

EFFECT OF VACCINATION AGAINST MAREK'S DISEASE ON THE THYMUS, BURSA AND SPLEEN: STRUCTURAL AND STEREOLOGICAL ANALYSES

Biljana Miljković, Čedomir Rusov*, Irena Živković**, Danica Djergović**, Ružica Ašanin***,
Darko Mitevski****, Milka Sekulić***** and Mileva Mićić***

Institute of Veterinary Medicine of Serbia, Immunology Research Center "Branislav Janković"**,
Faculty of Veterinary Medicine***, Institute for Biological Research****, Belgrade, Yugoslavia, Veterinary
Institute****, Skopje, Macedonia*

ЕФЕКТ НА ВАКЦИНАЦИЈАТА ПРОТИВ МАРЕКОВАТА БОЛЕСТ НА ТИМУСОТ, БУРЗАТА И СЛЕЗИНАТА: СТРУКТУРНИ И СТЕРЕОЛОШКИ АНАЛИЗИ

*Билјана Миљковиќ¹, Чедомир Русов¹, Ирена Живковиќ², Даница Ѓерговиќ², Ружица Ашанин³,
Дарко Мишевски⁴, Милка Секулиќ⁴ и Милева Миќиќ⁵*

*1. Ветеринарен институт на Србија, 2. Имунолошки испитувачки центар "Бранислав Јанковиќ",
3. Ветеринарен факултет, 4. Институт за биолошки испитувања, Белград, Југославија,
5. Ветеринарен институт, Скопје, Македонија*

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate histomorphometrical characteristics of the thymus, bursa of Fabricius and spleen in the chickens vaccinated with vaccine against Marek's disease. For this investigation newly hatched chickens of the light hybrid line, obtained from local hatchery, were used. The chickens were vaccinated at 5th day of life with bivalent cell-associated Marek's disease vaccine (PFU-2000 per dose). After two weeks both vaccinated chickens and unvaccinated controls were sacrificed while thymus, bursa and spleen were removed and processed for light microscopy. The serial tissue sections, 5 mm thickness, stained hematoxylin-eosin, were used for histomorphometric analysis.

In the chickens vaccinated against Marek's disease we found: decreased of the body weight and relative mass of the thymus and bursa of Fabricius, decreased of volume density of the thymic cortex, increased of volume density of the thymic medulla, increased of numerical density of bursal follicles,

КРАТКА СОДРЖИНА

Цел на нашата работа беше испитувањето на хистоморфометриските карактеристики на тимусот, бурзата Фабрициус и слезината кај пилињата вакцинирани со вакцина против Марековата болест. За ова истражување се користени еднодневни пилиња од локалната инкубаторска станица од лесна хибридна линија. Пилињата се вакцинирани петтиот ден со бивалентна клеточно-врзана вакцина против Марековата болест (2000 PFU по доза). Две недели по вакцинацијата пилињата и од вакцинираната и од невакцинираната контролна група беа жртвувани и тимусот, бурзата и слезината беа земени и од нив беа приготвени препарати за светлосна микроскопија. За хистоморфометриска анализа беа направени ткивни пресеци со дебелина од 5µm и обоени со хематоксилин-еозин.

Кај пилињата вакцинирани против Марековата болест во споредба со контролните најдовме: намалена телесна тежина и релативна маса на тимусот и бурза Фабрициус; намалена волуменска густина на тимусниот

increased of volume density of medulla of the bursal follicles, increased of the number of secondary follicles in the spleen in comparison with corresponding controls. These results suggest that vaccination induce changes in morphometric characteristic of the thymus, bursa and spleen.

Key words: *Bursa of Fabricius, Marek's vaccine, spleen, thymus*

INTRODUCTION

Marek's disease (MD) is one of the viral infections that attacks poultry and widespread throughout the world. The incidence of MD in poultry flocks is influenced by factor associated with the host and the environmental conditions, as well as , pathogenicity of the causative agent MD virus (Eidson, C.S. et al. 1981). A number of studies have demonstrated the existence in poultry populations of MD virus

(MDV) strains of different pathogenicity (Witter et al. 1980, Powell and Lombardini 1988.) MD cause severe death loss and condemnation in the affected flocks. Prevention of MD can be accomplished by using monovalent or polyvalent vaccines, containing two or tree serotypes. (Bacon, and Witter 1995.)

