

CAMBIOS EN LA GLÁNDULA DE HARDER EN POLLOS INOCULADOS CON CEPAS B15 Y H13 DE VIRUS DE BRONQUITIS INFECCIOSA

Changes in the avian harderian gland inoculation chickens with B15 and H13 cells of infectious bronchitis virus infection

Gary D. Butcher*
Amelia Luengo C.* **

* Departamento de Ciencias Clínicas de Grandes Animales
Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad de Florida
Gainesville, Florida, USA

** Departamento Médico-Quirúrgico
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia
Maracaibo, Zulia, Venezuela

RESUMEN

A los 28 días luego de la inoculación con vacuna virus de B15-IB por vía ocular de pollos de 7 días de edad, libres de patógenos (SPAFAS, Inc. Norwich, Connecticut, USA) con vacunas de cepas B15 de virus de bronquitis infecciosa (VBI), se observó en la glándula de Harder un marcado incremento en el número de células plasmáticas y en la formación de folículos linfoides.

En contraste, en los pollos no inoculados (control), a los 35 días de edad, solamente se encontraron presentes un pequeño número de células plasmáticas en el estroma intersticial de la glándula cerca de los ductos colectores principales y muy pocos folículos linfoides. Los pollos que recibieron líquido alantoideo diluido, vía ocular, a los 7 y 28 días de edad, tuvieron un ligero incremento en el número de células plasmáticas.

La inoculación vía ocular en pollos a los 28 días de edad con la cepa VBI-H13 de virus de campo vacunados a los 7 días de edad, resultó en hiperemia, cambios degenerativos en las células plasmáticas y linfoides y en un incremento en el número de folículos linfoides en las glándulas de Harder a los 35 días de edad. Las lesiones en las glándulas de Harder de los pollos no vacunados e inoculados con VBI-H13 a los 28 días de edad por vía ocular incluyeron una intensa hiperemia, cambios degenerativos marcados en las células plasmáticas y vesiculación de las células epiteliales glandulares. En este grupo

se encontraron pocos folículos linfoides en las glándulas de Harder a los 35 días de edad.

El virus de IB fue aislado de la tráquea, glándula de Harder y riñón luego de 7 días de la inoculación ocular con VBI-H13 en pollos de 28 días de edad en ambos grupos vacunados y no vacunados con VBI-B15. No se aisló el virus en los pollos que recibieron solamente vacuna VBI-B15 a los 7 días, en los que fueron inoculados con líquido alantoideo, y en los del grupo control. Daño celular asociado con el virus VBI-H13 fueron observados por medio de microscopía electrónica en cortes ultrafinos de tráquea, glándula de Harder y en el riñón de pollos vacunados y desafiados o inoculados solamente con VBI-H13.

Palabras claves: Bronquitis infecciosa, virus, glándula de Harder.

ABSTRACT

Twenty-eight days following eyedrop inoculation of 7 day-old (SPAFAS, Inc. Norwich, Connecticut, USA) chickens with B15-IB vaccine virus, a marked increase in plasma cell numbers and in the formation of lymph nodule occurred in the Harderian gland. In the glands of uninoculated control chickens after 35 days of age, only small numbers of plasma cells were present in the interstitial stroma of the gland near the main collecting ductules. Lymph nodules were rare. Chickens administered diluted allantoic fluid by the eyedrop route at 7 and 28 days of age had a limited increase in plasma cell numbers. Eyedrop inoculation of 28 day-old chickens with

H13-IB field virus, vaccinated with B15-IBV at 7 days of age, resulted in hyperemia, degenerative changes in the plasma cells and lymphoid cells, and increased numbers of lymphoid nodules in the Harderian glands at 35 days of age. Lesions in the Harderian glands of unvaccinated chickens inoculated with H13-IBV at 28 days of age by the eyedrop route included an intense hyperemia, marked degenerative changes in plasma cells, and vesiculation of glandular epithelial cells. Few lymph nodules were present in the Harderian glands in this group at 35 days of age.

The virus of IB was isolated from trachea, Harderian gland, and kidney 7 days following eyedrop inoculation of 28 day-old chickens with H13-IBV, in both the B15-IBV vaccinated and unvaccinated groups. No virus was isolated from chickens receiving only B15-IB vaccine virus at 7 days of age, those inoculated with diluted allantoic fluid, or those in the uninoculated control group. Cellular damage associated with virions were observed by electron microscopy in sections of trachea, Harderian gland and kidney from chickens vaccinated and then challenged with H13-IBV; and in trachea, Harderian gland, and kidney in chickens inoculated with H13-IBV only.

