

E. SUMMARY

The HAIT contains several organs localized within the head region and lymphoid tissues aggregated in the mucosal linings in this area. These are the Harderian glands, the lacrimal glands, lymphoid aggregations within mucosal membranes of eyelid conjunctivas and the nasal cavity. In order to investigate the development of cell populations within these organs after hatching, the prevalence and proportion of immunoglobulin-positive cells, T-cell populations (CD8, CD4) and macrophages in different lymphoid tissues and the cell mediated immunity were determined in 1-, 7-, 11-, 18-, 26-, 32-, 49- and 61-day-old broilers. For this, polyclonal antisera were used to detect immunoglobulin-positive (IgM, IgG or IgA, respectively) cells and monoclonal antibodies for the detection of the CD8 and CD4-positive T-cell subpopulations and for macrophages, the latter detected by M74 2 monoclonal antibodies. The investigations were performed to examine the changes of these immune cells in unvaccinated conventional broilers in comparison to those which were immunized with live-attenuated IB and ND vaccines. In addition, the lateral nasal glands and the mucosal linings of the middle ear cavity were also determined to study immunological relevant cell populations, possibly localized within this area.

Immunohistochemical techniques were employed in this study to investigate immune cells within the head region. For this, optimization of the techniques were necessary prior to the main investigations. It was found that the modified indirect immunoperoxidase techniques resulted in satisfactory specific staining of immunoglobulin-positive cells when organs investigated were PLP-fixed, paraffin-embedded, EDTA-NH₄OH-decalcified and pretreatment with trypsin solution. On the other hand, unfixed, EDTA-NH₄OH-decalcified, cryostat sections without pretreatment were suitable for immunohistochemical labelling of T-cell populations and macrophages.

In the *Harderian glands* of unvaccinated broilers, IgM- and IgA-positive cells were detected after hatching, while IgG-positive cells developed later. The number of all immunoglobulin-positive cells increased continuously throughout these investigations. Immunoglobulin-positive cells could be seen in interstitial tissues, in the periphery and within the aggregations of lymphocytes in the central secretory canal and primary branches of the glands. After

vaccination, all of these cells increased markedly during day 1 to 18. Thereafter, a drop was observed followed by a rapid increase of cell numbers. CD8- and CD4-cells developed in the similar way and increased throughout this study. CD8-cells were dominant, except in 7-day-old chickens. As compared to unvaccinated broilers, CD8- and CD4-cells increased markedly following ocular (conjunctival) application of live-attenuated IBV and NDV vaccines at day 1 and 7, respectively. T-cell populations were evident in the stroma along the main secretory duct, in the interstitium of the gland. Also, some cells were scattered around and within lymphoid aggregations. M74.2-positive staining was seen in all chickens from unvaccinated and vaccinated groups after hatching. More M74.2-macrophages were seen in vaccinated broilers associated with the increase of lymphoid aggregations compared to unvaccinated broilers. M74.2-macrophages were also detected throughout the interstitium and stroma beneath the main secretory duct of the Harderian gland.

In the *lacrimal glands* of broilers, IgM-, IgG- and IgA-positive cells were found. No differences in numbers of these immune cells within unvaccinated and vaccinated broilers could be distinguished. Immunoglobulin-positive cells were disseminated within the interstitial tissues throughout the glands, some cells scattered beneath the main collecting ducts and around lymphoid nodules. CD8-cells, CD4-cells and M74.2-macrophages also existed in all birds investigated. CD8- and CD4-cells appeared in the interstitium of the lacrimal glands, disseminated densely in epithelial linings and connective tissues beneath the lacrimal duct. Some T-cell populations were seen scattered within the lymphoid nodules. M74.2-macrophages were seen in the interstitial tissues, stroma tissues beneath lacrimal ducts. Aggregations of lymphoid tissue were evident in some birds and localized mainly along the lacrimal gland duct. A higher number of T-cell populations compared to immunoglobulin-positive cells were detected, particularly within aggregations of lymphocytes. These cells accumulated around and within these lymphoid aggregations.

