

## MORPHOMETRICAL ANALYSIS OF LYMPHOID FOLLICLES OF CHICKEN SPLEEN VACCINATED AGAINST MAREK'S DISEASE

Mileva Mičić<sup>1</sup>, Biljana Miljković<sup>2</sup>, Svetlana Stamatović<sup>2</sup>, Ana Šaban<sup>1</sup>, Jasminka Nedeljković<sup>2</sup>,  
Darko Mitevski<sup>3</sup>, Milijana Knežević<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Institute for Immunology and Virology "Torlak", Yugoslavia,

<sup>2</sup> Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Yugoslavia,

<sup>3</sup> Veterinary Institute, Skopje, Macedonia,

<sup>4</sup> Faculty of Veterinary Medicine, Belgrade, Yugoslavia

## МОРФОМЕТРИСКА АНАЛИЗА НА ЛИМФОИДНИТЕ ФОЛИКУЛИ НА СЛЕЗИНАТА НА ПИЛИЊА ВАКЦИНИРАНИ ПРОТИВ МАРЕКОВА БОЛЕСТ

Милева Миќиќ<sup>1</sup>, Билјана Миљковиќ<sup>2</sup>, Свешлана Стаматовиќ<sup>2</sup>, Ана Шабан<sup>1</sup>, Јасминка Недељковиќ<sup>2</sup>,  
Дарко Мишевски<sup>3</sup> Милијана Кнежевиќ<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Институтот за имунологија и вирусологија "Торлак", Југославија,

<sup>2</sup> Институтот за ветеринарна медицина на Србија, Југославија,

<sup>3</sup> Ветеринарен институт, Скопје, Македонија,

<sup>4</sup> Ветеринарен факултет, Белград, Југославија

### ABSTRACT

The aim of this study was to analyze diameter and number of lymphoid follicles of spleen after vaccination with bivalent cell-associated Marek's disease vaccine. In our investigations newly hatched chickens of the light hybrid line, Tetra Sl, obtained from local Hatchery, were used. The chickens were vaccinated with bivalent cell-associated vaccine against Marek's disease (PFU 2000 per dose) on day five after hatching, and sacrificed on day 13 after hatching. As controls we used unvaccinated chickens same ages. The spleen was removed, measured and processed for light microscopy. The serial sections of the spleen, 5 µm thickness, hematoxylin-eosin stained were used for histomorphometric analysis. Ten sections from each of seven levels were stereologically analyzed using Weibel's test system (M42). Our results showed that vaccination against Marek's disease resulted in decrease of chicken weight and absolute weight of their spleen with significant spleen damage index. Histochemical analyses also demonstrated increase of the lymphoid follicles number comparing to controls.

Stereological analysis has shown not only significant increase of absolute number of follicles but their diameter. Our results suggested that vaccination of chickens against Marek's disease on day 5 after hatching induced immune response on administered antigen.

**Key words:** Spleen, volume density, diameter, lymphoid follicles

### КРАТКА СОДРЖИНА

Цел на оваа студија беше да се анализира дијаметарот и бројот на лимфоидните фоликули во слезината по вакцинацијата со бивалентна клеточно врзана вакцина против Марјекова болест. Во нашето истражување беа користени еднодневни пилиња од линијата на лесни хибриди Тетра Сл, кои беа добиени од локалната инкубаторска станица. Пилињата беа вакцинирани со бивалентна клеточно врзана вакцина против Марјекова болест (PFU 2000 по доза) на петтиот ден по испилувањето и беа жртвувани на 13 ден по испилувањето. Како контрола беа користени невакцинирани пилиња на иста возраст. Слезината беше отстранета, мерена и обработена за светлосна микроскопија. Сериските пресеци на слезината, со дебелина 5 µm, обоени со хематоксилин-еозин беа користени за хистоморфометриска анализа. Десет пресеци од секое од седумте нивоа беа стереолошки анализирани употребувајќи ја Вејбеловата мрежичка (M42). Нашите резултати покажаа дека вакцинацијата против Марјековата болест резултираше во намалување на тежината на пилињата и на апсолутната тежина на нивната слезина со значителен индекс на оштетување на слезината. Хистохемиските анализи исто така покажаа зголемување на бројот на лимфоидните фоликули во споредба со контролите. Стереолошката



## INTRODUCTION

Marek's disease is a contagious disease in chickens caused by Marek's disease virus (MDV) infection. (Lin and Lee, 1996.). The outcome of infection is dependent on the oncogenicity of the virus and the genetic resistance of the chickens. A number of studies have demonstrated the existence in poultry populations of MDV strains of different pathogenicity, ranging from apathogenic to highly virulent strains characterized by increased oncogenicity for both vaccinated and unvaccinated chickens regardless of their genetic susceptibility or resistance (Schat., 1987.) Genetic resistance has been linked, in part, to the class I major histocompatibility complex (MHC) antigens (Powell and Lombardini, 1986.) Also, the incidence of Marek's disease is influenced by factors associated with environmental conditions (Witter et al., 1984.)