Key words: Infectious bronchitis, virus, Harderian gland.

INTRODUCCIÓN

En las aves, la glándula de Harder se encuentra en el área ventral y caudomedial de la órbita del ojo [12]. Estas glándulas, también llamadas glándulas lagrimales accesorias, glándula del tercer párpado y glándulas de la membrana nictitante, son relativamente grandes en las aves de corral, siendo mucho más grandes que las glándulas lagrimales y probablemente reemplazan su función [21]. La estructura microscópica de la glándula de Harder en las aves de corral ha sido descrita previamente [4,6,7,8,11,16,20,22].

La glándula de Harder en pollitos recién nacidos no tiene células plasmáticas [21]. Durante las primeras semanas luego del nacimiento, estas células se infiltran en la glándula progresivamente [1,16,20,21]. Algunos autores sugieren que el estímulo principal para la infiltración de las células plasmáticas es el contacto natural entre los antígenos ambientales y la mucosa bucal [12]. Se demostró que en el infiltrado celular hay una población relativamente pura de células linfáticas que son dependientes de la bolsa de Fabricio y que contienen inmunoglobulinas [2,3].

La inoculación de pollos con VBI vía ocular o nasal resulta en un acelerado incremento del número de células plasmáticas, junto con un aumento en la vascularización en el estroma de la glándula de Harder a los tres días postinfección [13]. La infección con un VBI virulento puede dañar directamente las células inmunocompetentes en la glándula de Harder [14,20] e impedir la formación y el reclutamiento de células plasmáticas [12]. En el presente trabajo se describen los cambios micros-

cópicos en la glándula de Harder luego de la vacunación y desafío con cepas B15 y H13 de VBI.

MATERIALES Y MÉTODOS

Virus: Las cepas Massachusetts B15 de VBI (80 pases en embrión de pollo) y H13 (2 pases en embrión de pollo) fueron suministradas por el Dr. R.W. Winterfield, Purdue University, W. Lafayette, Indiana, EUA. La patogenicidad de la cepa B15 y H13 en pollos ha sido descrita previamente [8]. La fuente y características de esta cepa B15 nefropatogénica de VBI también ha sido descrita previamente [8,9,10]. Las cepas B15 y H13 de VBI han sido identificadas serotípicamente por neutralización de virus alfa [5,8,9,10].

Propagación del virus: Una muestra de cada cepa de virus que se obtuvo para el estudio se pasó a través de un filtro Millipore de 0.22 μ m, purificándose luego por dilución terminal (3 pases) en huevos embrionados de pollos libres de patógenos (SPAFAS, Inc. Norwich, Connecticut) de 10 días de edad. Cada una de las cepas de VBI purificadas se propagó en huevos embrionados SPAFAS de 10 días de edad. Se recolectó líquido corioalantoideo 20 a 24 horas postinoculación [14]. El líquido alantoideo recolectado se almacenó en alícuotas de 1 ml a -70°C . Cada una de las dosis 50, de infección de embriones (EID_{50}) de VBI-B15 y VBI-H13, se calcularon según el método de Reed y Muench [19]. Antes del uso del líquido alantoideo recolectado se comprobó por cultivo que no había contaminación bacteriana.

Administración del virus: Para la vacunación o para el desafío, los virus se administraron mediante una gota en ambos ojos. La dosis fue ajustada en un caldo de fosfato de triptosa (por 1 ml: 10 unidades de penicilina, 0.01 g de dihidrostreptomomicina, 0.001 g de neomicina, 100 unidades de bacitracina) para lograr aproximadamente 10^4 EID_{50} por ave. A un grupo de aves no vacunadas ni desafiadas con virus se les administró líquido alantoideo diluido en caldo de fosfato de triptosa vía ocular.

