1), associati a processi distrofici focali, principalmente a carico degli epitelii dei tubuli prossimali con quadri di rigonfiamento citoplasmatico e di microvacuolizzazione (Fig. 2).

Al contrario, nei suinetti esaminati appartenenti ai quattro gruppi sperimentali, controllo ed indirettamente intossicati, non si sono evidenziate lesioni degne di nota sia dal punto di vista macroscopico che microscopico.

Discussione e conclusioni

Sulla base delle risultanze conseguite, nelle condizioni di tossicosi in cui abbiamo operato, in scrofe direttamente intossicate con diversi dosaggi di OTA, con o senza supplementazione di vitamina A e vitamina E nella dieta, e nei loro suinetti indirettamente esposti, non abbiamo riscontrato processi morbosi clinicamente appariscenti, rivelatori di una più o meno marcata condizione di tossicosi.

Il dosaggio di OTA utilizzato per intossicare i soggetti appartenenti al gruppo B (160 ppb) si è dimostrato non sufficiente a creare uno stato di tossicosi. Va segnalato, tuttavia che mentre Tapia M.O. e Seawright A.A. (1984) considerano un dosaggio pari a 200 ppb nella dieta non in grado di indurre tossicosi nel suino, Krogh P. (1992) ritiene che lo stesso dosaggio, protratto per tre mesi nella dieta di lattonzoli, comporti alterazioni distrofiche nella funzionalità renale con lesioni microscopicamente evidenziabili nell'assetto nefrotubulare. Analoghe alterazioni sono state da noi riscontrate unicamente nelle scrofe intossicate con il dosaggio più elevato di OTA (500 ppb con o senza supplementazione vitaminica), ma non nella rispettiva prole, che ha ricevuto durante l'intera fase di allattamento, quote subminimali di OTA con l'assunzione del latte.

Stoew S.D. et al. (2002) ritengono che le nefropatie osservate in molti casi

di ocratossicosi suina, possano essere la risultante di un'esposizione combinata con altre micotossine. Va ricordato, inoltre, che la maggior parte dei ricercatori che si sono occupati di ocratossicosi suina, hanno operato direttamente su suinetti e non su soggetti adulti e, come riportano O'Brien E. e Dietrich D.R. (2005), l'età sembra influire sulla comparsa della condizione tossica, quantomeno più facilmente acquisibile nei giovani (uomo, ratto) e meno negli adulti.

Le determinazioni emocitometriche, ematochimiche ed immunofenotipiche prese in considerazione, hanno portato ad una pressochè sovrapponibilità quantitativa di riscontri tra tutti i gruppi di scrofe intossicate rispetto ai controlli; tuttavia nei gruppi C e D si sono osservate tendenze all'incremento per alcuni parametri ematochimici (creatinina, albumina e metaemoglobina) associate ad un debole decremento eritrocitario di emoglobina e di alcune sottopopolazioni linfocitarie T, B e monocitarie, tale da far presupporre una risposta immunitaria solo parzialmente compromessa. Sul piano istopatologico, non si sono evidenziate alterazioni morfostrutturali nelle scrofe del gruppo B (160 ppb di OTA), mentre si sono osservati focali quadri distrofici nefrotubulari sovrapponibili nei due gruppi di scrofe che hanno ricevuto il maggior dosaggio di tossico (500 ppb con o senza supplementazione vitaminica).

In altre nostre ricerche (Cabassi E. et al., 2002; Cabassi E. et al., 2003), atte a valutare l'azione protettiva ed eventualmente detossificante di una supplementazione quotidiana di vitamina A e vitamina E in scrofe intossicate con aflatossine in gravidanza e durante la lattazione, si erano osservati riduzione dei processi lesivi a carico di fegato e reni, più contenute oscillazioni nei valori dei parametri ematochimici saggiati, unitamente ad un comportamento pressochè normale della risposta difensiva cellulo-mediata. Per contro i suinetti nati dalle suddette scrofe non avevano ricevuto alcun beneficio dallo stato di supplementazione vitaminica materna, presentando alterazioni morfostrutturali a carico dei principali parenchimi, associate a decrementi nella popolazione linfocitaria, evocando quindi potenziali rallentamenti o limitazioni nella reazione difensiva.

Per quanto riguarda le indagini effettuate sui campioni di latte, queste hanno mostrato, nelle scrofe trattate con il dosaggio massimo di OTA, con o senza l'apporto di vitamine A ed E, una modesta quota residuale di tossina, ed i suinetti, indirettamente intossicati durante la gravidanza e direttamente con il latte assunto, non hanno palesato modificazioni morfostrutturali appariscenti, nè a carico della componente emocitometrica, ematochimica, né a carico della risposta immunitaria. Questo risultato va unicamente ricondotto al basso quantitativo ed al limitato periodo di assunzione di residuo tossico quotidianamente assunto con il latte.

