



RESEARCH ARTICLE

Keklik (*Alectoris chukar*) bursa Fabricius'unda immun sistem hücrelerinin dağılımı

Mehmet Erdem Akbalık^{1*}, Serkan Erdoğan², Berna Güney Saruhan¹, Hakan Sağsöz¹

¹Dicle Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, 21280, Diyarbakır, ²Namık Kemal Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Anatomi Anabilim Dalı, 59030, Tekirdağ, Türkiye

Geliş: 25.11.2016, Kabul: 17.01.2017

*erdem_akbalik@hotmail.com

The distribution of immune system cells in bursa of Fabricius of partridge (*Alectoris chukar*)

Eurasian J Vet Sci, 2017, 33, 2, 68-72

DOI:10.15312/EurasianJVetSci.2017.138

Öz

Amaç: Kanatlılara özgü olan bursa Fabricius kendi foliküler yapısı içerisinde B lenfosit progenitörlerinin çoğaltılması ve farklılaşmasından sorumlu primer lenfoid organdır. Fonksiyonel B lenfositleri oluşturma sürecinde hücreler majör doku uyum kompleksi (MHC), adezyon molekülleri ve antijenleri tanımak için gerekli reseptör özelliklerini bu organda kazanırlar. Bu çalışmanın amacı, keklik bursa Fabricius'unda CD8, CD68, MHC-I ve II pozitif hücrelerinin lokalizasyonları ve dağılımlarını belirlemektir.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışmada 10 adet erişkin kınalı kekliğin (5 erkek ve 5 dişi) bursa Fabricius'unda bazı immun hücre lokalizasyonları immünohistokimyasal yöntemler kullanılarak ışık mikroskobu düzeyinde incelendi.

Bulgular: CD8, CD68, MHC-I ve II pozitif hücrelerin genel olarak lamina propria ve lenf foliküllerinin korteks ve medullasında lokalize olduğu ortaya kondu. Buna karşın kas katmanında immunoreaktiviteye rastlanmadı.

Öneri: İmmun yanıtta rol oynayan bu faktör ekspresyonlarının kanatlı türlerinde yapılacak immunolojik çalışmalar için katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: Keklik, bursa Fabricius, immun hücreler, immünohistokimya

Abstract

Aim: The bursa of Fabricius is a primary lymphoid organ restricted to birds that is responsible for the proliferation and differentiation of B lymphocyte precursors within its follicular structure. In the process of creating a functional B lymphocyte, the cells acquire the necessary receptor property to recognize the antigen, major histocompatibility complex and adhesion molecules in this organ. The purpose of this study is to determine the localization and distribution of CD8, CD68, MHC-I and II-positive cells in bursa of Fabricius of partridge.

Materials and Methods: In this study, some immune cells localization in bursa of Fabricius of 10 adult chukar partridge (5 male and 5 female) were examined on the level of light microscope by using immunohistochemical methods.

Results: It was revealed that in general CD8, CD68, MHC-I and II-positive cells were localized in lamina propria and cortex and medulla of lymph follicles. In contrast, no immunoreactivity was observed in the muscle layer.

Conclusion: The expression of these factors playing a role in immune response is thought to provide contribution for immunological studies in avian species.