Procedimiento experimental: Huevos fértiles fueron incubados y se obtuvieron 125 pollitos (SPAFAS), los cuales se dividieron al azar en 5 grupos de 25 pollitos y se mantuvieron en unidades de aislamiento Horsfall modificadas, durante el tiempo que duró el experimento. Al grupo 1 se le mantuvo como control sin inocular; al grupo 2 se le desafió por vía ocular con VBI-B15 a los 7 días de edad; al grupo 3 se le vacunó por vía ocular con VBI-B15 a los 7 días de edad y luego se le desafió con VBI-H13 a los 28 días de edad; al grupo 4 se le desafió por vía ocular con VBI-H13 a los 28 días de edad. Al grupo 5 se le administró líquido alantoideo diluido por vía ocular a los 7 y 28 días de edad. Todos los pollitos fueron sacrificados y necropsiados a los 35 días de edad.

Necropsia: La necropsia se llevó a cabo a los 35 días de edad luego de sacrificar los pollos por decapitación. Se ex-

TABLA I

Grupo	Tratamiento	Necropsia	Histopatología Gl. Harder	Bolsa Fabricio	Aislamiento Virus del VBI
1	Control (7 días)	35 días	< Celulas plasmáticas SLM	SLM	No
2	Desafío VBI-B15 (7 días)	35 días	> Celulas plasmáticas > Folículos linfoides .	SLM	No
3	1. Vacuna VBI-B15 (7 días) 2. Desafío VBI-H13 (28 días)	35 días	> Celulas plasmáticas < Linfocitos -Hiperemia -Alt. degenerativas de epitelocitos -Cuerpos de Russell -Linfocitos	SLM	13/25 Gl. Harder 15/25 Tráquea 8/25 Riñón
4	Desafío VBI-H13 (28 días)	35 días	> Cel. plasmáticas -Hiperemia severa -Alt. degenerativas de epitelocitos y células plasmáticas -Hemorragia -Necrosis	SLM	25/25 Gl. Harder 23/25 Tráquea 18/25 Riñón
5	Líquido alantoideo (7-28 días)	35 días	≥ Celulas plasmáticas < Folículos linfoides	SLM	No

< Escaso número

> Severo incremento

≥ Leve incremento

SLM: Sin Lesiones Microscópicas aparentes

VBI: Virus Bronquitis Infecciosa

trajo de cada pollo, la glándula de Harder del ojo derecho y la bolsa de Fabricio. Los tejidos se fijaron en una solución buffer al 10% de formalina, se incluyeron en parafina, se hicieron cortes de 6 µm y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) o ácido peryódico de Schiff (PAS) para la observación histológica de rutina. Los cortes de la glándula de Harder de cada pollo se evaluaron en base a la infiltración de linfocitos, células plasmáticas, hiperemia, formación de folículos linfoides y cambios degenerativos en el epitelio glandular y en las células infiltrantes. Muestras de tráquea, glándula de Harder izquierda y riñón fueron tomados de cada ave para el aislamiento del virus. Los tejidos se colocaron en 3 ml de fosfato de triptosa y se almacenaron a -70°C. Seguidamente, los tejidos se descongelaron, se maceraron y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se inocularon 5 huevos embrionados de 10 días de edad por cada muestra de tejido, observándose luego los cambios típicos de la infección de VBI [8,9]. Los cortes de tráquea, glándula de Harder derecha y riñón de cada pollo se fijaron en una mezcla de glutaraldehído al 3% en buffer de fosfato (0.1M. pH 2.3), siendo procesados y teñidos con acetato de uranilo y citrato de plomo para su observación por microscopía electrónica de transmisión.

RESULTADOS

Histopatología

Grupo 1: En los pollos a los 35 días de edad que no fueron inoculados, en algunas áreas del estroma glandular y rodeando el lumen central de la glándula de Harder, se encontraron escasas células mononucleares, FIG. 1. La morfología de estas células era característica de las células plasmáticas, incluyendo un núcleo localizado excéntricamente con la cromatina marginal. El citoplasma de estas células se tiñó intensamente con PAS. Se observaron pocos folículos linfoides asociados típicamente con vasos sanguíneos en el tejido conectivo subcapsular y septal, TABLA I.

Grupo 2: Los cambios en la glándula de Harder a los 35 días de edad en pollos que recibieron vacuna VBI-B15 a los 7 días, consistieron en infiltración severa de células plasmáticas e incrementado número de folículos linfoides, FIG. 2. El citoplasma de las células infiltrantes se tiñó intensamente con PAS. Pocas células plasmáticas estuvieron presentes en el lumen glandular. Los folículos linfoides estuvieron presentes en toda la extensión de la glándula. Las células en los folículos tuvieron características morfológicas de linfocitos y su citoplasma no se tiñó con PAS, TABLA I.