Most of them are used successfully for vaccination against MDV and are effective and safe.

In some areas where the monovalent vaccine gives poor protection , the use of a bivalent or polyvalent vaccine is recommended for the successful prevention of virulent MDV (Ben-Nathan D., and Lusting S , 1990.)

Natural infection with MDV occurs by inhalation of virus- infected dust and dander, (Beasley et al. 1970.), but the respiratory tract does not appear to be an early site of virus replication . (Addinger, and Calnek ., 1973) It has been speculated that virus is transported to the lymphoid organs by macrophages. So that virus is detectable in the spleen, bursa of Fabricius and thymus 4 days after infection. (Addinger, and Calnek 1973.).

The aim of this study was to investigate histomorphomtrical characteristics of the thymus,

кортекс, зголемена волуменска густина на тимусната медула, зголемена нумеричка густина на бурзалните фоликули, зголемена волуменска густина на медулата на бурзалните фоликули и зголемен број на секундарните фоликули на слезината. Овие резултати покажуваат дека вакцинацијата против Марековата болест предизвикува промени во морфометриските карактеристики на тимусот, бурзата и слезината.

Клучни зборови: *Бурза Фабрициус, Маркова вакцина, слезина, тимус*

ВОВЕД

Марековата болест (МБ) е едно од вирусните заболувања кај живината кое е широко распространето низ целиот свет. Појавата на МБ во едно јато е условена од фактори кои се поврзани со состојбата на јатото и со условите на средината како и со патогеноста на причинителот (6). Голем број на истражувања го докажале присуството на вируси на МБ со различна патогеност (11, 12). Појавата на МБ предизвикува морталитет и конфискување на линијата за колење. Превентивата на ова заболување се состои од употреба на моновалентни или поливалентни вакцини кои содржат два или три сеороти на вирусот (2). Поголемиот дел од нив успешно се користат во превентивата и се ефикасни и сигурни. Во регионите каде моновалентните вакцини не обезбедуваат доволна заштита, се препорачува употреба на бивалентните или поливалентните вакцини во заштитата од вирулентните соеви на вирусот на МБ (4).

Придната инфекција настанува со инхалација на пращината во која се наоѓа вирусот (3), но респираторниот тракт не е примарното место на размножување на вирусот (1). Се претпоставува дека вирусот се пренесува преку макрофагите до лимфоидните органи. Вирусот може да се открие во слезината, бурзата Фабрициус и тимусот четири денови по инфекцијата (1).

Цел на нашето истражување беше утврдување на хистоморфометриските карактеристики на тимусот, бурзата Фабрициус и

bursa of Fabricius and spleen in the 5 day old chickens, vaccinated with the bivalent cell-associated MD vaccine.

MATERIAL AND METHODS

Newly hatched chickens of the light hybrid line, were obtained from local hatchery. These chickens were bred for the purpose of producing eggs. They were fed with commercial food and water *ad libitum*. Two groups were formed: unvaccinated (control) and chickens vaccinated at 5th day of life, with bivalent -associated Marek's disease vaccine (PFU- 2000 per doses). Five chickens from both vaccinated group and unvaccinated controls were sacrificed at 14th day of life. The thymus, bursa of Fabricius and spleen were fixed in Bouin's fixative and processed for light microscopy. The chickens and their bursae, thymuses and spleens were weighed. The serial tissue sections, 5 mm thickness, stained by hematoxylin-eosin, were used for histomorphometrical analysis. Ten sections from each of seven levels, up throwing off 50 sections between each levels, were selected for morphometric measurement using point-counting method (Weibel, 1979). Point hits on the thymic cortex and medulla, and on the cortex and medulla of bursal follicles were registered by test grid M42 and used for determination volume densities of these tissue compartments. The number of follicles and intersections of test lines at the bursal follicles, were calculated for determination of their numerical density per unit volume of bursal tissue.

Student's t-test was used for all statistical analysis.