Key words: Partridge, bursa of Fabricius, immune cells, immunohistochemistry





Giriş

Kanatlılara özgü bir organ olan ve kloakadaki proktodeal bölgenin dorsal bir divertikülü olarak gelişen bursa Fabricius, lenfo-epitelyal bir yapıya sahiptir. Organın iç yüzeyi birçok kuş türünde yaklaşık 15 adet primer ve 7 adet sekonder plika veya mukozal dürüm nedeniyle kıvrımlı bir görümdedir. Bu plikalar, folikülle ilişkili epitel hücreleri (Follicle Associated Epithelium, FAE), lenfositler, makrofajlar ve plazma hücrelerinin yer aldığı çok sayıda polihedral foliküllere sahiptir. Embriyonik gelişim süresince lenfoid kök hücrelerin fetal karaciğerden bursa Fabricius'a doğru göç ettikleri ve burada olgun, immün yeterli B hücre özelliklerini kazandıkları bildirilirken (Toivanen ve ark 1987); genç kuşlarda aktif olan organın 8-10. haftada maksimum hacme ulaştığı ve yaklaşık 6 ay sonra küçülerek involüsyona uğradığı ifade edilmektedir (Ciriaco ve ark 2003, Khenenou ve ark 2012). Bursa Fabricius da bir lümene sahip diğer organlar gibi mukozal katmanlardan oluşan ve güçlü düz kas tabakası ile çevrili bir organ olup kanatlı türlerinin bağışıklığında önemli role sahiptir (Toivanen ve ark 1987, Ciriaco ve ark 2003, Gultiken ve ark 2010, Khenenou ve ark 2012). Bu rol ilk olarak Glick ve arkadaşları tarafından bursa Fabricius'un genç tavuktan cerrahi yolla çıkarılması sonucu tanımlanmıştır. Bugün ise bursa Fabricius'un B lenfositlerin olgunlaşması ve farklılaşmasından sorumlu sindirim sistemi ilişkili lenfoid bir organ olduğu, bununla beraber sadece primer lenfoid organ olarak değil aynı zamanda da T hücre bağımlı alanın varlığından ötürü sekonder bir lenfoid organ olduğu bilinmektedir. Buna ilaveten, bursa Fabricius'un kendi epiteli içinde farklılaşma faktörü üretimine bağlı olarak B hücre gelişiminde pozitif bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir (Karadağ Sari ve ark 2015).

Yeterli bir immün cevap için antijen sunan hücrelerin antijeni işleyip bu peptidleri yüzeylerinde bulunan majör doku uyum kompleksi (MHC) molekülleri ile T hücrelerine sunması gerekir. Bunlardan MHC sınıf I (MHC-I) molekülleri, esas işlevi hücre içi patojenleri yok etmek olan sitotoksik T hücrelerini (CD8+) stimüle ederken MHC-II molekülleri hem intraselüler hem de ekstraselüler patojenlere karşı yardımcı T hücrelerini (CD4+) uyarır. Böylece lökositlerin aktivasyonu için gereken birtakım fonksiyonlar (sitokin üretimi, antikor sentezi gibi) sağlanmış olur (Kaufmann ve Kabelitz 2002, De Almeida ve Holoshitz 2011).

Kuşlar uzun zamandan beri hem T hücrelerinin timusta ve B hücrelerinin bursa Fabricius'ta olgunlaşması hem de bu organların kolay kullanılabilir olmasından dolayı immün sistem çalışmalarında deney hayvanı olarak kullanılmaktadır (Khan ve ark 1998). Buna göre kuş türlerinde yapılan önceki çalışmalarda (Adair ve ark 1993) MHC-I, MHC-II ve T hücre alt tiplerinin timus, dalak ve kemikiliği gibi lenfoid dokularda gözlemlendiği, öte yandan bu faktörlerin ördek (Squillaciotti ve ark 2006) ve tavuk (Abdul-Careem ve ark 2008) gibi türle-

rin bursa Fabricius'larında da lokalize olduğu gösterilmiştir. Konu ile ilgili olarak kanatlı türleri arasında az sayıda çalışmaya (Khan ve Hashimoto 1996, Khan ve ark 1998) rastlanmış olup bu çalışmada bir kanatlı türü olan, keklik bursa Fabricius'unda CD8, CD68, MHC-I ve MHC-II pozitif hücrelerin varlığı ve dağılımlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem

Hayvanların seçimi ve doku örneklerinin işlenmesi

Çalışmanın materyalini 5 dişi (360-420 g) ve 5 erkek (480-540 g) olmak üzere toplam 10 adet erişkin (24 haftalık) kınalı keklik oluşturdu. Özel bir yetiştirme çiftliğinin kesimeviden temin edilen hayvanların kesim sonrası bursa Fabricius'ları total olarak çıkarıldı ve doku örnekleri %10'luk formol-alkolde 18 saat boyunca tespit edildi. Bunu takiben dokular, dereceli alkoller, metil benzoat ve benzol serilerinden geçirilerek parafine bloklandı. Her bir hayvana ait bloktan 5 µm kalınlığında seri kesitler alınarak 4'er preparat hazırlandı.