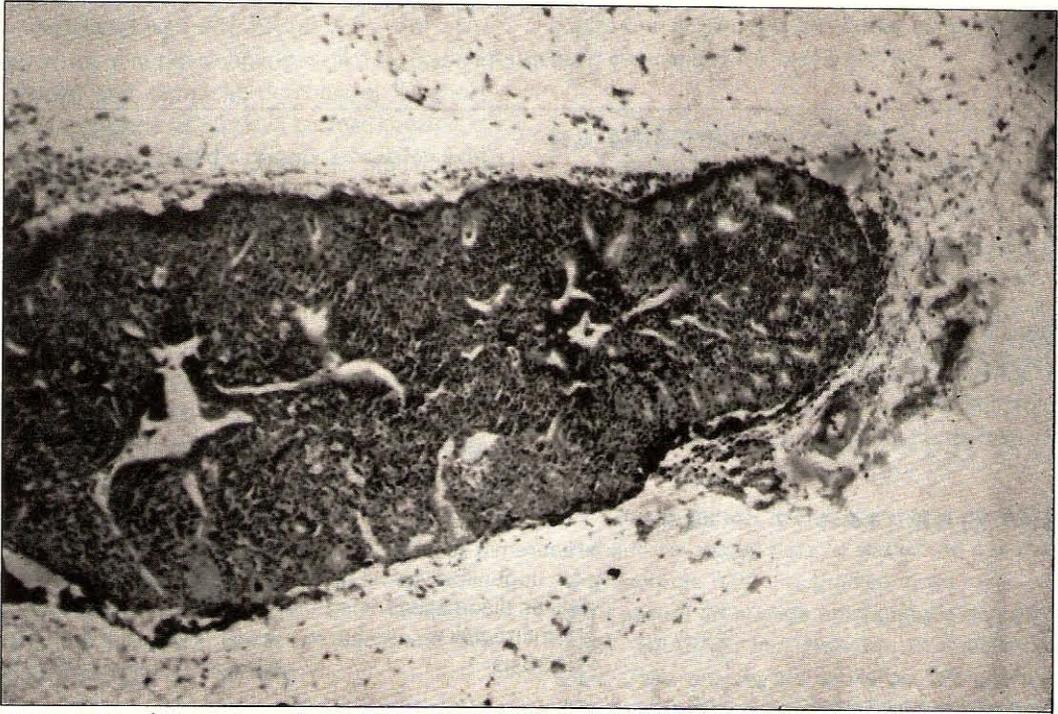


FIGURA 1. MICROGRAFÍA DE LA GLÁNDULA DE HARDER DE POLLOS DE 35 DÍAS DE EDAD, QUE NO FUERON INOCULADOS (CONTROL). ESCASO NÚMERO DE CÉLULAS PLASMÁTICAS ESTÁN PRESENTES EN EL ESTROMA GLANDULAR. H&E. 56X.

