

**ULOGA HARDEROVE ŽLEZDE U IMUNOM ODGOVORU
PILIĆA SA MATERNALNIM IMUNITETOM NA VAKCINU
PROTIV VIRUSNOG INFEKTIVNOG BRONHITISA***
*ROLE OF HARDERIAN GLAND IN IMMUNE RESPONSE OF CHICKENS
WITH MATERNAL IMMUNITY TO VACCINE AGAINST INFECTIOUS
BRONCHITIS VIRUS*

Ljiljana Spalević, V. Ivetić, Dobrila Jakić Dimić, Danka Maslić Strižak,
A. Potkonjak, N. Pavlović**

U ovom radu je ispitivana uloga Harderove žlezde u imunološkom odgovoru nakon vakcinacije protiv infektivnog bronhitisa (IB). Ogleđom je obuhvaćeno 100 brojlerskih pilića koji su podjeljeni u dve grupe. Ogleđna grupa vakcinisana je prvog dana starosti protiv infektivnog bronhitisa vakcinom Bronhivet I, koja sarži živi atenuirani soj H120. Kontrolna grupa nije imunizovana. Ogleđ je trajao 21 dan. Ispitivani su krvni serumi 1, 7, 14. i 21. dana na prisustvo specifičnih antitela prema infektivnom bronhitisu (ELISA test).

Praćene su histološke promene u građi Harderove žlezde u odnosu na primenjenu vakcinu. Ovim istraživanjem je dokazana uloga Harderove žlezde kao sekundarnog limfoidnog organa kod vakcinacije brojlerskih pilića protiv infektivnog bronhitisa. Prisutna maternalna antitela na IB nemaju negativan uticaj na vakcinaciju pilića prvog dana starosti. Vakcinalni virus delimično oštećuje Harderovu žlezdu.

Ključne reči: Harderova žlezda, infektivni bronhitis, maternalna antitela, sekundarni limfoidni organ

* Rad primljen za štampu 20. 12. 2011. godine

** Mr sc. med. vet. Ljiljana Spalević, spec. vet., istraživač-saradnik, dr sc. med. vet. Vojin Ivetić, viši naučni saradnik, dr sc. med. vet. Dobrila Jakić Dimić, viši naučni saradnik, dr sc. med. vet. Danka Maslić Strižak, naučni saradnik, Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd; dr sc. med. vet. Aleksandar Potkonjak, asistent, Poljoprivredni fakultet, Departman za veterinarsku medicinu, Novi Sad; Nikola Pavlović, spec. med., Naučni institut za veterinarstvo Srbije, Beograd

Uvod / Introduction

Infektivni bronhitis živine (IB) je akutno kontagiozno respiratorno oboljenje virusne etiologije svih starosnih kategorija. Kod mladih pilića se bolest ispoljava kao kataralni bronhitis praćen velikom smrtnošću, a kod starijih se dodatno komplikuje sa sekundarnim bakterijskim infekcijama (Ignjatović i Sapats, 2000). Kod koka nosilja se pored respiratornih simptoma javlja i infekcija jajovoda. Posledično dolazi do usporenog rasta, smanjene nosivosti i promene kvaliteta ljuske jaja (King i Cavanagh, 1991). Uzročnik bolesti je virus iz familije *Nidoviridae*, rod *Coronavirus*. Bolest je proširena u svim zemljama sa razvijenim živinarstvom. Dovodi i do 100% morbiditeta u jatu, jedan je od vodećih uzročnika ekonomskih gubitaka (Engstrom i sar., 2003). Aktivnom imunizacijom se smanjuju gubici u jatu. Nosilje koje se imunizuju protiv IB prenose antitela na potomstvo, ali ta zaštita vremenom pada od početnih 95% prvog dana na 30% sedmog dana (Mondal i Naqui, 2001). Iz tog razloga se brojlerski pilići vakcinišu prvog dana starosti živom atenuisanom vakcinom (Glisson i Kleven, 1993). Značajnu ulogu u imunološkom odgovoru na vakcinaciju ima Harderova žlezda. Žlezda je smeštena ventromedijalno u orbiti i labavo pričvršćena periorbitalnom fascijom ispod mišića (Shirama i sar. 1996). Kod živine je jezičastog oblika (Walcott i sar., 1989). Histostrukturno pripada složenim tubuloalveolarnim žlezdama (Khan i sar., 2007), čiji je izvodni kanal morfološki vidljiv tek posle izlaska iz žlezde (Burns i Maxwell, 1979) gde se otvara u konjunktivalnu vreću na površini trećeg očnog kapka. Kod živine ova žlezda ima dve osnovne funkcije: da proizvodi sekret koji podmazuje treći kapak (Payne, 1994) i da štiti okulonazalni region od antigena (Olah i sar., 1996). Intersticijalno tkivo Harderove žlezde obiluje plazma ćelijama koje sekretuju tri klase imunoglobulina: IgA, IgG i IgM (Ohshima i Hiramatsu, 2002). Na osnovu ovih ispitivanja autori smatraju da Harderova žlezda kao komponenta lokalnog imunog sistema ima značajnu ulogu u protekciji okulonazalne regije kao i da prisutna maternalna antitela ne umanjuju efekat vakcinacije prvog dana starosti pilića.