Sulla base della nostra esperienza in corso di ocratossicosi cronica, riteniamo quindi che:

- a) la somministrazione di un substrato colturale di *A.ochraceus* con 160 ppb di OTA nella dieta di scrofe durante la gravidanza e l'allattamento, non determini modificazioni nell'assetto morfostrutturale del rene, né dei principali altri organi o tessuti presi in considerazione e neppure evochi disfunzioni a livello ematoclinico ed immunodifensivo, rispetto alle scrofe non intossicate;

- b) anche la prole indirettamente esposta al livello di intossicazione di cui sopra, durante la gravidanza e l'allattamento, comparativamente ai soggetti di controllo, non risenta dell'azione del tossico, non rilevando alterazioni nelle componenti morfofunzionali e nella risposta immunitaria;
- c) la somministrazione nella dieta di 500 ppb di OTA, per circa 100 giorni, in scrofe in fase di gestazione e lattazione, con o senza supplementazione di vitamina A e vitamina E, quali fattori protettivi-detossificanti, confermi l'insorgenza di lesioni microscopiche tubulonefrosiche focali, quale conseguenza dell'azione della micotossina, mentre statisticamente non sembrano emergere altri elementi di rilievo nei valori ematoclinici ed immunofenotipici saggiati, tra scrofe trattate e controllo;
- d) i suinetti, nati dalle suddette scrofe ed indirettamente esposti a 500 ppb di OTA, non risentano del livello di micotossina quotidianamente ricevuta durante la vita fetale (Hollinger K. & Ekperigin H.E., 1999) ed ancor più della quota assunta durante il periodo di allattamento, non essendo state accertate turbe dello stato di salute, né particolari modificazioni per quanto riguarda l'aspetto morfofunzionale e della risposta immunitaria cellulomediata ed umorale;
- e) la supplementazione vitaminica nella razione quotidiana, contaminata da 500 ppb di OTA, ai livelli da noi utilizzati (vitamina A 11.000 UI più vitamina E 60 UI/Kg mangime); a differenza di quanto osservato in nostre analoghe ricerche sperimentali in corso di aflatossicosi (Cabassi E. et al., 2002; Cabassi E. et al., 2003), non sia sufficiente a prevenire, né tantomeno ridurre le lesioni da noi riscontrate nelle scrofe alimentate con la medesima dieta contaminata con OTA allo stesso dosaggio, ma senza l'aggiunta delle succitate vitamine.

Le risultanze sopra riportate non consentono ovviamente di trarre illazioni e conclusioni di decisivo interesse scientifico e pratico, sul piano dell'azione preventiva-detossificante svolta dalle vitamine A ed E in corso di ocratossicosi cronica, ma prospettano tuttavia suggestive ipotesi di lavoro, fondate su alcune tendenze registrate nel corso della prova, ai livelli più alti di OTA, quali segni di eritrocitopenia, linfo-monocitopenia ed incremento della metaemoglobinemia, che potrebbero rappresentare ipotesi di approfondimento per ulteriori indagini.

Bibliografia

1. Alvarez L., Gil A.G., Ezpeleta O., Garcia-Jalon, Lopez de Cerain: Immunotoxic effects of ochratoxin A in wistar rats after oral administration – Food and Chemical Toxicology 42, 825, 2004.
2. Baldi A., Losio M.N., Cheli F., Rebucci R., Sangalli L., Fusi E., Bertasi B., Pavoni E., Carli S., Politis I.: Evaluation of the protective effects of α -tocopherol and retinol against ochratoxin A cytotoxicity - Brit.J. of Nutr. 91, 507, 2004.
3. Boorman G.A., Hong H.L., Dieter M.P., Hates H.T., Pohland A.E., Stack M., Luster M.I.: Myelotoxicity and macrophage alteration in mice exposed to

- ochratoxin A - Toxicol. Appl. Pharmacol. 72, 304, 1984.
4. Burns R.P. & Divedi P.: The natural occurrence of ochratoxin A and its effects in poultry. A review - Part II. Pathology and immunology. World's Poult. Sci. J. 42, 48, 1986.
 5. Cabassi E., Borghetti P., Miduri F., De Angelis E., Luppi A., Corradi A.: Aflatoxicosis in pregnant sows: cell-mediated response in their new-born piglets - Proc.20th Meet.ESVP 234, 2002.
 6. Cabassi E., Miduri F., Lombardi G., Losio M.N., Fusari A., Corradi A.: Aftossicosi indotta e risposta immunitaria in scrofe gravide: effetti della supplementazione con vitamina A e vitamina E - Atti SIPAS, Salsomaggiore Terme (PR) 385, 2003.
 7. Campbell M.L., May J.D., Huff W.E., Doerr J.A.: Evaluation of immunity of young broiler chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis - Poultry Science 62, 2138, 1983.
 8. C.A.S.T. (Council for Agricultural Science and Technology): Mycotoxins: Risk in Plant, Animal and human Systems - Task Force Report, Report n° 139, Ames, Iowa, 2003.
 9. Chelack W.S., Borsa J., Marquardt R.R., Frohlich A.A.: Role of competitive microbial flora in the radiation-induced enhancement of ochratoxin production by *Aspergillus alutaceus* var *alutaceus* NRRL-3174 - Appl. Environ. Microbiol., 57, 2492, 1991.
 10. Chu F.S.: Studies in ochratoxin - CRC Crit. Rev. Toxicol. 2, 499, 1974.
 11. Creppy E.E., Stormer F.C., Rosenthaler R., Dirheimer G.: Effects of two metabolites of ochratoxin A, (4R)-4-hydroxy-ochratoxin A and ochratoxin alfa, on immune response in mice - Infection and Immunity 39, 1015, 1983.
 12. Creppy E.E., Kane A., Giessen-crouse E, Roth A., Rosenthaler R., Dirheimer G.: Effects of ochratoxin a on enzyme activities and macromolecules synthesis in MDCK cells - Arch. Toxicol. Suppl. 9, 310, 1986.
 13. Creppy E.E., Baudrimont I., Betbeder M.: Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant - Toxicology Letters 82/83, 869, 1995.
 14. Devegowda G., Aravind B.I.R., Morton M.G.: *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicosis in broilers - Proc.Aust.Poult. Sci.Symp. 8, 103, 1996.
 15. Dirheimer G., Creppy E.E.: Mechanism of action of ochratoxin A - IARC Sci. Publ. 115, 171, 1991.
 16. Dortant P.M., Peters-Volleberg G.W.M., Van Loveren H., Marquardt R.R., Speijers G.J.A.: Age-related differences in the toxicity of ochratoxin A in female rats - Food and Chemical Toxicology 39, 55, 2001.
 17. Dwivedi P. & Burns R.B.: Pathology of ochratoxin A in young broiler chicks - Res. Vet. Sci. 36, 92, 1984.
 18. Dwivedi P. & Burns R.B.: Immunosuppressive effects of ochratoxin A in young turkeys - Avian Pathol. 14, 213, 1985.
 19. Elissalde M.H., Ziprin R.L., Huff W.E., Kubena L.F., Harvey R.B.: Effects of ochratoxin A on Salmonella-challenged broiler chicks - Poultry Sci. 73, 1241, 1994.