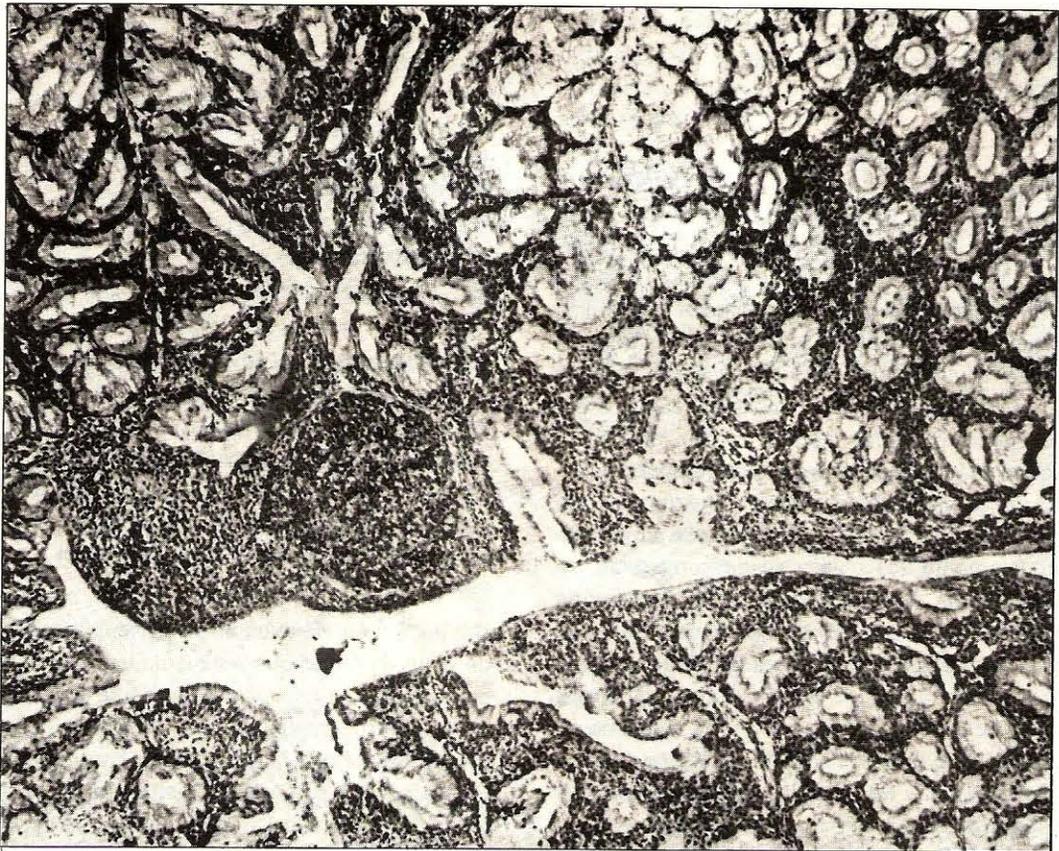


FIGURA 2. MICROGRAFÍA DE LA GLÁNDULA DE HARDER DE POLLOS DE 35 DÍAS DE EDAD, INOCULADOS CON VBI-B15 A LOS 7 DÍAS. INFILTRACIÓN SEVERA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS Y FORMACIÓN DE FOLÍCULOS LINFÓIDES. H&E. 88X.

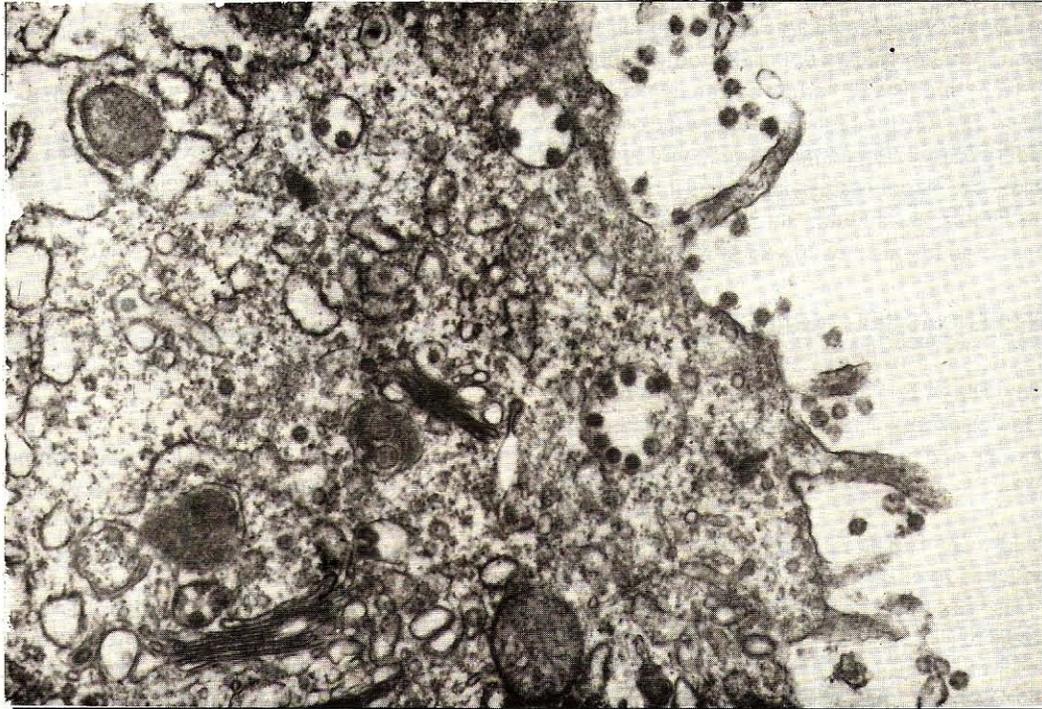


FIGURA 3. MICROGRAFÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN DE LA GLÁNDULA DE HARDER DE POLLOS INOCULADOS CON VBI DE 35 DÍAS DE EDAD. SE OBSERVAN PARTÍCULAS VIRALES EN VACUOLAS DEL CITOPLASMA Y EN LA SUPERFICIE DE LAS CÉLULAS EPITELIALES. 5.600X.