Materijal i metode rada / Material and methods

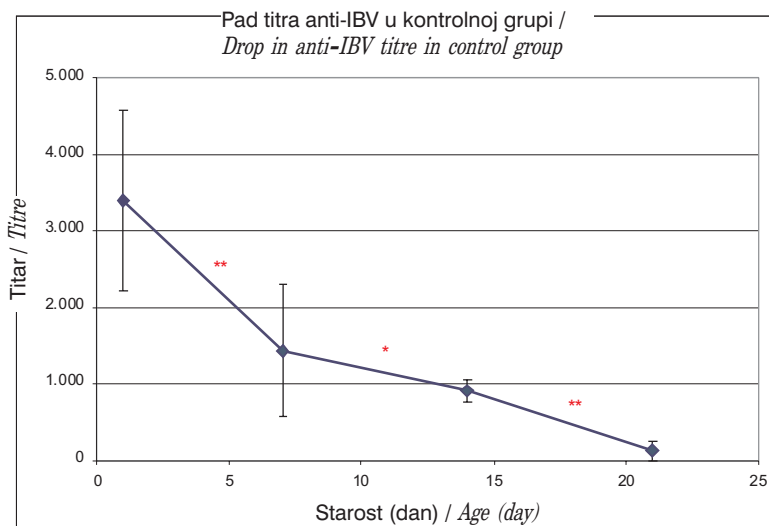
Za predviđena istraživanja korišćeni su jednodnevni brojlerski pilići poreklom od roditeljskih parova provenijence Hybro PG. Program imunoprofilakse kod roditeljskog jata sproveden je prema programu za roditeljske parove. Ogljed je izveden na 100 jednodnevnih brojlerskih pilića oba pola podeljenih u dve grupe – ogledna i kontrolna (O i K) sa po 50 jedinki u grupi. Pilići su hranjeni *ad libitum* kompletnom smešom za ovu starosnu kategoriju. Pilići ogledne grupe stari jedan dan vakcinisani su sprej metodom protiv infektivnog bronhitisa vakcinom Bronhivet I koja sadrži živi atenuirani soj H120. Kod pilića kontrolne grupe nije sproveden nikakav imunološki program. Ogljed je trajao 21 dan.

U predviđenim terminima (1, 7, 14, i 21, dana starosti živine) uzeti su uzorci krvi i izdvojeni krvni serumi za ispitivanje titra antitela na infektivni bronhitis. Izdvojeni serumi su inaktivisani na 56°C (30 min) a zatim ispitani imunoenzimskim testom (ELISA) na prisustvo antitela prema virusu infektivnog bronhitisa.