No immunoglobulin-positive cells were seen in the *eyelid conjunctivas* at day of hatch. IgM-positive cells developed earlier and occurred in the proximal fold of the lower eyelid of 7-day-old vaccinated broilers. Differences in the prevalence of immunoglobulin-positive cells between unvaccinated and vaccinated broilers were not seen in this study. IgM-positive cells were dominant in the upper and lower conjunctivas after day 18. IgG- and IgA-positive cells were occasionally found. CD8- and CD4-cells were also present in the upper and lower

conjunctivas. No differences in the number and distribution of CD8- and CD4-cells were seen. However, a distinctly higher number of T-cell populations was seen following vaccination. T-cell populations were detected randomly in the epithelial layer, below mucosal conjunctivas and within lymphoid aggregations at the proximal fold of the lower conjunctivas. T-cell populations were also found in the mucosal membranes lining around the opening of the nasolacrimal duct in the upper conjunctiva. M74.2-macrophages could also be detected in the upper and lower conjunctivas after hatching. Unvaccinated chickens showed less positive cells compared to vaccinated chickens. M74.2-macrophages were disseminated in the submucosa of the conjunctiva and the opening of the nasolacrimal duct, and accumulated in the periphery within lymphoid aggregations.

The prevalence and distribution of immunoglobulin-positive cells, T-cell populations and M74.2-macrophages within mucosal linings of the *nasal cavity* were identical. IgM-, IgG- and IgA-positive cells were already detected after hatching. T-cell populations and M74.2-macrophages were also detected after hatching and then developed rapidly. In the nasal cavity, mucosal linings of turbinate bones, nasal septum, lateral wall, nasolacrimal ducts and infraorbital sinuses, infiltration of these immune cells were seen. IgM- and IgG-positive cells were localized mainly in the submucosa beneath mucosal membranes of the turbinate bones, whereas IgA-positive cells mostly disseminated at the basis of mucous glands in the glandular areas. All immunoglobulin-positive cells were scattered around lymphoid nodules. T-cell populations and M74.2-macrophages localized beneath the mucosa linings of turbinate bones including in nasolacrimal ducts and infraorbital sinuses.

Immunoglobulin-positive cells, T-cell populations and M74.2-macrophages were evident in the *lateral nasal glands* after hatching and increased gradually as chicken became older. IgM-positive cells were dominant, while an equal amount of IgG- and IgA-positive cells, respectively, was seen. Immunoglobulin-positive cells were located mainly at the main gland duct. Some cells were scattered throughout the glands. T-cell populations and macrophages localized mainly in the subepithelium of main duct and connective tissues below secondary and tertiary gland ducts. M74.2-macrophages were seen in minor quantities at the basis and within epithelial layer of the main gland duct. The effect of vaccination to increase the number of immunoglobulin-positive cells and T-cell populations was obviously seen, whereas the number

of M74.2-macrophages was not different in vaccinated broilers compared to unvaccinated broilers. CD8-cells were in the majority throughout this investigation compared to CD4-cells.

Within the *middle ear canal*, IgM-, IgG- and IgA-positive cells were seen occasionally and could be first detected at day 7. T-cell populations and M74.2-macrophages developed earlier (after hatching). They were dominant in all animals of each age group. Vaccination did not effect the numbers of immunoglobulin-positive cells, T-cell populations and M74.2 macrophages. These immune cells were scattered in the stroma beneath the middle ear mucosa and surrounded the aggregations of lymphocytes localized adjacent to the sebaceous glands. CD8- and CD4-cells were also seen disseminated in these lymphoid clusters.

According to the changes of immune cells following vaccination, the Harderian glands and CALT play a major role in immune mechanisms within the head region, as found in this investigations. The lacrimal glands and mucosal linings of the nasal cavity exhibited a high number of immune cells but did not exhibited cellular changes following vaccination. Also, the changes of immune cells within the lateral nasal glands may imply the immunological significance of these glands. The mucosal linings of the middle ear cavity exhibited immune cells, particularly T-cell populations and macrophages, and thus may play an important role in the course of infections.

The peripheral leukocyte proliferation index of vaccinated broilers was not significantly higher compared to unvaccinated broilers. Serum antibodies against NDV and IBV of unvaccinated and vaccinated broilers were present in the low titers.

These findings emphasize the significance of cell-mediated immune functions to mount a local immune response. They also indicate that the local increase of immune cells following antigenic stimulus (vaccination, possibly field infection) is not necessarily reflected in high serum antibody levels or markedly increased peripheral leukocyte activity. Our observations may provide the basis for pathogenesis studies of disorders which clinically and morphologically involve the head region of the chicken such as SHS in broilers.