İmmunohistokimyasal boyama

Keklik bursa Fabricius'unda CD8, CD68, MHC-I ve MHC-II pozitif hücrelerin varlığını belirlemek için, Zymed Histostain Plus Bulk Kit (code: 85-9043, Histostain Plus Bulk Kit, Zymed, South San Francisco, CA, USA) kullanılarak streptavidin-peroxidase yöntemi uygulandı (Akbalık ve Ketani 2013). Kesitler deparafinize ve rehidre edildikten sonra endojen peroksidaz aktivitesini engellemek için metanolde hazırlanmış %3'lük H₂O₂'de 20 dakika süreyle tutuldu. 0.01M fosfatlı tuz çözeltisinde (PBS) 5'er dk süreyle iki kez yıkanan kesitler antijen retrieval işlemi için proteaz enzimi uygulamasına tabi tutuldu. Etüvde 370C'de 10 dk inkübe edilen kesitler 5 dk PBS'de iki kez yıkandıktan sonra spesifik olmayan boyanmayı önlemek üzere protein blocking çözeltisi (Ultra V Block) ile oda ısısında 5-10 dk muamele edildi. Bu işlemden sonra kesitler 1:200 sulandırılmış, CD8 [CD8 (UCH-T4), sc-1181; Santa Cruz Biotechnology], CD68 [CD68, Clone KP1; cat.no: CM 033 A,B,C; Biocare Medical), MHC-I [HLA class I (B-D11), sc-65319; Santa Cruz Biotechnology] ve MHC-II [MHC-II (HLA-DR) Ab-1 (Clone LN3); Thermo Fisher Scientific Lab Vision Corporation] fare monoklonal primer antikorları ile +40C'de 1 gece inkübe edildi. İnkübasyon sonrası 5 dk boyunca 0.01M PBS'de üç kez yıkanan kesitler, oda ısısında 20 dk boyunca biotinlenmiş sekonder antikor ile muamele edildi ve yine 5 dk boyunca 0.01M PBS'de üç kez yıkandı. Daha sonra 20 dk süre ile streptavidin peroksidaz solüsyonunda inkübe edilen kesitler son kez 5 dk boyunca 0.01M PBS'de üç kez yıkandı. Kesitler antijen-antikor reaksiyonunun görüntülenebilmesi için 3'3-diaminobenzidine hydrochloride (DAB) kromojeni ile 10-15 dk ve zemin boyaması için Mayer's hematoksileni ile 2-3 dk muamele edildiler. İmmunohistokimyasal boyamanın spesifikliğı için pozitif kontrol olarak CD8, CD68, MHC-I ve -II yüzey reseptörlerine sahip hücrelerin bulunduğu bili-

nen insan tonsil dokusu kullanıldı. Preparatlar, dijital kamera (NikonCoolpix 4500) ataşmanlı ışık mikroskobu (Nikon E-400, Tokyo, Japonya) kullanılarak fotoğraflandı.

