

Techniki użyteczne w ocenie swoistej odporności komórkowej*)

MAŁGORZATA POMORSKA-MÓL, IWONA MARKOWSKA-DANIEL

Zakład Chorób Świń Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Pomorska-Mól M., Markowska-Daniel I.

Methods useful in the evaluation of specific cell-mediated immunity

Summary

In the era of the excessive use of chemotherapeutics, especially antibiotics and an increase of bacterial strains resistance, studies concerning the stimulation of the immune system and evaluation of its activity seem to be particularly important.

This article presents a review of the methods useful in the evaluation of cellular immunity. The evaluation of specific cell-mediated immunity may be performed *in vivo* or *in vitro*. Delayed-type hypersensitivity assay is one that is possible to make *in vivo*, while the lymphocyte transformation test, cytometric proliferation assay, evaluation of activation marker expression and analysis of antigen-specific production of cytokines by sensitive lymphocytes T are methods performed *in vitro*.

The evaluation of cell-mediated immunity in immunological studies, especially concerning vaccinology, will be valuable or even essential elements of an experiment.

Keywords: cellular immunity, lymphocytes proliferation, cytokines

W dobie nadmiernego wykorzystywania chemioterapeutyków, zwłaszcza antybiotyków i narastania oporności szczepów bakteryjnych, badania dotyczące stymulacji układu odpornościowego i oceny jego aktywności wydają się szczególnie ważne. Organizm powinien być stymulowany do samodzielnej obrony przed czynnikami infekcyjnymi. Ogromną rolę w mobilizacji układu odpornościowego, zwłaszcza młodych zwierząt, odgrywają, jak wiadomo, szczepionki. Aby kompleksowo ocenić wpływ szczepionki na organizm zwierzęcia, należy zbadać nie tylko humoralną, ale i komórkową odpowiedź immunologiczną powstającą po aplikacji biopreparatu. Śledząc piśmiennictwo z minionych lat, dotyczące oceny odpowiedzi immunologicznej u zwierząt, w ogromnej większości można spotkać się z oceną jedynie odpowiedzi humoralnej (8, 14). W dużej mierze wynika to zapewne z faktu łatwości przeprowadzenia tego rodzaju badań. Poziom przeciwciał może być oceniony m.in. przy użyciu komercyjnych zestawów ELISA, testu seroneutralizacji czy zahamowania hemaglutynacji. Dobór testu zależy przede wszystkim od właściwości antygeny oraz sprawności laboratorium. Szczególnie często z taką niepełną oceną odpowiedzi układu immunologicznego można się spotkać w pracach oceniających efektywność szczepionek u zwierząt (8). Tak przeprowadzona ocena nie jest wystarczająca. Osiągnięcie wysokich mian przeciwciał nie zawsze zabezpieczy zwierzę przed zakaże-

niem, z drugiej strony, niskie miana nie są jednoznaczne z brakiem odporności na antygen.

Ocena swoistej antygenowo odporności komórkowej może być prowadzona *in vivo* oraz *in vitro*. Przyżyciowo możemy wykonać skórny test nadreaktywności typu późnego (delayed-type hypersensitivity assay, DHT), natomiast *in vitro* – test transformacji blastycznej limfocytów (TTBL), szereg testów z wykorzystaniem cytometrii przepływowej (np. dokonanie oceny proliferacji limfocytów, oceny ekspresji markerów aktywacji, a także analizy antygenowo-swoistej produkcji cytokin przez uczulone limfocyty T). Wydzielanie cytokin można ocenić wykorzystując również testy ELISA oraz reakcję łańcuchową polimerazy (PCR).

Skórny test nadreaktywności typu późnego to jedna z najstarszych technik do monitorowania swoistej odpowiedzi komórkowej. Test ten polega na śródskórnym wstrzyknięciu zwierzęciu antygeny, a następnie ocenie odczynu, jaki powstaje w związku z migracją uczulonych limfocytów do miejsca iniekcji. Pozwala on na ocenę odpowiedzi komórkowej w stosunku do wielu czynników infekcyjnych. Jego zaletą jest prostota wykonania i brak konieczności używania skomplikowanej aparatury, w związku z czym jest on nadal wykorzystywany (16, 22). Omawiany test jest jednak nieprzydatny w sytuacji, kiedy chcemy oceniać odpowiedź komórkową u danego zwierzęcia kilkakrotnie w odstępach czasu, gdyż powoduje on „naznaczenie” limfocytów T, co w konsekwencji powoduje, że przy prowadzeniu kolej-

*) Praca finansowana ze środków na naukę w latach 2008-2011 jako projekt badawczy nr NN 308 275934.

nego badania odpowiedzi na ten sam antygen, u tego samego zwierzęcia, nie mamy pewności, czy uczulenie limfocytów nie pochodzi z wcześniejszego kontaktu zwierzęcia z badanym antygenem. Pomimo prostoty wykonania test ten jest jednak dość kłopotliwy w interpretacji, zwłaszcza w ilościowym określeniu wyników. Trudno też określić, które dokładnie komórki biorą udział w infiltracji tkanek.

Test transformacji blastycznej limfocytów (TTBL) jest często wykorzystywany do oceny odpowiedzi immunologicznej *in vitro* na znany antygen. Transformacja blastyczna jest sumą zmian, jaką przechodzi dany limfocyt po pobudzeniu antygenem. Głównymi różnicami, względem niepobudzonego limfocytu, są: sfałdowanie powierzchni błony komórkowej, rozpoczęcie produkcji i wydzielania cytokin oraz wydzielanie przeciwciał w przypadku aktywacji limfocytów B. Transformacji blastycznej towarzyszy również proliferacja. Wysoki stopień proliferacji w odpowiedzi na antygen *in vitro* koreluje z rozplemem limfocytów specyficznych dla danego antygeny i wskazuje na silniejszą wtórną odpowiedź komórek pamięci immunologicznej.