RESULTS

In the chickens vaccinated against Marek's disease the results showed that body weight (Fig.1), relative mass of their thymuses, bursa of Fabricius and spleens (Fig.2), were significantly decreased ($P < 0.001$).

слезината кај пет дена стари пилиња вакцинирани со бивалентна клеточно-врсана вакцина против МБ.

МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

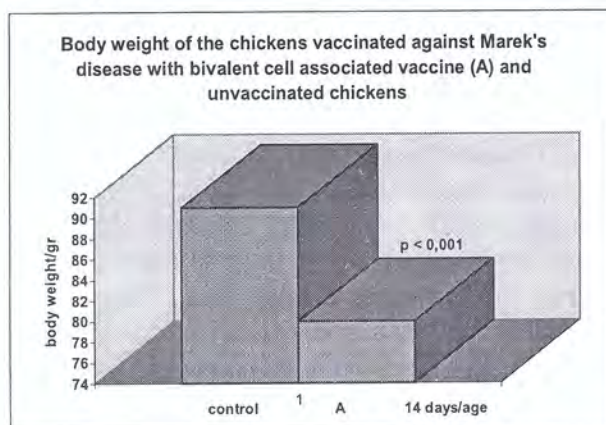
Во испитувањата се земено еднодневни пилиња од лесната хибридна линија од локалната инкубаторска станица. Храна и вода им даваа *ad libitum*. Пилињата беа поделени во две групи: невакцинирана контролна група и група која ја вакцинираа петтиот ден со бивалентна вакцина против МБ (2000 PFU по доза). По пет пилиња од секоја група се жртвувани 14 ден. Беа земено тимусот, бурзата Фабрициус и слезината и без фиксирани со Bouin фиксатив и приготвени за светлосна микроскопија. Пилињата, бурзите, тимусите и слезините беа измерени. За хистоморфометриска анализа беа користени сериски секции на ткивата со дебелина од 5 μ m кои беа обоени со хематоксилин-еозин. За морфометриските мерења со примена на точкаст метод на броене (13) беа користени по десет исечоци од секој од седумте нивоа притоа отфрлајќи по педесет исечоци помеѓу секое ниво. Погодоците (point hits) на тимусниот кортекс и медула, како и на кортексот и медулата на бурзалните фоликули беа регистрирани со помош на мрежичка M42 и користени за детерминација на волуменската густина на одделните делови на ткивата. Бројот на фоликулите и интерсекциите на тест линиите на бурзалните фоликули беа пресметани за одредување на нивната нумеричка густина по единица волумен на бурзалното ткиво. Студент Т-тест беше користен за статистичка обработка на податоците.

РЕЗУЛТАТИ

Кај пилињата вакцинирани против МБ резултатите покажуваат дека телесната тежина (Гр.1), релативната маса на тимусите, бурзата Фабрициус и слезината (Гр.2) се значајно намалени ($P < 0.001$).

Graph 1.

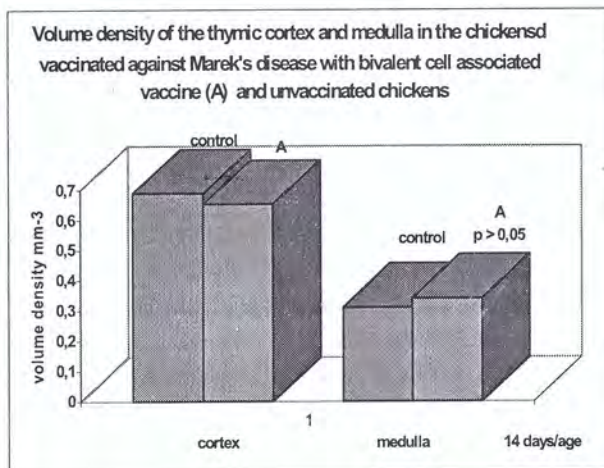
Гр. 1.



The volume density (V_v) of thymic cortex was slightly decreased while the V_v of the thymic medulla was significantly increased ($P < 0,05$), in compare with unvaccinated control (Graph 3).

Graph3.

Гр. 3.