Grupo 3: Las glándulas de Harder de pollos de 35 días de edad vacunados a los 7 días de edad y desafiados a los 28 días de edad (Grupo 3), revelaron un incremento en la infiltración de células plasmáticas en comparación con la del grupo 2, vesiculización leve de epitelocitos glandulares y un marcado incremento en la vascularización e hiperemia de los vasos sanguíneos con hemorragia hacia los tejidos conectivos intertubulares e interacinarios. Se encontraron muy pocos linfocitos y células plasmáticas con núcleos degenerativos. La coloración con PAS reveló que muchas células plasmáticas poseían aglomeraciones de proteínas características de los cuerpos de Russell, TABLA I.

Grupo 4: Las glándulas de Harder de pollos a los 35 días de edad inoculados con VBI-H13 a los 28 días de edad presentaron hiperemia severa con extravasación de eritrocitos a lo largo del estroma glandular, severa infiltración de células plasmáticas en la glándula, vesiculización de epitelocitos glandulares y presencia de restos celulares en el lumen glandular. No fue evidente la formación de folículos linfoides. Se observó infiltración severa de células plasmáticas con alteración degenerativa, vesiculización del citoplasma y núcleo, con varios estados de degeneración, TABLA I.

Grupo 5: Los cambios en la glándula de Harder en pollos de 35 días de edad, que se les administró líquido alantoideo diluido a los 7 y 28 días de edad, mostraron ligero incremento en el número de células plasmáticas infiltrantes, principalmente en los recesos secundarios y rodeando el lumen central glandular.

También se observaron células plasmáticas dispersas en el estroma intersticial y pocos folículos linfoides, TABLA I. No se encontraron lesiones histopatológicas evidentes en la bolsa de Fabricio en ninguno de los grupos bajo estudio.

Aislamiento del virus: El virus de la bronquitis infecciosa se aisló de la glándula de Harder en 13 de los 25 pollos (13/25), en (15/25) en tráquea y en (8/25) en riñón, en el grupo 3 (vacunados con VBI-B15 y desafiados con VBI-H13); y en la glándula de Harder (25/25), en tráquea (23/25) y riñón (18/25) en pollos del grupo 4 (desafiados con VBI-H13). No se aisló VBI en los pollos control (Grupo 1), pollos inoculados con VBI-B15 (Grupo 2), ni en los pollos que se les administró líquido alantoideo diluido (Grupo 5).

Microscopía Electrónica: Las partículas virales asociadas con el daño celular fueron identificadas en cortes ultrafinos de tráquea y de la glándula de Harder de los pollos en el grupo 3 y en cortes ultrafinos de tráquea, glándula de Harder y riñón de pollos del grupo 4. No se observaron partículas virales en los cortes de los pollos control (Grupo 1), pollos vacunados con VBI-B15 solamente (Grupo 2) o pollos que se les administró líquido alantoideo diluido (Grupo 5).

En cortes ultrafinos de tráquea y de la glándula de Harder de pollos en los grupos 3 y 4, partículas de virales fueron identificadas en las células de la superficie epitelial y dentro de vesículas citoplasmáticas, FIG. 3. Los virus se identificaron fácilmente en la mayoría de los cortes examinados.