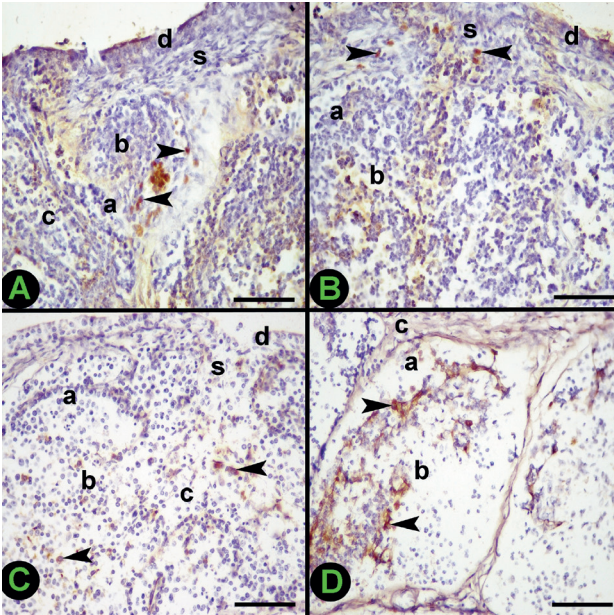
Bulgular

Kekliklerde, bursa Fabricius'un kloakanın dorsalinde seyrettiği ve yuvarlak şekilli olduğu görüldü. Organ duvarının ise tunika mukoza, tunika muskularis ve tunika seroza olmak üzere 3 katmandan oluştuğu gözlenirken mukozanın yalancı çok katlı prizmatik epitel ile döşeli olduğu ve altındaki bağ dokunun çok sayıda lenf folikülü içerdiği belirlendi.

Keklik bursa Fabricius'larında CD8+ hücrelerin epitel katman ve stromada bulunduğu ancak düz kas katmanında var olmadığı görüldü. CD8+ hücrelerin az sayıda ve genel olarak interfoliküler alan ile foliküllerin korteks bölgesinde lokalize olduğu, bunun yanında epitel katmanda ise tek tük olarak gözlemlendi dikkati çekti (Resim 1A, B).

CD68+ hücrelerin keklik bursa Fabricius'undaki tüm katmanlarda var olduğu ancak stroma içinde özellikle de foliküllerin hem korteks hem de medullasında yoğunlaştığı tespit edildi (Resim 1C, D).

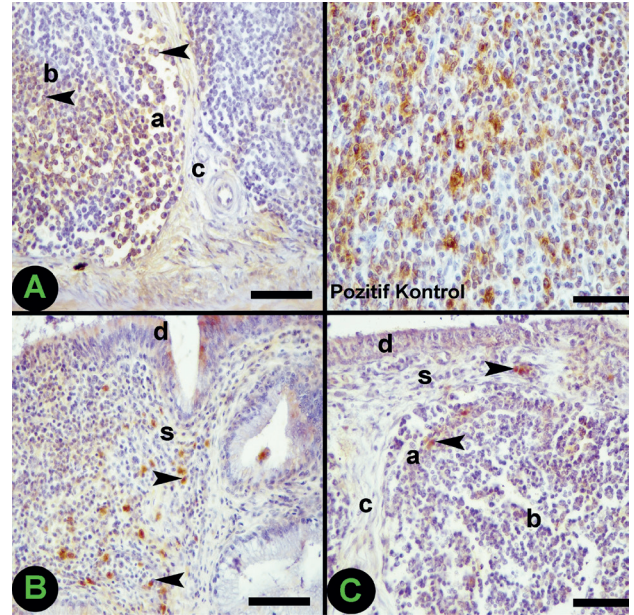
MHC-I+ ve MHC-II+ hücrelerin foliküllerde ve supepitelyal alanda bulunduğu görüldü. MHC-I+ hücrelerin genel olarak foliküllerin hem korteks hem de medullasında yerleştiği buna karşın MHC-II+ hücrelerin ise foliküllerin özellikle korteksine lokalize olduğu gözlemlendi (Resim 2A, B, C).



Resim 1. Keklik bursa Fabricius'unda CD8 (A, B) ve CD68 (C, D) için immunohistokimyasal boyanma (ABC immunoperoksidaz boyama, DAB). Bar = 25 µm. Okbaşı pozitif boyanan hücreleri göstermektedir. a = foliküllerin korteksi, b = foliküllerin medullası, c = inter-foliküler alan, d = inter-foliküler epitel, s = supepitelyal alan.