F. ZUSAMMENFASSUNG

Untersuchungen an Zellpopulationen des Kopf-assoziierten lymphoiden Gewebes (engl. syn.: head-associated lymphoid tissue [HALT]): Immunhistochemische Aspekte, zellvermittelte und humorale Immunreaktionen bei kommerziellen, nichtvakzinierten und vakzinierten Broilern

Das HALT umfasst lymphoide und phagozytierende Zellen, die teils schleimhautassoziiert im Kopfbereich vorkommen, teils als Bestandteil einiger in der Kopfregion gelegener solitärer Organe. Hierzu zählen die Harderschen Drüsen, die Tränendrüsen, die Lidbindehäute und die Nasenhöhle. Um die Entwicklung dieser Zellpopulationen innerhalb dieser Organsysteme nach dem Schlupf zu untersuchen, wurden Immunglobulin-positive Zellen, T-Zell-Populationen (CD8, CD4) sowie Makrophagen identifiziert und parallel dazu zellvermittelte und humorale Immunreaktionen bei kommerziellen Broilern verschiedener Altersgruppen am 1., 7., 11., 18., 26., 32., 49. und 61. Tag nach dem Schlupf untersucht. Hierfür wurden polyklonale Antiseren zum Nachweis Immunglobulin-positiver (IgM, IgG oder IgA) Zellen sowie monoklonale Antikörper zum Nachweis von CD8- und CD4-positiven T-Zell-Populationen eingesetzt. Makrophagen wurden mit dem monoklonalen Antikörper M74.2 nachgewiesen. Gleichzeitig wurden die Reaktionen dieser Immunzellen in unvakzinierten Broilern mit denen vakzinierter (attenuierte Lebendvakzinen gegen Infektiöse Bronchitis und Newcastle Disease) Broiler verglichen. Erstmals wurden auch die lateralen Nasendrüsen sowie die Schleimhäute des Mittelohres in Hinblick auf die oben genannten Zellpopulationen untersucht.

Methodisch wurden immunhistochemische Techniken eingesetzt. Hierfür wurde es notwendig, bereits bestehende Techniken im Rahmen von Voruntersuchungen zu optimieren. Es wurde gefunden, daß eine modifizierte indirekte Immunperoxydase-Technik zu den besten Ergebnissen führte, vorausgesetzt, die Untersuchungen wurden an PLP-fixierten, Paraffin-eingebetteten, EDTA-NH₄OH-entkalkten Organen durchgeführt, die mit Trypsinlösung vorbehandelt worden waren. Die immunhistochemische Markierung von T-Zell-Populationen und Makrophagen gelang an nichtfixierten, EDTA-NH₄OH-entkalkten Kryostatschnitten ohne weitere Vorbehandlung.

In den *Harderschen Drüsen* nichtvakzinierter Broiler konnten IgM- und IgA-positive Zellen nach dem Schlupf nachgewiesen werden, wohingegen IgG-positive Zellen erst später zu beobachten waren. Die Anzahl aller Immunglobulin-positiver Zellen nahm kontinuierlich im Verlauf des Untersuchungszeitraumes zu. Diese Zellen konnten im Interstitium sowie in der Peripherie und innerhalb lymphoidzelliger Aggregationen im Bereich des Ausführungsganges und in den Primärläppchen der Drüsen nachgewiesen werden. Im Zeitraum von 1 - 18 Tagen nach der Vakzination nahmen diese Zellen erheblich an Zahl zu. Danach konnte eine kurzzeitige Abnahme an Zellen beobachtet werden, der wiederum eine rasche Zunahme der Zellzahlen folgte. Die CD8- und CD4-Zellen entwickelten sich auf ähnliche Weise und nahmen im Verlauf dieser Studie durchweg zu. Hierbei dominierten, mit der Ausnahme bei 7-tägigen Küken, die CD8-Zellen. Im Vergleich zu den unvakzinieren Broilern nahmen die CD8- und CD4-Zellen nach konjunktivaler Applikation der attenuierten Lebendvaccine gegen die infektiöse Bronchitis zu. Die T-Zell-Populationen waren im Stroma, entlang dem Drüsenausführungsgang, aber auch im Interstitium der Drüse sichtbar. Ebenso waren eine Reihe von Zellen in der Peripherie und innerhalb lymphoidzelliger Aggregationen zu beobachten. Makrophagen konnten bei allen Tieren - unvakzinieren und vakzinieren - nach dem Schlupf beobachtet werden. Jedoch nahm die Anzahl an Makrophagen, parallel zur Zunahme der lymphoidzelligen Aggregationen bei Broilern nach der Vakzination zu. Makrophagen wurden auch im Interstitium und Stroma unterhalb des Drüsenausführungsganges der Harderschen Drüse nachgewiesen.