20. Galvano F., Piva A., Ritieni A., Galvano G.: Dietary strategies to counteract the effects of micotoxins: a review – J. Food Prot. 1, 120, 2001.
21. Harvey R.B., Elissalde M.H., Kubena L.F., Weaver E.A., Corrier D.E., Clement B.A.: Immunotoxicity of ochratoxin A to growing gilts – Am.J.Vet.Res. 53, 1966, 1992.
22. Hollinger K., Ekperigin H.E.: Micotoxicosis in food producing animals – Vet. Clin.North Am: Food Animal Practice 15, 1, 133, 1999.
23. Huff W.E., Kubena L.F., Harvey R.B.: Progression of ochratoxicosis in broiler chickens - Poultry Sci. 67, 1139, 1988.
24. Hussein S.H., Brasel J.M.: Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals - Toxicology 167, 101, 2001.
25. Krogh P., Axelsen N.H., Elling F., Gyrd-Hansen N., Hald B., Hyldgaard-Jensen J., Larsen A.E., Madsen A., Mortensen H.P., Moller T., Petersen O.K., Ravnsko V., Rostgaard M., Aalund O.: Experimental porcine nephropathy. Changes of renal function and structure induced by ochratoxin A contaminated feed - Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. A Suppl. 246, 1, 1974.
26. Krogh p., Gyrd-Hansen N., Hald B., Larsen S., Nielsen J.P., Smith M., Ivanoff C., Meisner H.: Renal enzyme activities in experimental ochratoxin A-induced porcine nephropathy: diagnostic potential of phosphoenolpyruvate carboxykinase and gamma-glutamyl transpeptidase activity - J. Toxicol. Environ. Health 23, 1, 1988.
27. Krogh P.: Role of ochratoxin in disease causation - Food and Chemical Toxicology 30, 3, 213, 1992.
28. Kuiper-Goodmann T & Scott P.M.: Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A - Biomed. Environ. Sci. 2, 179, 1989.
29. Lea T., Stein K., Stormer F.C.: Mechanism of ochratoxin A-induced immunosuppression - Mycopathologia 107, 153, 1989.
30. Luppi A., De Angelis E., Losio M.N., Lombardi G., Miduri F., Cabassi E.: Immunotossicità da aflatoxine in scrofe gravide - Atti SIPAS XXVIII, PC, 127, 2002.
31. Luster M.I., Germolec D.R., Burleson G.R., Jameson C.W., Ackermann M.F., Lamm K.R., Hayes H.T.: Selective immunosuppression in mice of natural killer cell activity by ochratoxin A - Cancer Res.47, 2259, 1987.
32. Madhyastha M.S., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Abramson D.: Effects of different cereal and oilseed substrates on the growth and production of toxins by *Aspergillus alutaceus* and *Penicillium verrucosum* - J. Agric. Food Chem. 38, 1506, 1990.
33. Marquardt R.R.& Frohlich A.A.: A review of recent advances in understanding ochratoxicosis - J.Anim.Sci. 70, 3968, 1992.
34. Meisner H. & Polsinelli L.: Changes of renal mRNA species abundance by ochratoxin A - Biochem. Pharmacol. 35, 661, 1986.
35. Muller G., Kielstein H., Kohler H., Berndt a., Rosner H.: Studies of the influence of ochratoxin A on immune and defence reactions in the mouse model - Mycoses 38, 85, 1995.
36. Muller G., Kielstein P., Rosner H., Berndt A., Heller M., Kohler H: Studies of the