Natural infection with MDV occurs by inhalation of virus-infected dust and dander. The virus is transported to the lymphoid organs by macrophages. Virus is usually detectable in the spleen, bursa of Fabricius and thymus (Miljković et al., 1999.) at 4 days post infection (DPI) by the presence of viral internal antigens (VIA) and virus isolation (Beasley et al., 1970.).

The germinal center of the spleen provides a microenvironment within which affinity maturation of the humoral immune response takes place (Camacho et al., 1998). In contrast to mammalian germinal centres, avian germinal center are surrounded by a capsule of connective tissue and they completely lack blood vessels and a marginal zone cannot be discriminated histologically. However, functionally similar compartments, peri-ellipsoid lymphocyte sheath (PELS) and peri-arteriolar lymphocyte sheaths (PALS) are described. PELS is made up of the complex of the ellipsoidal sheath of reticulum cells that surround the terminal capillary, the peri-ellipsoid lymphocyte sheath (PELS) of B cells, and ring of macrophages around it (Jeurissen., 1993). Inside of PALS there are dense sheaths of T lymphocytes around arteries, arterioles, veins and venules (Cooper et al., 1965.). Single T lymphocytes are also abundantly present in the red pulp sinuses (Jeurissen., 1996.). These compartments are involved in humoral immune response.

The aim of this study was to examine diameter and number of lymphoid follicles in the spleen of chickens vaccinated with bivalent cell-associated Marek's disease vaccine.

## MATERIAL AND METHODS

Newly hatched chickens of light hybrid line, obtained from local hatchery were used for this study. They were given commercial food and water ad libitum. Chickens were divided in two groups. The first group was vac-

аниза покажа дека има не само зголемување на апсолутниот бројот на фоликулите, туку и на нивниот дијаметар. Нашите резултати укажаа на тоа дека вакцинацијата на пилињата против Марековата болест на петтиот ден по испилувањето испровоцира имунолошка реакција на применетиот антиген.

**Клучни зборови:** *Слезина, густина на во луменот, дијаметар, лимфоидни фоликули*

## ВОВЕД

Марековата болест е заразна болест кај пилињата која е предизвикана со инфекција од вирусот на Марековата болест (ВМБ). Исходот на инфекцијата зависи од онкогеноста на вирусот и генетската отпорност на пилињата. Голем број на студии го демонстрираа постоењето во живинарските популации на различни видови на ВМБ со различна патогеност кои може да се движат од апатогеност до многу вирулентни видови кои се карактеризираат со зголемена онкогеност и кај вакцинираните и кај невакцинираните пилиња без оглед на нивната генетска подложност или отпорност (Шат, 1987). Генетската отпорност е поврзана делумно со класа I антигени против главен комплекс на хисокомпатибилност (ГКХ) (Пауел и Ломбардини, 1986). Исто така, на појавата на Марековата болест имаат влијание и факторите поврзани со условите во животната средина (Витер и други, 1984).

Природното заразување со Марековата болест настанува преку вдишување на правот и перутта инфицирана со вирус. Вирусот се пренесува до лимфоидните органи со помош на макрофаги. Вирусот обично е забележлив во слезинката, Фабрицијовата бурса и тимусот (Миљковиќ и други, 1999) 4 дена по инфицирањето (ДПИ) преку присуството на вирусни внатрешни антигени (ВНА) и изолација на вирусот (Бисли и други, 1970).