Za histopatološko ispitivanje, ekstirpirane Harderove žlezde su fiksirane u 10% neutralnom formalinu, zatim dehidrirane u rastućoj koncentraciji alkohola i prosvetljavane u ksilolu. Nakon toga su uklopljene u parafin i isečene na listiće debljine 5 µm pomoću rotacionog mikrotoma. Od svakog bloka je napravljeno 4-5 listića sa različitih dubinskih nivoa koji su zatim bojani hematoksilin-eozinom (HE).

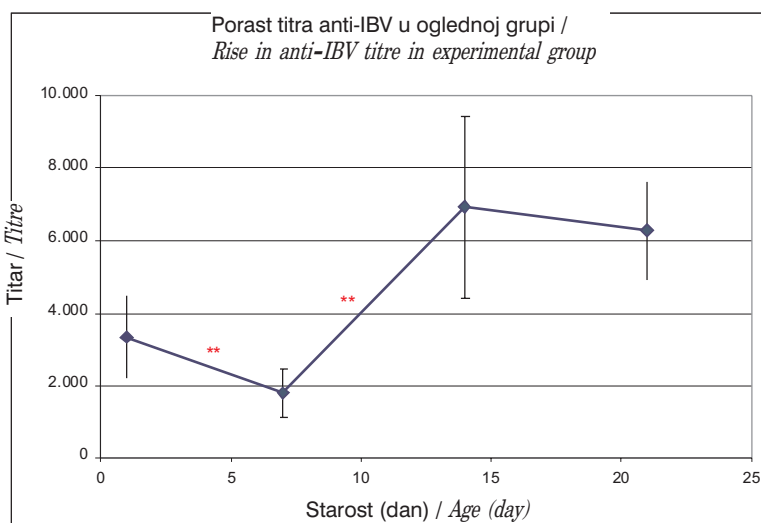
Rezultati i diskusija / Results and Discussion

Na osnovu dobijenih vrednosti visine titra antitela ELISA testom uočeno je prisustvo maternalnih antitela na infektivni bronhitis u obe ogledne grupe.



Grafikon 1. Visina titra antitela u kontrolnoj grupi
Graph 1. Antibody titre values in control group

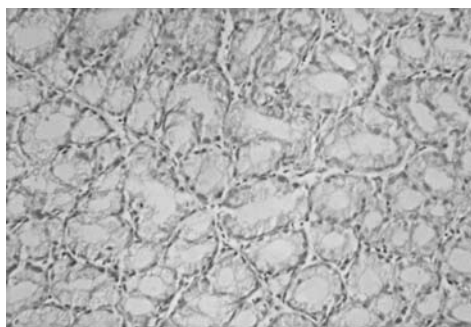
U kontrolnoj grupi (K) od 1. do 7. dana uočava se pad titra antitela koji progresivno pada sve do 21. dana starosti (grafikon 1). U grupi O maternalna antitela opadaju od 1. do 7. dana starosti, a zatim se titar antitela značajno povećava i dostiže maksimum 14. dana. Od 14. do 21. dana visina titra je bez statistički značajne razlike (grafikon 2).



Grafikon 2. Visina titra antitela u ogednoj grupi
Graph 2. Antibody titre values in experimental group

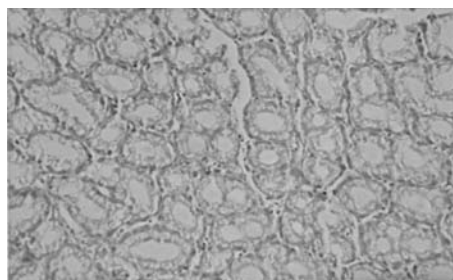
Nivo maternalnih antitela vremenom se smanjuje (Darbyshire i Peters, 1985) i opada linearno, tj. za 5-6 dana je duplo manji. Talebi i sar. (2005) opisuju da se titar maternalnih antitela kod nevakcinisanih pilića za 5-6 dana umanjuje za pola, da bi 21. dana visina izmerenog titra bila jedva merljiva. U našem ogledu titar antitela je spao na pola 7. dana, a 21. je bio negativan (grafikon 1).