- influence of ochratoxin A on immune and defence reactions weaners – *Mycoses* 42, 495, 1999.
37. Muller G., Burkert B., Moller U., Diller R., Rohrmann B., Rosner H., Kohler H.: Ochratoxin A and some of its derivatives modulate radical formation of porcine blood monocytes and granulocytes - *Toxicology* 199, 251, 2004.
 38. O'Brien E. & Dietrich D.R.: Ochratoxin A: the continuing enigma - *Critical Rev. Toxicol.*, 35, 33, 2005.
 39. Patterson D.S.P., Shreeve B.J., Roberts B.A., Berret S., Brush P.J., Glancy E.M.: Effect on calves of barley naturally contaminated with ochratoxin A and groundnut meal contaminated with low concentrations of aflatoxin B - *Res. Vet. Sci.* 31, 213, 1981.
 40. Piva G. & Pietri A.: Micotossine e allevamento suino – *Atti SIPAS*, 43, 2002.
 41. Robens J.F., Richard J.L.: Aflatoxins in animal and human health - *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 127, 69, 1992.
 42. Schaaf G.J., Nijmijer S.M., Maas R.F.M., Roestenberg P., De Groene E.M., Fink-gremmels J.: The role of oxidative stress in the ochratoxin A-mediated toxicity in the proximal tubular cells - *Biochim. Biophys. Acta* 1588, 149, 2002.
 43. Stoev S.D., Paskalev M., MacDonald S., Mantle P.G.: Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs - *Exp. Toxic. Pathol.* 53, 481, 2002.
 44. Tapia M.O. & Seawright A.A.: Experimental ochratoxicosis A in pigs - *Australian Vet. J.* 61, 219, 1984.
 45. Thuvander A., Breitholtz-Emanuelsson A., Olsen M.: Effects of ochratoxin A on the mouse immune system after subchronic exposure - *Food and Chemical Toxicology* 33, 1005, 1995.
 46. Turconi G., Guarcello M., Livieri C., Comizzoli S., Maccarini L., Castellazzi A.M., Pietri A., Piva G., Roggi C.: Evaluation of xenobiotics in human milk and ingestion by the newborn. An epidemiological survey in Lombardy (Northern Italy) – *Eur.J.Nutr.* 43, 191, 2004.
 47. Xiao H., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Phillips G.D., Vitti T.G.: Effect of a hay and a grain diet on the rate of hydrolysis of ochratoxin A in the rumen of sheep - *J. Anim. Sci.* 69, 3706, 1991a.
 48. Xiao H., Marquardt R.R., Frohlich A.A., Phillips G.D., Vitti T.G.: Effect of a hay and a grain diet on the bioavailability of ochratoxin A in the rumen of sheep - *J. Anim. Sci.* 69, 3715, 1991b.

Summary

The AA aim to study the morphostructural alterations and the modifications of T (CD4, CD8, CD3, TCR $\gamma\delta$), B (CD21) lymphocyte and monocyte (CD14) subpopulations in sows fed daily with a diet contaminated (160ppb, 500ppb) with ochratoxin A (OTA), with or without vitamin A and E, during the gestation/lactation period, and in their piglets. Our results demonstrate that vitamin A and E supplementation, under toxicosis conditions (500ppb), do not seem to exhibit a preventive/detoxifying action. In fact, histological alterations and hematic values

showed a qualitative/quantitative superimposition of results from the intoxicated sows with or without vitamin supplementation (500ppb), when compared to the control animals. No alterations were seen in the piglets.

Riassunto

Gli AA hanno condotto una serie di sperimentazioni, in scrofe gravide ed in lattazione e nei loro suinetti, per valutare le alterazioni morfofunzionali, il comportamento di parametri ematoclinici, della risposta immunitaria (CD4, CD8, CD3, TCR $\gamma\delta$, CD21, CD14), conseguenti all'assunzione di un mangime contaminato con diversi dosaggi di OTA (160 ppb e 500 ppb) con o senza supplementazione di vitamine A ed E, quali fattori protettivo-detossificanti. I risultati non sembrano evidenziare azioni preventive/detossificanti ad opera delle vitamine A ed E utilizzate, poiché le determinazioni rilevate hanno portato ad una pressoché sovrapposibilità quanti-qualitativa di riscontri tra soggetti intossicati (500 ppb) con o senza supplementazione vitaminica, in rapporto ai soggetti controllo. Nulla da segnalare nei suinetti.

Si ringrazia il Dott. Guerino Lombardi dell'IZSLER di Brescia, unitamente ai Proff. Amedeo Pietri e Paola Battilani della Facoltà di Agraria di Piacenza, per la preziosa collaborazione offerta.

Ricerca eseguita nell'ambito del progetto COFIN N°2003077024 _ 003

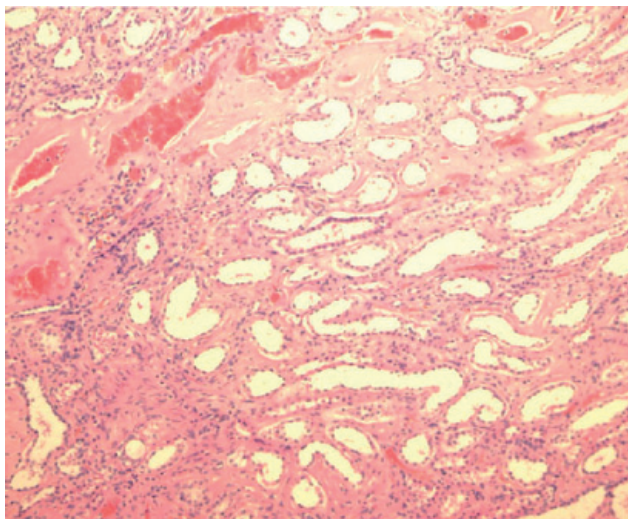


Fig 1. Rene di scrofa intossicata con 500 ppb di OTA.
Modesti quadri di infiltrazione fibro-connettivale a livello interstiziale (EE 10X).