Герминативниот центар на слезинката обезбедува микросредина во која се одвива созревањето на афинитетот на хуморалната имунолошка реакција (Камачо и други, 1998). Спротивно на цицачките герминативни центри, птичјите герминативни центри се опкружени со капсула од сврзано ткиво и целосно немаат крвни садови и хистолошки не може да се одреди маргинална зона. Сепак, функционално сличните прегради, периелипсоидната лимфоцитна обвивка (ПЕЛО) и периартериоларните лимфоцитни обвивки (ПАЛО) се опишани. ПЕЛО е составена од комплексот на елипсоидната обвивка на ретикуларните клетки што го опкружуваат терминалниот капиляр, периелипсоидната лимфоцитна обвивка (ПЕЛО) на Б



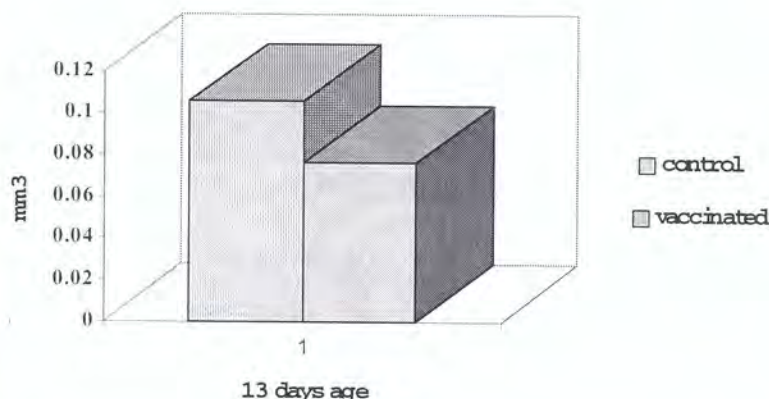
cinated with bivalent cell-associated Marek's disease vaccine at the five day of life. The second group, unvaccinated chickens, served as control. On day 13 after hatching, five chickens from both groups were sacrificed. The spleen were removed, weighted and fixed in Bouin's solution. Paraffin sequential serial sections (5µm thickness) of the spleen were stained with hematoxylin and eosin and after that were analyzed by light microscopy using multipurpose test system M42 (Weiber, 1979). Ten sections from each of seven levels were selected for morphometric measurement using point-counting method (Weibel, 1979). Point hits on the lymphoid follicles were registered and used for determination of their volume density. The number of follicles and intersections of test lines at the lymphoid follicles, were calculated for determination of their diameters and numerical density per unit volume of spleen tissue.

The results were statistically analyzed by Student's t-test.

## RESULTS

The results showed significantly reducing of the body weight ( $p < 0.001$ ), mass and volume of the spleen ( $p < 0.05$ ) in the chickens vaccinated against Marek's disease virus compared with correspondent controls (Graph. 1).

Volume of the spleen of control chickens and vaccinated against Marek's disease



The stereologic analysis has shown significant increase in number of lymphoid follicles per unit of volume tissues (Graph. 2) in vaccinated chickens comparing to controls.

The volume density of lymphoid follicles (Graph. 3), as well as diameter of follicles,

(Graph. 4), was increased in compare with unvaccinated control.

клетките и прстен од макрофаги околу неа (Јеурисен, 1993). Внатре во ПАЛО има густы обвивки од Т лимфоцити околу артериите, артериолите, вениите и венолите (Купер и други, 1965). Единечни Т лимфоцити исто така се обилно присутни и во синусите на црвената пулпа (Јеурисен, 1996). Овие прегради се вклучени во хуморалната имунолошка реакција.

Целта на оваа студија беше да се испита дијаметарот и бројот на лимфоидните фоликули во слезината на пилињата вакцинирани со бивалентна клеточно врзана вакцина против Марековата болест.

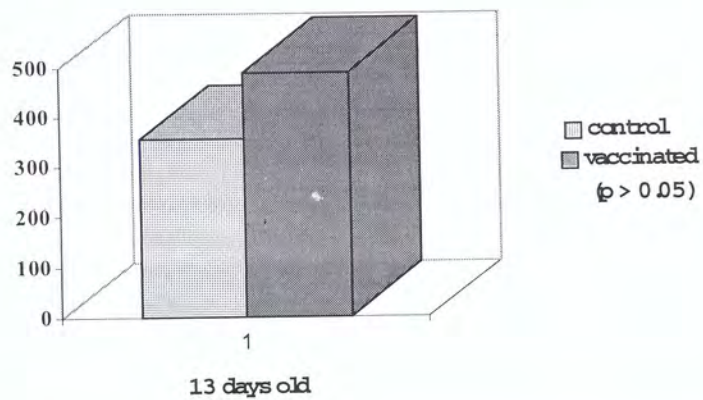
## МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДИ

Во оваа студија беа употребени новоиспелени пилиња од лесната хибридна линија добиени од локалната инкубаторска станица. Тие беа хранети без ограничување со комерцијална храна и вода. Пилињата беа поделени во две групи. Првата група беше вакцинирана со бивалентна клеточно врзана вакцина против Марековата болест на петдневна возраст. Втората група од невакцинирани пилиња служеше како контрола. Тринаесет дена по испилувањето, по пет пилиња од двете групи беа жртвувани. Слезината им беше отстранета, измерена и фиксирана во Боинов раствор. Парафински секвенцирани сериски пресеци (дебели 5µm) од слезината беа обоени со хематоксилин и еозин, а после тоа беа анализирани со светлосна микроскопија употребувајќи го повеќенаменскиот тест систем M42 (Вејбер, 1979). Десет пресеци од секој од седумте нивоа беа избрани за морфометриско мерење користејќи го методот на броене точки (Вејбер, 1979). Точките на лимфоидните фоликули беа евидентирани и

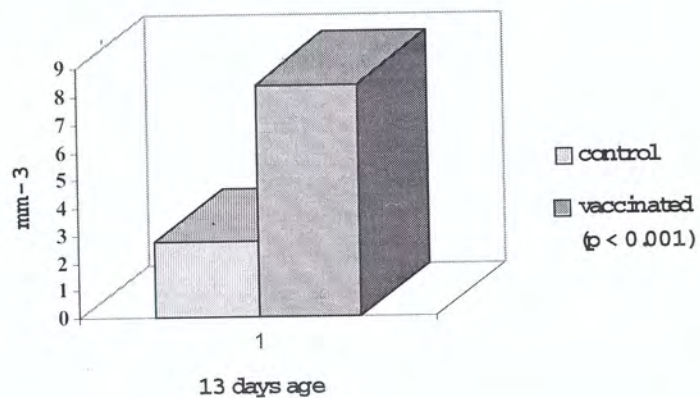
употребени за одредување на волуменска густина. Бројот на фоликулите и пресекувањата на тест линиите на лимфоидните фоликули беа пресметани за да се одредат нивните дијаметри и нумеричката густина на единица волумен на ткивото на слезинката.

Резултатите беа статистички анализираани со Студентовиот t-тест.

Number of follicles in the spleen of control  
chickens and vaccinated against Marek's disease

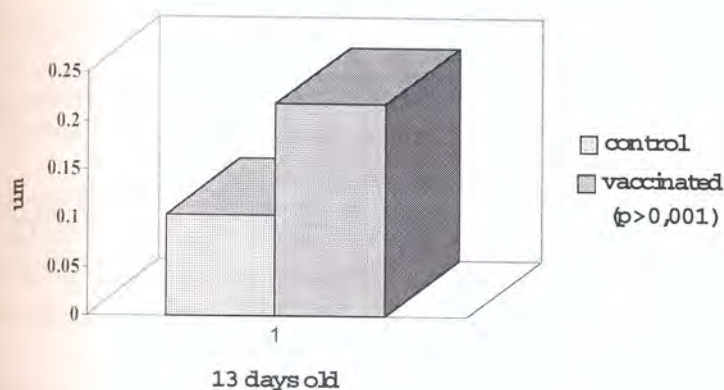


Volume density of follicles in the spleen of  
control chickens and vaccinated against  
Marek's disease





**Diameter of follicles in the spleen of control chickens and vaccinated against Marek's disease**



## DISCUSSION

The purpose of this study was to investigate generation of the lymphoid follicles in the spleen of chickens in reply to virus vaccinal antigen. Our results showed that vaccination against Marek's disease virus induce increase number of lymphoid follicles.

Increasing of the number of lymphoid follicles in our study, was in agreement with results of Chamacho et al., (1998). They are found increase number of germinal centers, characteristic structure with a dark and light zone, in the spleen, et day 5 after primary immunization.

Primary immunization initiate a immune response within two days (Kosco-Vilbois et al., 1997.). The humoral immune respons starts by interaction of the PALS, and complex of ellipsoid, PELS, and macrophages. The results of these cell's interactions, after antigenic stimulation, was B cells proliferation (Jeurissen, 1993.). The number of dividing cells increases continually until about day 8 (Camacho et al., 1998.) what in corelation with our results. Increasing volume density and diameter of the lymphoid follicles in our experiments may suggest clonal proliferation B cells induced by bivalent cell associated vaccine.