In den *Tränendrüsen* der untersuchten Broiler wurden IgM-, IgG- und IgA-positive Zellen nachgewiesen. Zahlenmäßige Unterschiede ließen sich jedoch bei unvakzinieren oder vakzinieren Broilern nicht beobachten. Diese Zellen waren im interstitiellen Gewebe innerhalb der gesamten Drüsen nachweisbar, einige Zellen waren innerhalb des Hauptausführungsganges und in der Peripherie der lymphoidzelligen Ansammlungen zu beobachten. Ebenso waren hier CD8- sowie CD4-positive Zellen und Makrophagen zu beobachten. Die CD8- und CD4-positiven Zellen waren im Interstitium der Tränendrüsen vorhanden, zum Teil dicht verteilt in der Epithelschicht und im Bindegewebe subepithelial im Bereich des Ausführungsganges. Einige T-Zell-Populationen waren innerhalb der lymphoidzelligen Aggregationen sichtbar. Makrophagen wurden im Interstitium sowie im Stroma subepithelial im Bereich des Drüsenausführungsganges nachgewiesen. Insgesamt ließen sich lymphoidzellige Aggregationen bei einer Reihe von Tieren hauptsächlich entlang des Drüsenausführungsganges beobachten. Im

Vergleich zu den Immunglobulin-positiven Zellen ließen sich mehr T-Zellen nachweisen, insbesondere innerhalb der lymphoidzelligen Aggregationen. Diese T-Zellen waren vornehmlich in der Peripherie und innerhalb dieser lymphoidzelliger Aggregationen diagnostizierbar.

In den *Lidbindehäute* konnten keine Immunglobulin-positiven Zellen am Schlupftag nachgewiesen werden. IgM-positive Zellen entwickelten sich früher und waren im proximalen Bereich des unteren Augenlides 7-tägiger vakzinierter Broiler nachweisbar. Unterschiede in der Anzahl Immunglobulin-positiver Zellen zwischen nichtvakzinieren und vakzinieren Broilern konnten im Rahmen dieser Untersuchung nicht entdeckt werden. Die IgM-positiven Zellen dominierten in den Konjunktiven des oberen und unteren Augenlides nach dem 18. Tag. Gelegentlich wurden hier auch IgG- und IgA-positive Zellen gefunden. Ebenso konnten in den oberen und unteren Augenlidern CD8- und CD4-positive Zellen nachgewiesen werden, wobei keine Unterschiede in der Verteilung dieser Zellpopulationen beobachtet wurden. Allerdings war bei vakzinieren Tieren eine deutlich höhere Anzahl an T-Zell-Populationen nachweisbar. Diese Zellpopulationen waren in der Epithelschicht, unterhalb der Schleimhaut der Konjunktiven sowie innerhalb der lymphoidzelligen Aggregationen in der proximalen Falte der oberen Lidbindehaut nachweisbar. T-Zell-Populationen wurden auch in der Mukosa gefunden, im Mündungsbereich des Tränen-Nasenkanals und im oberen Konjunktivalbereich. Makrophagen wurden ebenso nachgewiesen in den oberen und unteren Lidbindehäuten nach Schlupf. Hierbei zeigten nichtvakzinieren Küken weniger Makrophagen als vakzinieren Tiere. Diese Zellen waren in der Submukosa der Lidbindehäute sowie im Bereich der Mündung des Tränen-Nasenkanals nachweisbar, wobei eine gewisse Anreicherung in der Peripherie innerhalb lymphoidzelliger Aggregationen zu beobachten war.

Innerhalb der *Nasenhöhle* war die Verteilung der Immunglobulin-positiven Zellen, T-Zell-Subpopulationen und Makrophagen innerhalb der Schleimhäute etwa gleich. IgM-, IgG- und IgA-positive Zellen konnten nach dem Schlupf beobachtet werden. Auch T-Zell-Populationen und Makrophagen konnten nach dem Schlupf nachgewiesen werden und nahmen anschließend zahlenmäßig zu. Infiltrationen mit diesen Zellen wurden innerhalb der Nasenhöhle nachgewiesen, und zwar: innerhalb der Schleimhäute der Turbinalien, im Septum, in den lateralen Nasenwänden und im Tränen-Nasengang sowie innerhalb des Sinus inforbitalis. IgM- und IgG-positive Zellen waren hauptsächlich innerhalb der Submukosa der Turbinalien zu

konstatieren, wohingegen IgA-positive Zellen hauptsächlich im Bereich der Schleimdrüsen zu beobachten waren. Die Immunglobulin-positiven Zellen waren innerhalb lymphoidzelliger Ansammlungen zu nachzuweisen. In ähnlichen Lokalisationen waren T-Zell-Populationen und Makrophagen in der Submukosa der Turbinen sowie im Bereich des Tränen-Nasenkanals und des Sinus inforbitalis nachweisbar.