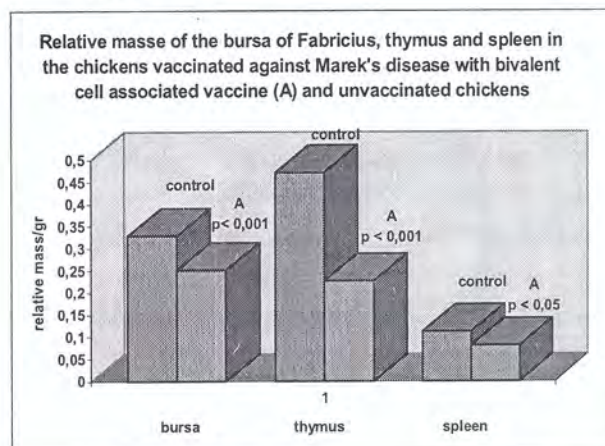


The stereological analysis has shown increase in numerical density of bursal follicles per unit of volume (Graph 4), in vaccinated chickens.

The value for volume density of follicles cortex was lower and the proportion of follicular medulla was significantly ($P < 0,05$) higher (Graph 5) in compare with control. In the spleen of vaccinated chickens number of the lymphoid follicles with

Graph 2.

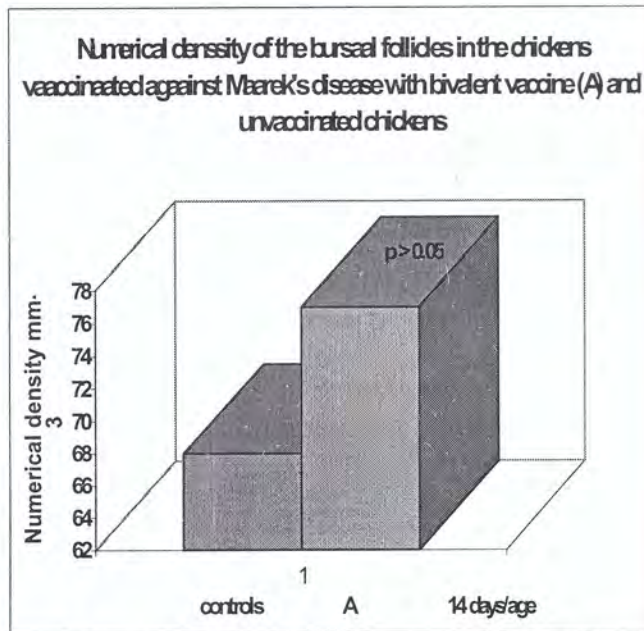
Гр. 2.



Волуменската густина (B_v) на тимусниот кортекс е благо намалена додека B_v на тимусната медула е значајно зголемена ($P < 0,05$) во споредба со невакцинираните контролни пилиња (Гр. 3).

Graph 4.

Гр. 4.



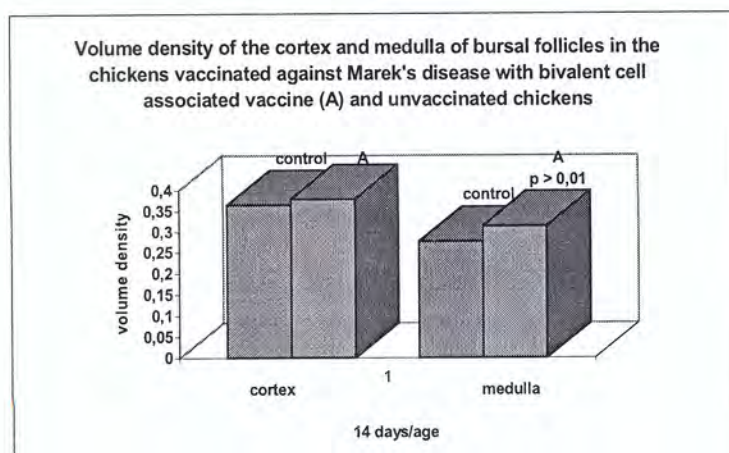
Стереолошките анализи покажуваат зголемување на нумеричката густина на бурзалните фоликули по единица волумен кај вакцинираните пилиња (Гр. 4).

Вредноста на волуменската густина на фоликулите на кортексот е помала и пропорцијата на фоликуларната медула е зна-

germinative centers were increased in comparison with corresponding control.