Los viriones también se identificaron dentro de las vesículas en el citoplasma de las células epiteliales de los túbulos contorneados del riñón de pollos del grupo 4. Las células afectadas habían pasado por un proceso de degeneración incluyendo dilatación del retículo endoplasmático rugoso y tumefacción y vacuolización de mitocondrias. Los virus observados fueron típicamente circulares, aunque se observó algún polimorfismo y el diámetro de los mismos fue de 90 a 130 nm.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Aitken, I.D. and Parry, S.H. Local immunity in the respiratory tract of the chicken. I. Transudation of circulating antibody in normal and virus-infected birds. *Immunology* 31:33-37. 1976.
- [2] Albini, B.; Wick, G.; Rose, E. and Orleans, E. Inmunoglobulin production in chicken Harderian glands. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 47:23-24. 1974.
- [3] Albini, B. and Wick, G. Immunoglobulin determinants on the surface of the chick lymphoid cells. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* 44:804-822. 1973.
- [4] Bang, B.G. and Bang, F.B. Localized lymphoid tissues and plasma cells in paraocular and paranasal organ systems in chickens. *Journal of Pathology* 53:735-751. 1968.
- [5] Beard, C.W. Serologic Procedures. In Hitchner, S.B.; Domermuth, C.H.; Purchase, H.G.; Williams, J.E. (eds): *Isolation and identification of avian pathogens*, 2nd ed. American Association of Avian Pathologist, College Station, Texas, pp. 129-135. 1980.
- [6] Burns, R.B. Plasma cells in the avian Harderian gland and the morphology of the gland in rook. *Canadian Journal of Zoology* 53:1258-1269. 1975.
- [7] Burns, R.B. and Maxwell, M.H. The structure of the Harderian gland and lacrimal glands ducts of the turkey, fowl, and duck. A light microscope study. *Journal of Anatomy* 128 (2):285-292. 1979.
- [8] Butcher, G.D. Pathogenesis, tissue tropism, and biochemical characterization of pneumotropic, nephrotropic, and vaccine strains of the infectious bronchitis virus. Ph.D. Dissertation, Texas A & M University, College Station, Texas. 1987.
- [10] Butcher, G.D.; Winterfield, R.W. and Shapiro, D.P. An outbreak of nephropathogenic H13 infectious bronchitis in commercial broilers. *Avian Diseases* 33:823-826. 1989.
- [11] Chiquoine, A.D. The identification and electron microscopy of myoepithelial cells in the Harderian gland. *Anatomic Record*. 132:569-577. 1958.
- [12] Davelaar, F.G. and Kouwenhoven, B. Changes in the Harderian gland of the chicken following conjunctival and intranasal infection with infectious bronchitis virus in one- and 20-day-old chickens. *Avian Pathology* 5:39-50. 1976.
- [13] Davelaar, F.G. and Kouwenhoven, B. Effect of the removal of the Harderian gland in 1-day old chicks on immunity following IB vaccination. *Avian Pathology* 9:491-497. 1980.
- [14] Hofstad, M.S. Avian infectious bronchitis. In Hofstad, M.S.; Barnes, H.J.; Calnek, B.W.; Reid, W.M.; Yoder, H.W. (eds): *Diseases of Poultry*, 8th ed. Ames, Iowa State University Press, pp 429-443. 1984.
- [15] MacDonald, J.W.; Randall, C.J.; McMartin, D.A.; Douglass, M.D. and Gazdzinski, P. An inverse age resistance of chicken kidneys to infectious bronchitis virus. *Avian Pathology* 10:121-129. 1981.
- [16] Mueller, A.P.; Sato, K. and Glick, B. The chicken lacrimal gland, gland of Harder, cecal tonsil, and accessory spleen as sources of antibody producing cells. *Cellular Immunology* 2:140-152. 1971.
- [17] Powell, J.R.; Aitken, I.D. and Survashe, B.D. The response of the Harderian gland of the fowl to antigen given by the ocular route. II. Antibody production. *Avian Pathology* 8:363-373. 1971.
- [18] Raggi, L.G. and Lee, G.G. Lack of correlation between infectivity, serologic response and challenge results in immunization with an avian infectious bronchitis vaccine. *Immunology* 94:538-543. 1965.
- [19] Reed, L.J. and Muench, H. A simple method of estimating 50 percent endpoints. *American Journal of Hygiene* 27:493-497. 1938.
- [20] Survashe, B.D.; Aitken, I.D. and Powell, J.R. The response of the Harderian gland of the fowl to antigen given by the ocular route. I. Histological changes. *Avian Pathology* 8:77-93. 1979.
- [21] Wight, P.A.L.; Burns, R.B.; Rothwell, B. and Mackenzie, G.M. The Harderian gland of the domestic fowl. I. Histology with reference to the genesis of plasma cells and Russell bodies. *Journal of Anatomy* 110:307-315. 1971.
- [22] Woodhouse, M.A. and Rhoden, J.A.G. The ultrastructure of the Harderian gland of the mouse with particular reference to the formation of the secretory product. *Journal of Ultrastructure Research* 9:76-98. 1963.