Konstatovani pad titra maternalnih antitela se objašnjava serokonverzijom, pa je stoga neophodno izvršiti vakcinaciju pilića već prvog dana života



Slika 1. Harderova žlezda kod pilića starih 7 dana u kontrolnoj grupi. Pojedinačni limfociti i plazma ćelije. H&E, X100

Figure 1. Harderian gland in chicks aged seven days in control group. Some lymphocytes and plasma cells. H&E, X100



Slika 2. Harderova žlezda kod pilića starih 14 i 21 dan u kontrolnoj grupi.

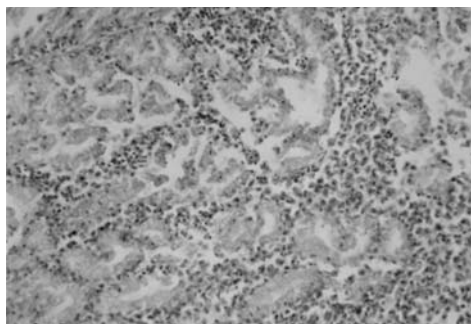
Mali broj limfocita i plazma ćelija u blizini centralnog kanala. H&E, X100

Figure 2. Harderian gland in chicks aged 14 and 21 days in control group. Small number of lymphocytes and plasma cells near central canal. H&E, X100

(Davelaar i Kouwenhoven, 1981) čime se lokalno štiti okulonazalna mukoza od eventualnog prodora virusa infektivnog bronhitisa (Davelaar i Kouwenhoven, 1980b). Značajan porast titra antitela smo ustanovili u oglednoj grupi od 7. do 14. dana, gde je pik dostignut 14. dana (grafikon 2). Povećanje titra antitela u serumu dve nedelje nakon vakcinacije jednodnevnih pilića uočavaju Davelaar (1982), Ignjatović i Galli (1995), što je u saglasnosti sa rezultatima koje smo dobili u toku našeg ispitivanja. Neznatan pad titra smo izmerili od 14. do 21. dana starosti, što se razlikuje od nalaza koje su imali Mockett i Darbyshire (1981). Oni su izmerili povećanje titra antitela 5 dana nakon vakcinacije, a pik je dostignut 21. dana. Razliku u dobijenim rezultatima možemo objasniti eventualnom razlikom u virulentnosti vakcinalnog virusa.

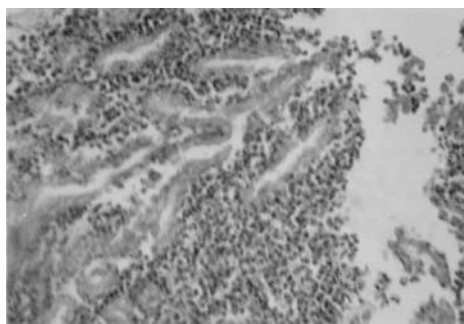
Histopatološkim ispitivanjem Harderove žlezde u kontrolnoj grupi kod pilića starih 7 dana uočavaju se izvodni kanali, pojedinačni limfociti i plazma ćelije (slika 1). Kod pilića starih 14 i 21. dan uočava se neznatno povećanje limfocita i plazma ćelija pored centralnog kanala (slika 2).

U oglednoj grupi 7. dana nakon vakcinacije u histopatološkom nalazu Harderove žlezde uočavaju se limfociti i visokovaskularizovane plazma ćelije u interacinusnim prostorima, a u izvodnim kanalima nađen je sekrecioni sadržaj (slika 3). Davelaar i Kouwenhoven (1976) kod pilića imunizovanih 1. dana života vakcinom H120 nakon 3 dana uočavaju povećanje broja plazma ćelija. Do istih rezultata dolaze i Toro i sar. (1996) koji još opisuju i sekrecioni sadržaj u sakupljačkim kanalima, što je u saglasnosti sa našim nalazima. Harderova žlezda je 14. dana ispunjena velikim brojem limfocita i plazma ćelija koje pokazuju znake destrukcije, a u izvodnim kanalima se nalazi sekret sa detritusom ćelija (slika 4). Iako poveća-