Immunglobulin-positive Zellen, T-Zell-Populationen sowie Makrophagen waren in den lateralen *Nasendrüsen* nach dem Schlupf zu beobachten und nahmen allmählich, korreliert mit dem Alter der Tiere, zu. IgM-positive Zellen dominierten hierbei, während jeweils gleiche Anteile von IgG- und IgA-positiven Zellen nachgewiesen wurden. Die Immunglobulin-positiven Zellen waren hauptsächlich entlang des Drüsenausführungsganges zu beobachten. Vereinzelt waren aber auch Zellen über die gesamte Drüse verteilt zu finden. T-Zell-Populationen und Makrophagen waren vorwiegend im subepithelialen Bereich des Drüsenausführungsganges und des Bindegewebes unterhalb der sekundären und tertiären Drüsengänge zu beobachten. Die Makrophagen wurden vereinzelt im Bereich der Basis und innerhalb der Epithelschicht des Hauptausführungsganges beobachtet. Die Vakzinationen führten zu einer Zunahme Immunglobulin-positiver Zellen und T-Zell-Populationen, wohingegen die Anzahl der Makrophagen etwa gleich blieb. Hierbei dominierten die CD8-positiven Zellen.

Innerhalb des Gehörganges des *Mittelohres* wurden vereinzelt IgM-, IgG- und IgA-positive Zellen gesehen, erstmalig am 7. Tag nach dem Schlupf. T-Zell-Populationen und Makrophagen konnten bereits vor diesem Zeitraum kurz nach dem Schlupf nachgewiesen werden. Diese Zellpopulationen überwogen bei allen Tieren einer jeden Altersgruppe. Vakzinationen führten hier zu keinen quantitativen Verschiebungen der untersuchten Zellpopulationen. Diese Zellen waren im Stroma unterhalb der Mittelohr-Mukosa verteilt und in der Peripherie lymphoidzelliger Aggregationen, die den Talgdrüsen angelagert waren. CD8- und CD4-positive Zellen waren in diesen Bereichen ebenfalls sichtbar.

In Hinblick auf die Veränderungen der untersuchten Zellpopulationen nach Vakzination, spielen die Hardersche Drüse und das konjunktival-assoziierte lymphoide Gewebe nach den Untersuchungsergebnissen dieser Studie im Rahmen von Immunmechanismen eine besondere Rolle innerhalb der Kopfregion. Auch die Tränendrüsen und die Schleimhäute der Nasenhöhle

wiesen eine hohe Anzahl Immunzellen einschliesslich Makrophagen auf, zeigten allerdings keine Veränderungen nach erfolgter Vakzination. Offensichtlich nimmt auch das lymphoide Gewebe innerhalb der lateralen Nasendrüse an Immunreaktionen teil. Schließlich lassen die im Rahmen dieser Studie untersuchten immunologisch-relevanten Zellpopulationen auf eine Teilnahme am Immungeschehen innerhalb des Mittelohrbereiches schliessen.

Der Proliferationsindex peripherer Leukozyten war bei vakzinierten Broilern im Vergleich zu unvakzinierten Tieren nicht signifikant verschieden. Die Serumantikörper-Titer gegen Newcastle Disease-Virus und das Virus der Infektiösen Bronchitis waren sowohl bei nichtvakzinierten als auch bei vakzinierten Broilern relativ niedrig.

Diese Befunde unterstreichen die Bedeutung der untersuchten Zellpopulationen im Rahmen zellvermittelter Immunfunktionen bei der Auslösung lokaler Immunreaktionen im Kopfbereich. Sie lassen auch darauf schliessen, daß die lokale Zunahme von immunologisch relevanten Zellen nach antigenem Stimulus (Vakzination, möglicherweise Feldinfektion) nicht notwendigerweise in hohen Serumantikörper-Werten reflektiert sein muss oder in einer deutlichen, statistisch signifikanten Zunahme der Aktivität peripherer Leukozyten. Diese Beobachtungen, insbesondere die immunhistochemischen Befunde, dürften als Basis für Pathogenesestudien dienen, in deren Mittelpunkt Krankheiten der Kopfregion stehen, die sich klinisch und morphologisch beispielsweise in Form des Swollen Head-Syndrom manifestieren.