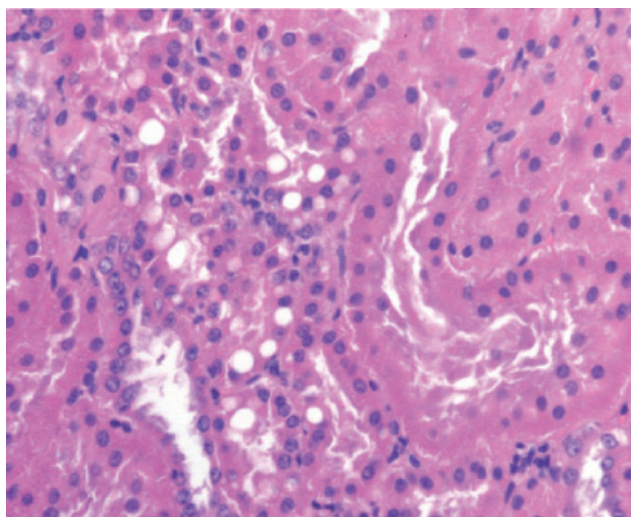


Fig.2. Rene di scrofa intossicata con 500 ppb di OTA.
Quadri di microvacuolizzazione a livello di epitelio tubulare (EE 20X).

Introduction

Mycotoxins, one of many alimentary pollutants, have acquired a place of primary scientific and health importance due to their widespread diffusion and the danger they represent to domestic animals and humans (C.A.S.T. Report n°139, Ames, Iowa, 2003).

Regularly, fodder and feedstuff are infected by various species of fungi, during harvest and stockpiling, which produce metabolic toxins under specific humidity and temperature conditions. Also dangerous to animals is the use of by-products from the feedstuff industries, such as threshing residue, cereal liquids and waste bread products, which are easily contaminated by mycotoxins. Mycotoxins are toxic compounds derived from the secondary metabolism of fungi species, such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*, which can enter the human food chain through contaminated cereals, milk, meat and eggs produced by intoxicated animals (Devegowda G. et al., 1996).

Mycotoxins are known to cause carcinomas, genotoxicity, teratogenicity and immunosuppression. The effects in domestic animals are manifested in well defined pathological forms, such as Reye's disease in man (caused by aflatoxin B1), equine leukoencephalomalacia, porcine pulmonary edema (caused by fumonisin B1), hyperestrogenism in sows (caused by zearalenon) and Balkan endemic nephropathy (caused by ochratoxin A). The effects may be subacute or chronic, not always clinically recognized, but capable of seriously altering the function of the organism and compromising zoeconomic production (Galvano F. Et al., 2001; Piva G. & Pietri A., 2002).

Domestic animals demonstrate various grades of sensitivity to mycotoxins, depending on the animal species, the intake level, duration of exposure, age, sex, physiological status and eventual synergy between mycotoxins simultaneously present in the feed (O'Brien E. et al., 2005).

An important role in animal mycotoxicosis is played by ochratoxins, toxic metabolites principally produced by two species of fungi, *Penicillium verrucosum* and *Aspergillus ochraceus*, which cause diseases in plants and mouldy feedstuff.

Ochratoxins are derivatives of isocoumarin linked to L- β phenylalanine and are classified as pentaketides. Ochratoxins exist in several forms with varying toxicity based on the dissociation constants of the phenolic hydroxyl group. Ochratoxin A (OA) and C (OC) are the most toxic forms, sharing similar dissociation constants, whereas ochratoxin B (OB) is approximately ten times less toxic than OA. Other forms exist, possessing lesser degrees of toxicity. OA and OB are the only naturally occurring ochratoxins in plants, although identification of OB-contaminated commodities is rare. Another toxin produced by *Penicillium* is citrinin, which can act synergistically with OA to damage the kidney.

OA is a stable compound, slightly soluble in water, more soluble in dilute aqueous bicarbonate, and most soluble in polar organic solvents (Hollinger K. & Ekperigin H.E., 1999).

The amount of OA produced by any given species is influenced by many factors, including temperature, type of substrate and the presence of competitive microflora. The temperature range for OA production by *A.ochraceus* is 12° to 37 °C,

whereas that for *P. verrucosum* is 4 to 31°C. These data correspond with observations on OA contamination in stored grain. *P. verrucosum* is the major OA producer in cereals in cold climates, in contrast OA production in crops in warm climates is primarily by strains of *A. ochraceus* (Krogh P., 1992).

The substrate on which *Penicillium* and *Aspergillus* species are grown strongly influences OA production. An in vitro study revealed that oilseeds (peanuts and soybeans) supported a much higher production of OTA and OTB by *A. ochraceus* than did the grain crops (wheat and corn), whereas the two grains were much better substrates for the production of OA and citrinin by *P. verrucosum* than the oilseed crops. Furthermore, there did not seem to be a close association between the total amount of fungal mass and the amount of mycotoxin produced (Madhyastha M.S. et al., 1990).

The presence of competing microflora on a cereal substrate also affects the production of OTA by *A. ochraceus*; Chelack W.S. et al. (1991) demonstrated that the production of OTA by *A. ochraceus* on sterilized barley was much greater than its production of OTA on unsterilized barley and that OTA production by this fungus was greatly suppressed by the reintroduction of non-OA-producing flora that had been isolated from the barley.