Tartışma

Kanatlı hayvanlar, immünolojik araştırmalar için temel bir model olarak görülmekte ve immün fonksiyonların anlaşılması amacıyla günümüzde halen çalışılmaya devam etmektedir. Kuş türlerinin özellikle esas amacı B hücrelerinin farklılaşması olan ve immunglobulin genlerin çeşitlendirilmesini sağlayan bursa Fabricius'a sahip olması da ayrı bir önem taşımaktadır (Funk ve Palmer 2003). B hücrelerin üretimine ek olarak organın, kloakal ağız vasıtasıyla antijenlere maruz kaldığı bilinmektedir. Bu yüzden bursa Fabricius, kendi savunma sistemini oluşturmaya ihtiyaç duyar (Khan ve Hashimoto 1996). Bununla birlikte diğer lenfoid dokularda (sekal tonsiller ve Peyer plakları gibi) olduğu gibi bursa Fabricius da B lenfositleri, MHC-II moleküllerini ekspres eden hücreleri ve hem CD8+ T hücreleri hem de ağırlıklı olarak CD4+ T hücrelerini içermektedir (Cortes ve ark 1995). Bu bakımdan sunulan çalışma keklik bursa Fabricius'unda CD8 immünoreaktivitesi gösterilen ilk çalışmadır. Tavuklarda bursa Fabricius ile daha önce yapılan immunohistokimyasal çalışmada (Kon-Ogura ve ark 1993) kuşların homolog molekülü olan memeli CD8 immünoreaktivitesinin tespitinde başarısız olunmuş buna karşın Khan ve Hashimoto (1996), 1 günlükten 15 haftalığa kadar yaptıkları çalışmada CD8 pozitif hücrelerin yüzey epiteli ve lamina propria içinde dağılım gösterdiğini ve özellikle 5. haftada sayılarının belirgin bir biçimde arttığını ancak bu haftadan itibaren sayıya düşüşe geçtiğini belirlemişlerdir. Buna ek olarak Cortes ve ark (1995), 4 günlük civcivlerde CD8 pozitif hücrelerin az sayıda ve subepitelyal bölge ile epitel içinde yer aldığını ancak 14 günlük hayvanlarda pozitif hücre sayısının belirgin biçimde arttığını belirlemiş-



Resim 2. Keklik bursa Fabricius'unda MHC-I (A) ve MHC-II (B, C) için immunohistokimyasal boyanma (ABC immunoperoksidaz boyama, DAB), pozitif kontrol = MHC-II uygulanmış insan tonsil dokusu. Bar = 25 µm. Okbaşı pozitif boyanan hücreleri göstermektedir. a = foliküllerin korteksi, b = foliküllerin medullası, c = inter-foliküler alan, d = inter-foliküler epitel, s = supepitelyal alan.



ler ve bu durumun yaş ile ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir. Ayrıca Odend'hal ve Breazile (1979) bursa Fabricius'daki T hücre varlığının sadece diffuz lenfoid alandan kaynaklandığını rapor ederlerken bu iddianın aksine Khan ve Hashimoto (1996), T hücrelerinin organın lamina propriasına periferik kandan muhtemelen de kortiko-medüller sınırda yer alan post kapillar venüller vasıtasıyla geçtiğini ve buradan epitel ve subepitelyal bölgeye hareket ettiğini ileri sürmüşlerdir. Sunulan bu çalışmada da CD8+ hücrelerin epitel dokudan ziyade interfoliküler alan ile foliküllerin özellikle korteksinde lokalize olması, lokal savunma açısından sitotoksik fonksiyonun stromada daha belirgin/üstün olduğunu, aynı zamanda reaksiyon gösteren hücre sayısındaki azlığın ise yaşla ilişkili olduğunu düşündürmüştür.