Slika 3. Harderova žlezda kod pilića starih 7 dana u oglednoj grupi. Povećanje broja limfocita i plazma ćelija. H&E, X400

Figure 3. Harderian gland in seven-day-old chicks in experimental group. Increased number of lymphocytes and plasma cells. H&E, X400

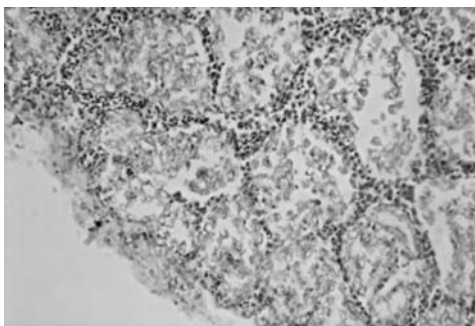


Slika 4. Harderova žlezda kod pilića starih 14 dana u oglednoj grupi. Veliki broj limfocita i plazma ćelija ispunjava žlezdu; blaga destrukcija plazma ćelija. H&E, X400

Figure 4. Harderian gland in 14-day-old chicks in experimental group. Large numbers of lymphocytes and plasma cells fill gland; mild destruction of plasma cells. H&E, X400

nje broja plazma ćelija i limfnih folikula pokazuje imunokompetentnost Harderove žlezde, vakcinalni virus je delimično oštećuje. U prilog tome govore istraživanja koja je sproveo Toro (1996), koji u plazma ćelijama nalazi Raselova telašca i ljušćenje tubulo-epitelnih ćelija. U svojim istraživanjima Davelaar i Kouwenhoven (1980) dve nedelje posle vakcinacije nalaze formirane limfne folikule.

Dvadeset prvog dana veliki broj plazma ćelija je prešao iz žlezdanog epitela u lumen tubula, koji je ispunjen sekretom. Dolazi do destrukcije plazma ćelija i detritusa epitela u izvodnim kanalima (slika 5).



Slika 5. Harderova žlezda kod pilića starih 21 dan u oglednoj grupi.
Veliki broj plazma ćelija, lumen tubula ispunjen sekretom i detritusom epitela.
Prisutna destrukcija plazma ćelija. H&E, X400

Figure 5. Harderian gland in 21-day-old chicks in experimental group.
Large number of plasma cells, tubular lumen filled with secretory material and epithelial detritus.
Destruction of plasma cells is present. H&E, X400

Zaključak / Conclusion

Na osnovu našeg ispitivanja i navoda iz literature došli smo do sledećih zaključaka:

Kod jednodnevnih brojlerskih pilića čiji su roditelji vakcinisani utvrđen je visok nivo maternalnih antitela na infektivni bronhitis, koji vremenom opada usled serokonverzije.

Prisutna maternalna antitela nemaju negativan efekat na imunološki odgovor živine kojoj je vakcina protiv IB aplikovana prvog dana starosti.

Harderova žlezda učestvuje u lokalnom imunološkom odgovoru na aplikovanu vakcinu povećanjem broja plazma ćelija i lučenjem imunoglobulina.

Literatura / References

1. Burns RB, Maxwell MH. The structure of the Harderian gland and lacrimal gland duct of the turkey, fowl and duck. A light microscope study. J Anat 1979; 128: 285-92.
2. Engström B, Eriksson H, Fossum O, Jansson D. Fjäderfäsjukdomar. Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt, 2003.