OTA is rapidly absorbed from the gastrointestinal tract, with the exception of ruminants whose rumenal microflora hydrolyze OTA prior to absorption into ochratoxin- α , a less toxic metabolite (Patterson D.S.P. et al., 1981; Xiao H. et al., 1991 a,b). OTA, once absorbed into the blood, binds with albumin and is distributed in decreasing tissue concentrations to lung, liver, kidney, heart, fat, intestine, etc. Lowest levels occur in muscle, spleen, and brain. OTA has been demonstrated to cross the placenta and transfer into the fetus in rats, mice and pigs. In addition, OTA has been shown to be transmitted into milk and eggs. Enterohepatic recycling and strong albumin binding are associated with the prolonged half-life of the toxin (Hollinger K. & Ekperigin H.E., 1999).

The primary effects of OTA intoxication seem to be associated with an alteration of: a) the enzymes involved in phenylalanine metabolism, including phenylalanyl transferase and phenylalanine hydroxylase (Dirheimer G. et al., 1991); b) lipid peroxidation with modification of membrane permeability and, consequently, cellular necrosis (Creppy E. et al., 1995); c) mitochondrial function; d) DNA, RNA and protein synthesis in many different organisms (Creppy E. et al., 1986; Meisner H. & Polsinelli L., 1986).

Some authors (Schaaf et al., 2002; Baldi A. et al., 2004) maintain that the cellular damage provoked by OTA is attributed to the production of reactive oxygen species (ROS), as well as its potential capacity to activate cytochrome P450 (enzyme able to metabolize liposoluble compounds), which stimulates OTA-dependent lipid peroxidation and converts non-mutagenic OTA into mutagenic metabolites.

Ochratoxin A is acutely toxic to several species of animals, including chicks, hens, turkeys, rats, sheep, swine, and rainbow trout. The acute oral toxicities of OTA when expressed as LD₅₀ values (milligrams/kilogram BW) are 1.0 to 6.0 for pigs, 3.3 for chickens and 0.2 for dogs (Kuiper-Goodman T. & Scott P.M., 1989). No LD₅₀ values have been reported for ruminants; however, doses as high as 2.0

mg/kg BW caused reduced BW, clinical depression, and dehydration in calves. These results indicate that in acute toxicity studies with OTA, dogs and pigs are the most sensitive species and rats and mice, and possibly ruminants, are the least sensitive (Marquardt R.R. & Frohlich A.A., 1992).

The main clinical patterns associated with acute ochratoxicosis include initial anorexia, weight loss, emesis, followed by tenesmus, passage of clots of blood-stained mucus from the rectum, elevated rectal temperature, polydipsia, polyuria, dehydration, prostration, and death within 2 weeks after administration of the toxin (Chu F.S., 1974).

In veterinary medicine, the damaging effects of this toxin involve the kidneys, where degeneration can be observed in the microvilli of the proximal convoluted tubules, which are associated, as the intoxication progresses, with interstitial connective tissue fibrosis, leading to sclerosis.

Traits such as kidney weight and the serum concentrations of several proteins and metabolites and the activity of certain enzymes can be used as sensitive and earlier indicators of ochratoxicosis. Among these traits, Huff W.E et al. (1988) concluded that total serum protein and albumin levels are the most sensitive indicators of ochratoxicosis in chickens. Other researchers have shown that a decrease in renal phosphoenol-pyruvate carboxykinase (PEPCK) activity is a highly sensitive and specific indicator of OTA toxicity in pigs (Krogh P. et al., 1988).

The chronic effects of OTA are demonstrated chiefly in pigs. Krogh P. et al. (1974) reported that pigs fed diets containing 200 to 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of OTA developed nephropathy after 4 months at all levels of exposure. All the lesions, in this species, were confined to the kidney, and most of the renal effects were associated with damage to the proximal tubules (degeneration of microvilli, interstitial connective tissue fibrosis and sclerosis) (Marquardt R.R. & Frohlich A.A., 1992). Burns R.P. & Dwivedi P. (1986) reported that the target organ of OTA in poultry, as shown in other species, seems to be the kidney, although other systems such as the liver, gastrointestinal tract, lymphoid organs, skeletal system, hematopoietic tissues, and the reproductive organs can be affected.

The domestic animal most sensitive to OTA is the pig, which shows nephropathy and lesions involving other organs, such as the liver, spleen and thymus (Hussein M.S. et al., 2001). Studies with laboratory animals have indicated that OTA causes immunomodulation. The depletion of lymphoid cells after OTA ingestion, particularly in the thymus, bursa of Fabricius, spleen and Peyer's patches, has been reported for different species of animals. Depletion of the thymus occurs concurrently with a delayed hypersensitivity response, suggesting a possible suppression of cell-mediated immunity by OTA (Dwivedi P. & Burns R.P., 1984, 1985).

With respect to immunotoxicity, it is not always evident from the studies whether the effects observed are truly immunotoxic, or derived from acute toxic effects that exert an indirect influence on the immune system (Dortant P.M. et al., 2001).