Doğuştan gelen bağışıklık sisteminin bir parçası olarak kuş türlerinin sahip oldukları makrofajlar da memelilerde olduğu gibi sitokinler üreterek ve fagositik işlev görerek önemli bir rol oynamaktadır (Abdul-Careem ve ark 2008). Monosit/makrofajlara özgü bir glikoprotein olan ve diğer lökositlerde yer almayan CD68 molekülünün immünohistokimyasal olarak demonstrasyonu, doku makrofajlarını göstermek amacıyla sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (Erber 1990). Ördeklerin bursa Fabricius'unda yapılan bir çalışmada (Squillaciotti ve ark 2006) CD68-pozitif hücrelerin öncelikle foliküllerin korteks ve medulla sınırında, aynı zamanda da medullada gözlemlendiği bildirilirken, tavuk bursa Fabricius'unda yapılan bir başka çalışmada (Berndt ve Methner 2004) ise CVI-68.1+-makrofajların tüm doku boyunca görülebildiği ancak yoğun boyanan makrofajların daha ziyade interfoliküler ve subepitelyal bölge ile bazı folikül hücrelerinde lokalize olduğu vurgulanmıştır. Sunulan bu çalışmada CD68+ makrofajların özellikle foliküllerin korteks ve medullası olmak üzere tüm dokuya yayılmış olması, bu peptidin kekliklerde immünojenik fonksiyonları düzenlemede önemli bir rol oynayabileceğini destekler niteliktedir.

Bugüne kadar MHC moleküllerinin yapı ve işlevleri hakkında en ayrıntılı bilgi, insanlar ve fareler ile yapılan çalışmalardan gelmiştir. MHC-I ve II moleküllerinin genel olarak benzer bir yapıya sahip olduğu ancak bağlandıkları bölgelerin farklı olduğu, bununla birlikte klasik MHC-I moleküllerinin hemen hemen tüm çekirdekli hücrelerde, MHC-II moleküllerinin ise çoğunlukla antijen sunan hücrelerde bulunduğu bildirilmiştir (Kaufman 2008). Önceki çalışmalarda lenfoid organların farklı bölgelerinde MHC-I ve II+ hücreler belirlenmiştir. Örneğin tavuk bursa Fabricius'unda yapılan bir çalışmada (Nikura ve ark 2007) MHC-II+ hücrelerin esas olarak interfoliküler alanda ve foliküllerin özellikle korteksinde görüldüğü bildirilmiştir. Yine tavuk bursa Fabricius'unda yapılan başka bir çalışmada (Cortes ve ark 1995) MHC-II molekülünü ekspres eden hücrelerin subepitelyal bölgeyi işgal ettiği vurgulanırken 6 haftalık piliçlerde MHC-II molekülünü ekspres eden hücrelerin dendritik hücreler olarak tanımlanabileceği ileri sürülmüştür.

Sunulan çalışmada MHC-I ve II pozitif hücrelerin folikülde ve subepitelyal alanda var olduğu görüldü. Tavuklarda, aktive edilmiş T hücreler, B lenfositler, plazma hücreleri, makrofajlar ve dendritik hücrelerin MHC-II antijenlerini ekspres ettiği bilinmektedir (Cortes ve ark 1995). Bu bilgiye de dayanarak, antijenlere maruz kalan bursa Fabricius'ta kendi savunma dinamikleri içerisinde MHC-I ve II ekspres eden hücrelerin var olduğu ve aynı zamanda MHC-I ve II pozitif hücrelerin immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları söylenebilir.

Öneriler

Bu çalışma, keklik bursa Fabricius'unda CD8, CD68, MHC-I ve II ekspres eden hücrelerin varlığını ve dağılımındaki farklılıklarını göstermiştir. Sonuçlar incelendiğinde CD8+ hücrelerin stromada daha baskın olduğu ve bu yüzden sitotoksik fonksiyonun stroma lehine geliştiği; CD68+ makrofajların immünojenik fonksiyonların, bunun yanında MHC-I ve II moleküllerinin ise immün yanıtın düzenlenmesinde önemli rol oynadıkları düşünülmektedir. Sonuç olarak immün yanıtta rol oynayan bu faktör ekspresyonlarının kanatlı türlerinde yapılacak immünojenik çalışmalara katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Kaynaklar