3. Glisson JR, Kleven SH. Poultry vaccines, In: Peters AR (Ed) Vaccines for veterinary Applications 1993; 165-98.
4. Ignjatović J, Sapats S. Avian infectious bronchitis. Rev Sci Tech 2000; 19(2): 493-508.
5. King DJ, Cavanagh D. Infectious bronchitis. In: Calnek, BM, Barnes, CW. et al. Diseases in poultry. 9.ed. Iowa State University 1991; 471-84.
6. Khan MZI, Jahan MR, Islam MN, Haque Z, Islam MR, Kon Y. Immunoglobulin (Ig) containing plasma cells in the Harderian gland in broiler and native chickens of Bangladesh. Tissue cell 2007; 39: 141-9.
7. Mondal SP, Naqi SA. Maternal antibody to infectious bronchitis virus: its role in protection against infection and development of active immunity to vaccine. Vet Immunol Immunopathol 2001; 79: 31-40.
8. Olah I, Kupper A, Kittner Z. The lymphoid substance of the chickens Harderian gland is organized in two histologically distinct compartments. Microsc Res Tech 1996; 34: 166-76.
9. Ohshima K, Hiramatsu K. Immunohistochemical localization of three different immunoglobulin classes in the Harderian gland of young chickens. Tissue and cell 2002; 34(2): 129-37.
10. Payne AP. The Harderian gland: a tercentennial review. J Anat 1994; 185: 1-49.
11. Shirama K, Satoh T, Kitamura T, Yamada J. The avian Harderian gland: Morphology and immunology. Microscopy Research and Technique 1996; 34: 16-27.
12. Walcott B, Sibony PA, Keyser KT. Neuropeptides and the innervation of the avian lacrimal gland. Invest Ophthalmol Vis Sci 1989; 30(7): 1966-74.

ENGLISH

ROLE OF HARDERIAN GLAND IN IMMUNE RESPONSE OF CHICKENS WITH MATERNAL IMMUNITY TO VACCINE AGAINST INFECTIOUS BRONCHITIS VIRUS

Ljiljana Spalevic, V. Ivetić, Dobrila Jakic-Dimic, Danka Maslic-Strizak, A. Potkonjak, N. Pavlovic

In this study we investigated the role of the Harderian gland in the immune response following vaccination against infectious bronchitis (IB). The experiment was carried out on 100 broiler chicks which were divided into two experimental groups.

Experimental group O was vaccinated on the first day of age against infectious bronchitis with vaccine Bronhivet I batches that contain a live attenuated strain H120 and the control group did not get immunized. The experiment lasted 21 days. Blood sera were examined on days 1, 7, 14 and 21 for the presence of specific antibodies against infectious bronchitis (ELISA test).

Histological changes were observed in the structure of the Harderian gland in relation to the applied vaccine. This research demonstrated the role of the Harderian gland as a secondary lymphoid organ in broiler vaccination against infectious bronchitis.

Maternal antibodies present in the IB had no negative impact on the vaccination of chickens on the first day of age. The vaccine virus partially damaged the Harderian gland.

Key words: Harderian gland, infectious bronchitis, maternal antibodies, secondary lymphoid organ

РОЛЬ ЖЕЛЕЗЫ ХАРДЕРА В ИММУННОМ ОТВЕТЕ ЦИПЛЯТ С МАТЕРИНСКИМ ИММУНИТЕТОМ НА ВАКЦИНУ ПРОТИВ ВИРУСНОГО ИНФЕКЦИОННОГО БХРОНХИТА

Лиляна Спалевич, Добрила Якич-Димич, Данка Маслич-Стрижак, А. Поткоњак, Н. Павлович

В этой работе испытана роль железа Хардера в иммуноогическом ответе после вакцинации против инфекционного бронхита (ИБ). Опыт охвачено 100 бройленых цыплят, которые разделены в две опытные группы. Опытная группа 01 вакцинирована первого дня старости против инфекционного бронхита вакциной Бронхивет I, содержащая живой аттенюированный штамм H120 и контрольная группа, которая не иммунизирована. Опыт продолжался 21 день. Испытаны кровяные сыворотки 1, 7, 14 и 21 дня на присутствие специфических антител согласно инфекционному бронхите (ELISA тест).

Слежены гистологические изменения в строении железы Хардера в отношении применённой вакцины. Этим исследованием доказана роль железы Хардера как вторичного лимфоидного органа у вакцинации бройлерных цыплят против инфекционного бронхита. Присутствующие материнские антитела на ИБ не имеют отрицательное влияние на вакцинацию цыплят в первом дне старости. Вакцинальный вирус частично повреждает железу Хардера.

Ключевые слова: железа Хардера, инфекционный бронхит, материнские антитела, вторичный лимфоидный орган