The immunotoxic potential of OTA has been studied in different experimental models, after a single and repeated administration, by various modes, of a wide range of doses. Therefore, the available data is often contradictory and difficult to interpret. OTA exposure: a) affects the plasma levels of immunoglobulins in rats and in broiler

chicks (Dortant P.M. et al., 2001; Dwivedi P. & Burns R.P., 1984); b) suppresses the antibody response to sheep red blood cells (SRBC) in mice (Creppy E.E. et al., 1983; Thuvander A. et al., 1995); c) does not modify the proliferative response of B cells in rats (Dortant P.M. et al., 2001) or mice (Thuvander A. et al., 1995), while inhibiting it in humans (Lea T. et al., 1989). OTA does not modify the T cell response to mitogenic stimuli in rodents after 1 month, but a decrease is found after 90 days of exposure (Luster M.I. et al., 1987; Dortant P.M. et al., 2001; Thuvander A. et al., 1995). The proliferative response of T lymphocytes is decreased in pigs and broiler chicks (Harvey R.B. et al., 1992; Elissalde M.H. et al., 1994).

Data regarding OTA effects on NK cell activity is contradictory. A decrease of NK activity was observed in a study with mice whereas no effects were found in other studies with rodents (Luster M.I. et al., 1987; Dortant P.M. et al., 2001; Thuvander A. et al., 1995).

T cytotoxic lymphocyte (CTL) activity was not affected in mice, although OTA interferes with macrophage activity in mice and broiler chicks (Campbell M.L. et al., 1983; Boorman G.A. et al., 1984; Luster M.I. et al., 1987; Muller G. et al., 1995). Recently, immunotoxic effects of OTA were investigated by Alvarez L. et al. (2004) in rats intoxicated with 50 to 450 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW, for 28 days, and they observed a reduction in cytotoxic T lymphocyte activity and in the bacteriolytic capability of macrophages.

In pigs, more information is needed to confirm a supposed ethiopathogenic relationship between OTA and immune system alterations. Particularly, in weaning animals that have been administrated OTA in low doses (7-50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW), the effects of immune suppression are characterized by a decrease in leukocyte count, increase in phagocytic apoptosis, increase in ROS production in the blood and changes in the expression of lymphocyte-surface markers (Muller G. et al., 1999; Muller G. et al., 2004).

The nephrotubular findings in directly intoxicated sows prompted this experiment to verify if the protective and detoxifying role of anti-toxic agents (vitamins A and E) prevent or reduce the microscopic renal alterations. We also evaluated the immune response in sows fed daily with a diet contaminated with OTA and supplemented or not with vitamins A and E, during the period of gestation and lactation, and in their indirectly exposed piglets, in comparison to controls.

Methodology

The experimental protocol, approved by the University Ethics Committee, used fifteen *primi gravidae* sows, pregnant for at least 40 days and belonging to the same genetic line (Duroc X (LW XL)).

All the sows were raised in the same environment and under the same nutritional conditions. Four sows were assigned as controls (group A) and were fed *ad libitum* with mycotoxin-free tested feedstuff. The remaining eleven sows were subdivided in 3 sub-groups: one with three sows (group B), and two with four sows each (group C and D). These 3 sub-groups were fed *ad libitum* with the same feedstuff as the control group, but contaminated with OTA, for about a hundred days (from the

45th day of gestation until the end of lactation). Sows in group B received a daily bolus containing 160 ppb of OTA (derived from a rice cultured substrate of *A.ochraceus*), while sows in group C and D received a daily diet contaminated with 500 ppb of OTA (160 ppb derived from a rice cultured substrate of *A.ochraceus* and 340 ppb of crude ochratoxin, SIGMA). The ration of the sows in group D was supplemented with 60 I.U of vitamin E associated with 11.000 I.U. of vitamin A per kilo of feedstuff. In our previous experiments, during intoxication with aflatoxin B1, these doses of vitamins had shown an efficient detoxifying action (Cabassi E. et al.,2003).

Blood samples were collected on the 65th and the 95th day of gestation, and also on the 3rd and 21st day after delivery, from all the sows that were clinically controlled daily. In addition, on the 21st day after delivery, milk samples were taken from all sows, to verify OTA passage from feedstuff to the milk. At delivery, four piglets from every sow were randomly chosen, and blood samples were taken on the 3rd and the 21st day of life.

From the blood samples, taken from the sows and piglets, hemocytometric and hematochemical tests (glucose, total lipid, triglycerides, urea, creatinine, methemoglobin, albumin, total bilirubin, calcium, phosphorus, sodium and potassium) were performed, as well as the immunophenotype regarding the most important T lymphocyte (CD4, CD8, CD3, TCR $\gamma\delta$), B lymphocyte (CD21) and monocyte (CD14) subpopulations, by means of flow cytometry according to the methods we previously used (Luppi A., et al., 2002). Milk samples were analyzed by HPLC, according to the methods applied by Turconi G. et al. (2004).

Accurate necroscopic examinations were performed on all sows and piglets, sacrificed with Tanax® on the 22nd day after delivery, removing portions of liver, kidney, spleen, ileum, meseraic lymph nodes and thymus, which were fixed in 10% buffered formalin, processed and coloured for histological examination.

Results

During the experiment, no signs of clinical suffering nor abnormal behaviour were observed in the sows nor in their offspring.

Significant statistical variations were not found in the hematological and immunophenotypical values obtained, although individual variations were observed in the values between the control sows (group A) and the intoxicated ones (groups B, C, D). Nevertheless, in the two groups C and D of intoxicated sows (500 ppb of OTA with or without vitamin supplementation), a modest heightening of methemoglobinemia and creatininemia associated with a light reduction in hemoglobin, albuminemia and a contained decrease of T (CD4+, CD8+) and B lymphocyte (CD21) and monocyte (CD14) subpopulations were shown. These parameters are potentially related to an increase of oxidative processes, a decrease in renal function and in the reactive capacity of the immune system.