- Abdul-Careem MF, Hunter BD, Lee LF, Fairbrother JH, Haghghi HR, Read L, Parvizi P, Heidari M, Sharif S, 2008. Host responses in the bursa of Fabricius of chickens infected with virulent Marek's disease virus. *Virology*, 379, 256-265.
- Adair BM, McNeilly F, McConnell CD, McNulty MS, 1993. Characterization of surface markers present on cells infected by chicken anemia virus in experimentally infected chickens. *Avian Dis*, 37, 943-950.
- Akbalık ME, Ketani MA, 2013. Expression of epidermal growth factor receptors and epidermal growth factor, amphiregulin and neuregulin in bovine uteroplacental tissues during gestation. *Placenta*, 34, 1232-1242.
- Berndt A, Methner U, 2004. B cell and macrophage response in chicks after oral administration of Salmonella typhimurium strains. *Comp Immun Microbiol Infect Dis*, 27, 235-246.
- Ciriaco E, Pinera PP, Diaz-Esnal B and Laura R, 2003. Age-related changes in the avian primary lymphoid organs thymus and bursa of Fabricius. *World Acad Sci Eng Technol*, 72, 482-487.
- Cortes A, Fonfria J, Vicente A, Varas A, Moreno J, Zapata AG, 1995. T-dependent areas in the chicken bursa of Fabricius: An immunohistological study. *Anat Rec*, 242, 91-95.
- De Almeida DE, Holoshitz J, 2011. MHC molecules in health and disease: At the cusp of a paradigm shift. *Self Nonself*, 2, 43-48.
- Erber WN, 1990. Human leucocyte differentiation antigens: Review of the CD nomenclature. *Pathology*, 22, 61-69.



- Funk PE, Palmer JL, 2003. Dynamic control of B lymphocyte development in the bursa of Fabricius. *Arch Immunol Ther Ex*, 51, 389-398.
- Gultiken ME, Yildiz D, Karahan S, Bolat D, 2010. Scanning electron and light microscopic investigation of bursa Fabricius in turkey (*Meleagris gallopavo*). *Eurasian J Vet Sci*, 26, 69-73.
- Karadag Sari E, Altunay H, Kurtdede N, Bakır B, 2015. The structure of bursa of fabricius in the long-legged buzzard (*Buteo rufinus*): Histological and histochemical study. *Acta Vet-Beograd*, 65, 510-517.
- Kaufman J, 2008. The avian MHC, In: *Avian Immunology*, Eds; Davison TF, Kaspers B, Schat KA, Elsevier Ltd, London, UK, pp; 159-182.
- Kaufmann SHE, Kabelitz D, 2002. The immune response to infectious agents. In: *Immunology of Infection. Methods in Microbiology*, Eds; Kaufmann SHE, Kabelitz D, Second edition, Academic Press, London, UK, pp; 1-20.
- Khan MZI, Hashimoto Y, 1996. An immunohistochemical analysis of T cell subsets in the chicken bursa of Fabricius during postnatal stages of development. *J Vet Med Sci*, 58, 1231-1234.
- Khan MZI, Hashimoto Y, AsaduzzmanM, 1998. Development of T-cell sub-populations in postnatal chicken lymphoid organs. *Vet Arhiv*, 68, 183-189.
- Khenenou T, Melizi M and Benzaoui H, 2012. Morpho-histological study of the bursa of Fabricius of broiler chickens during posthatching age. *World Acad Sci Eng Technol*, 72, 1305-1307.
- Kon-Ogura T, Kon Y, Onuma M, Kondo T, Hashimoto Y, Sugimura M, 1993. Distribution of T cell subsets in chicken lymphoid tissues. *J Vet Med Sci*, 55, 59-66.
- Niikura M, Kim T, Hunt HD, Burnside J, Morgan RW, Dodgson JB, Cheng HH, 2007. Marek's disease virus up-regulates major histocompatibility complex class II cell surface expression in infected cells. *Virology*, 359, 212-219.
- Odend'hal S, Breazile JE, 1979. Luminal lymphoid cells of the cloacal bursa. *Am J Vet Res*, 40, 1015-1018.
- Squillacioti C, Mirabella N, De Luca A, Paino G, 2006. Expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the primary lymphoid organs of the duck *Anas platyrhynchos*. *J Anat*, 209, 51-58.
- Toivanen P, Naukkarinene H, Vannino O, 1987. What is the function of the bursa of Fabricius. *Avian Immunol*, 1, 79-92.