чајно ($P < 0.05$) поголема во споредба со контролната група (Гр.5). Во слезините кај вакцинираните пилиња зголемен е бројот на лимфоидните фоликули со герминативни центри во споредба со контролната група.

Graph 5.
Гр. 5.



DISCUSSION

Our findings of lymphoid follicles with germinative centers in the spleen may suggest colonel proliferation induced by bivalent-cell associated vaccine. Increasing of the volume density of medullary compartment in the thymus and bursa of Fabricius also support a possibility that vaccination induces activation of cells included in immune response. Having in mind that differentiation of immune competent T (Jameson et al. 1995.) and B cells (Glick, 1994.) has been observed in these organs, and that cortical region is the site for homing of the less mature cells while medulla is the place where mature cells are sited (Boyd et al. 1987., van Ewijk 1991.) our results are in the agreement with such interpretation.

ДИСКУСИЈА

Нашите наоди на лимфоидни фоликули со герминативни центри во слезината може да укажуваат на пролиферација предизвикана со бивалентната клеточно-врзана вакцина. Зголемувањето на волуменската густина на медуларниот дел на тимусот и бурзата Фабрициус исто така одат во прилог на можноста да вакцинацијата предизвикува активација на клетките вклучени во имуниот одговор. Имајќи ги во предвид податоците дека диференцијацијата на имунокомпетентните Т (9) и Б клетки (8) се одвива во овие органи, а дека кортексот е дел каде се наоѓаат незрелите облици додека медулата е дел каде се ситуирани зрелите облици (5, 7) заклучуваме дека нашите резултати се во корелација со ваквите наоди.

REFERENCES

- Addinger, H.K.* and Calnek B.W. (1973.) Pathogenesis of Marek's disease; Early distribution of virus and viral antigens infected chickens. *Journal of the National Cancer Institute*, 50; 1287-1298.
- Bacon, L.D.* and Witter, R.L. (1995.) Efficacy of Marek's disease vaccines in MHC heterozygous chickens: MHC congenic x inbred line F sub (1) matings. *J. hered.* 86: 269-273.
- Beasley, J.N.*, Patterson, L.T. and McWade, D.H. (1970) Transmission of Marek's disease by poultry house dust and chickens dander. *American Journal of Veterinary Research*, 31; 339-344.
- Ben-Nathan D;* Lustig S. (1990 .) Production of Marek's disease vaccine. *Adv-Biotechnol-processes* , 14; 347-65.
- Boyd, R.L.*, Wilson, T.J., Mitrangas, K. and Ward, H.A. (1987.) Characterization of chickens thymic and bursal stromal cells. *Avian immunol.* 1987 Alan R. Liss, Inc, pages 29-39.
- Eidson, C.S.*, Ellis, M.N., Kleven, S.H.; (1981.) Reduced vaccinal protection of turkey herpesvirus against field strains of Marek's disease herpesvirus. *Poultry Sci.*, 60, 317-322.
- van Ewijk W.* (1991.) T-cell Differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Ann. Rev. Immunol.* 9: 591-615.
- Glick, B.* (1994.) The bursa of Fabricius: The evolution of discovery. *Poultry Science* 73; 979-983
- Jameson S. C.*, Hogquist K. A. and Bevan M. J. (1995.) Positive selection of thymocytes. *Ann. Rev. Immunol.* 13: 93-126.
- Jurajda, V.* and Halouzka, R. (1989.) Pathogenicity of a field Marek's disease virus isolate (VUB-83) for chickens of three genetically different types. *Acta Vet. Brno*, 58; 273-279.
- Powell, P.C.*, Lombardini, F.: (1986 .) Isolation of very virulent pathotypes of Marek's disease virus from vaccinated chickens in Europe. *Vet. rec.*, 118, 688-691.
- Witter, R.L.*, Sharma, J. M., Fadly, A.M.; (1980 .) Pathogenicity of variant Marek's disease virus isolants in vaccinated and unvaccinated chickens. *Avian Dis.*, 24, 210-232.
- Weibel, E.R.* (1979) *Practical Methods for Biological Morphometry*. Vol. 1. Academic Press, New York, NY.
-