The hematology results and the immunophenotypic values of T and B lymphocyte and monocyte subpopulations in piglets belonging to the four groups (controls and indirectly intoxicated), did not show significant differences, although

variations were observed in the individual values, and a light trend in the reduction of hemoglobin and in leukocytic/erithrocytic values.

Milk samples, from sows belonging to groups C and D (500 ppb of OTA with or without vitamin supplementation), revealed the presence OTA residues in similar levels, 5,2 and 5,6 ppb respectively.

The macroscopic investigations, made on the intoxicated and the control sows, did not reveal any lesions in the organs examined. Histology, however, showed focal interstitial processes and dystrophic phenomena located on the epithelium of the proximal renal tubule with cytoplasmatic swelling and microvacuolation, in sows intoxicated with 500 ppb of OTA with or without vitamin supplementation (group C and D) (Figg.1, 2).

On the contrary, in piglets belonging to the four experimental groups, neither macroscopic or microscopic lesions were present.

Discussion and Conclusion

Our results show that the vitamin A and E supplementation, under toxic conditions, does not seem to exert a preventive/detoxifying action, both in sows fed daily with a diet contaminated with different doses of OTA, with or without vitamin supplementation, and in their indirectly exposed piglets. In fact, histological alterations and hematic values showed a qualitative/quantitative superimposition of results between the intoxicated sows with or without vitamin supplementation (500ppb), with reference to the control sows. Sows intoxicated with 160 ppb of OTA (group B) did not show any grade of toxicosis, however, with regard to the dose, not all researchers agree on the OTA levels which produce functional alterations.

While Tapia M.O. & Seawright A.A. (1984) consider a dose equivalent to 200 ppb of OTA in the diet insufficient to determine toxicosis in swine, Krogh P. (1992) retains that the same dose, protracted for three months in the piglets' diet, brings about dystrophic alterations in renal function, with microscopic lesions in the nephrotubular structures. We have found the same alterations in the two groups (C and D) of sows, intoxicated with 500 ppb of OTA, with or without vitamin supplementation, but not in their respective offspring.

Stoev S.D. et al. (2002) take into consideration that nephropathies, observed in many cases of swine ochratoxicosis, may be the result of combined exposure to other metabolic mycotoxins such as citrinine and penicillic acid. The majority of researchers studying ochratoxicosis, retain that age seems to influence the toxic manifestation more readily acquired in young subjects, as shown in similar studies in humans and rats (O'Brien E. et al., 2005).

Our results seem to partially agree with the literature, since the immunosuppression observed, as a weak decrease of T and B lymphocyte and monocyte subpopulations in the intoxicated sows (group C and D), seems to be only partial.

In our other works (Cabassi E. et al., 2002; Cabassi E. et al., 2003), concerning the evaluation of the protective and detoxifying role of vitamins A and E, in sows

fed daily with a diet contaminated with aflatoxins and supplemented with these vitamins, during the period of gestation and lactation, we observed reduction in liver and kidney lesions, light modifications of hematochemical parameters and a normal defensive immune response. On the contrary, in their indirectly intoxicated piglets this vitamin supplementation did not exert either prophylactic or detoxifying actions, since morphostructural alterations in various organs and a decrease of lymphocyte subpopulations in blood, were found.

Milk samples, from sows belonging to group C and D (500 ppb of OTA with or without vitamin supplementation), revealed the presence OTA residues, but piglets, directly intoxicated by the ingestion of milk, did not manifest striking morphostructural, hematochemical and immunological alterations. This result depends on: 1) the low quantity of toxins in the milk; 2) the limited period of ingestion.

In conclusion, our experience, during chronic ochratoxicosis, demonstrated that:

- a) intoxicating sows with 160 ppb of OTA, during the period of gestation and lactation, did not cause any grade of toxicosis, since no morphostructural, hematochemical or immunological alterations, were found;
- b) piglets, indirectly intoxicated with the same dose as above, did not manifest any grade of toxicosis, as compared to controls;
- c) sows fed daily, for a hundred days, with a diet contaminated with 500 ppb of OTA, with or without vitamin A and E supplementation, during the period of gestation and lactation, demonstrated focal dystrophic nephrotubular processes, but no hematoclinic or immunophenotypic modifications, with reference to controls;
- d) piglets, indirectly intoxicated with the same dose as above, did not show traces of the daily assumption of OTA during gestation and lactation, since no morphostructural and immunological alterations, were found;
- e) vitamin A and E supplementation, under the toxic conditions we studied (OTA, 500ppb; vitamin A, 11.000 I.U./kg feedstuff; vitamin E, 60 I.U./Kg feedstuff), does not seem to exert a preventive, or detoxifying action, since it does not prevent nor reduce the alterations observed in sows fed daily with a contaminated diet of the same dose of OTA, without vitamin addition. Furthermore, histological alterations and hematic values showed a qualitative/quantitative superimposition of results between the intoxicated sows with or without vitamin supplementation (500ppb), with reference to the control ones.

Further investigations are needed in order to carefully examine the importance of the modifications of some parameters, such as hemoglobin and leukocyte/erythrocyte reduction and methemoglobinemia and creatininemia heightening, since they could represent fundamental elements in the diagnosis of ochratoxicosis.