## РЕЗУЛТАТИ

Резултатите покажаа значително намалување на телесната тежина ( $p < 0.001$ ), масата и волуменот на слезината ( $p < 0.05$ ) кај пилињата вакцинирани против вирусот на Марековата болест споредено со соодветните контроли (Графикон 1)

Стереолошката анализа покажа значително зголемување на бројот на лимфоидни фоликули на единица волумен на ткиво (Графикон 2) кај вакцинираните пилиња споредено со контролите.

Густината на волуменот на лимфоидните фоликули (Графикон 3), како и дијаметарот на фоликулите (Графикон 4) беше зголемен во споредба со невакци-

нираните контроли.

## ДИСКУСИЈА

Целта на оваа студија беше да се испита создавањето на лимфоидните фоликули во слезината на пилињата како одговор на вирусните вакцинални антигени. Нашите резултати покажаа дека вакцинацијата против Марековата болест доведува до зголемување на бројот на лимфоидни фоликули.

Зголемувањето на бројот на лимфоидните фоликули во нашата студија беше во согласност со резултатите на Камачо и други (1998). Имаше зголемен број на герминативни центри, карактеристични структури со темна и светла зона во слезината на петтиот ден по примарната имунизација.

Примарната имунизација иницираше имунолошка реакција во рок од два дена (Коско-Вилбоа и други, 1997). Хуморалната имунолошка реакција започнува со интеракција на ПАЛО и комплексот на елипсоидот, ПЕЛО и макрофагите. Резултатите на интеракцијата на овие клетки по антигената стимулација беше пролиферација на Б клетките (Јеурисен, 1993). Бројот на клетките кои се делат постојано се зголемува се до околу осмиот ден (Камачо и други, 1998) што соодветствува со нашите резултати. Зголемувачката густина на волуменот и дијаметарот на лимфоидните фоликули во нашиот експеримент може да укаже на клонална пролиферација на Б клетките која е предизвикана од бивалентната вакцина која е поврзана со клетките?



---

**REFERENCES**

---

1. Beasley J N., Patterson L T. and McWade D H. (1970) Transmission of Marek's disease by poultry house dust and chicken dander. *A. J. Vet. Res.* 31: 339-344.
  2. Lin J A. and Lee T S. (1996) Genetic susceptibility to Marek's disease virus of local chickens in Taiwan. *Avian Dis.*, 40: 576-581.
  3. Witter R.L., Sharma J.M., Lee L.F. and Nazerian K. (1984) Field trials to test the efficiency of polyvalent Marek's disease vaccines in broilers. *Avian Dis* **28**, 44
  4. Miljkovic B., Rusov C., Zivkovic I., Djergovic D., Knezevic J., Asanin R., Sekulic M. and Micic M. (1999) Stereological analysis of the chicken thymus and bursa of Fabricius infected by Marek's disease virus. *Folia Anatomica*, 27: 49-51.
  5. Powell P C. and Lombardini F. (1986) Isolation of very virulent pathotypes of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Europe. *Vet. Rec.*, 118: 688-691.
  6. Schat K A. (1987) Marek's disease: a model for protektion against herpes virus- induced tumors. *Cancer Sur.*, 6: 1.
  7. Weibel E R. (1979) Stereological methods. Vol 1. Practical methods for biological morphometry. Academic Press, New York, NY.
  8. Camacho S A., Kosco-Vilbois M H. and Berek CV. (1998) The dynamic structure of the germinal center. *Immunol. Today*, 19: 511-514.
  9. Jeurissen S H M. (1993) The role of various compartments in the chicken spleen during an antigen-specific humoral response. *Immunol.*, 80: 29-33.
  10. Cooper M D., Peterson R D A. and Good R A. (1965) Delineation of the thymus and bursa lymphoid systems in the chickn. *Nature*, 205: 143-146.
  11. Jeurissen S H. and Janse M. (1996) The microenvironment of the chicken immune system. Current topics in microbiology and immunology. Vol. 212. Immunology and Developmental Biology if the chicken. Ed. O Vainio and B. A. Imhof. **47-67**.
  12. Kosco-Vilbois M H., Zentgraf H., Grdes J. and Bonnefoy J Y. (1997) To 'B' or not to 'B' a germinal center? *Immunol. Today*, 18: 225-230.
-