Po raz pierwszy zjawisko transformacji blastycznej opisał Nowell (12, 13). Zaobserwował on, że w hodowli limfocytów zawierających duże i małe limfocyty pod wpływem fitohemaglutyniny (PHA) pojawiają się komórki, które morfologicznie odpowiadały limfoblastom. Takim przemianom podlegały wyłącznie limfocyty małe, w odróżnieniu od dużych, które ginęły w przeciągu 24 godzin inkubacji. Duże komórki, powstałe po stymulowaniu hodowli czynnikami transformującymi, ulegały następnie mitozie.

Czynniki indukujące transformację blastyczną limfocytów można podzielić na nieswoiste i swoiste. Czynniki nieswoiste powodują transformację blastyczną wszystkich limfocytów, zarówno uczulonych, jak i nieuczulonych na dany antygen. Do nieswoistych stymulatorów proliferacji limfocytów T możemy zaliczyć: fitohemaglutyninę (PHA) oraz konkanawalinę A (CoA). Po stymulacji PHA liczba komórek w hodowlach początkowo zmniejsza się w przeciągu pierwszych 24-48 godzin, a następnie wzrasta wskutek zintensyfikowanych podziałów komórkowych. Po zastosowaniu swoistych antygenów, silniejszej proliferacji powinny ulegać limfocyty pochodzące od osobników uczulonych na badany antygen (wirusowy, bakteryjny, chemiczny).

Potrzebne do przeprowadzenia testu transformacji blastycznej limfocyty, a w zasadzie jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (peripheral mononuclear blood cells – PMBC) uzyskuje się najczęściej poprzez wirowanie pełnej krwi pobranej na antykoagulant w odpowiednim gradiencie gęstości. Dostępnych jest szereg komercyjnych odczynników umożliwiających uzyskanie PMBC z pełnej krwi. Mają one gęstość właściwą wyższą niż limfocyty, lecz niższą od erytrocytów i granulocytów. Po wirowaniu erytrocyty i granulocyty przechodzą przez roztwór służący do izolacji limfocytów i tworzą osad na dnie próbówki, natomiast limfocyty tworzą interfazę pomiędzy osoczem a gradientem. Limfocyty uzyskane w ten sposób zawierają domieszkę monocytów i w nie-

wielkich ilościach granulocytów. Komórki fagocytujące można wyizolować poprzez dodanie opiłków żelaza, które zostanie przez nie sfagocytowane, co umożliwi ich późniejsze usunięcie w polu magnetycznym.

Hodowlę limfocytów *in vitro*, w celu oceny ich transformacji, przeprowadza się najczęściej inkubując je w podłożu hodowlanym, bez dalszej izolacji subpopulacji limfocytów T i B. Minusem tak przeprowadzonego testu jest brak informacji, która subpopulacja limfocytów odpowiada na stymulację.

Obecnie najczęściej stosowana metoda oceny stopnia proliferacji polega na analizie ilościowej inkorporacji znakowanej trytem tymidyny przez nowo powstałe komórki (18, 21, 22). W teście tym egzogenna tymidyna jest wbudowywana podczas fazy S cyklu komórkowego do DNA komórek proliferujących. Metoda ta uważana jest za najbardziej czułą (20). Ocenę radioaktywności przeprowadza się najczęściej po 16-18 godzinach od dodania izotopu do hodowli. Radioaktywność badanych próbek mierzy się w liczniku scyntylacyjnym beta. Wyniki pomiaru mogą być wyrażone w postaci wartości cpm (counts per minute) lub częściej w postaci indeksu stymulacji (SI). Indeks stymulacji oblicza się dzieląc wartości cpm limfocytów stymulowanych przez odpowiednie wartości cpm limfocytów pochodzących z kontroli (niestymulowanych). Wartości wyższe niż uzyskane w kontroli (zwykle w piśmiennictwie wartością graniczną jest $SI > 2$) wskazują, że limfocyty uległy proliferacji w odpowiedzi na stymulację badanym antygenem (17, 19). Metoda ta, oprócz wysokiej czułości, co jest niewątpliwie jej zaletą, posiada także szereg minusów, do których należy zaliczyć szkodliwy wpływ na środowisko w związku z wykorzystaniem izotopów, konieczność posiadania odpowiednich urządzeń oraz warunków do przeprowadzenia odczytu radioaktywności. W związku z tym, że jest to metoda wieloetapowa, prawdopodobieństwo błędu jest większe.

Innym sposobem oceny proliferacji komórek są metody kolorymetryczne (9, 10, 20). Sam proces przygotowania hodowli limfocytów jest analogiczny do opisanego wyżej, różnica polega na dodaniu stosownego indykatora zachodzących w hodowli zmian (izotop zastąpiono związkami barwnymi). Po dodaniu odpowiednich indykatorów do hodowli, w wyniku zmian metabolicznych zachodzących w proliferujących limfocytach, dochodzi do zmiany barwy użytych związków, co następnie jest oceniane spektrofotometrycznie. Przy interpretacji wyników tak przeprowadzonych badań należałoby mieć na uwadze fakt, że barwniki stosowane do oceny proliferacji komórek wykazują często działanie toksyczne na komórki, co w konsekwencji wpływa na obniżenie ich proliferacji i uzyskiwanie wyników fałszywych.

Cytometryczna ocena proliferacji limfocytów. Jest to metoda coraz częściej wykorzystywana w badaniach immunologicznych (3, 20, 22). Zasadą testu jest inkorporacja markera przez komórki podczas ich hodowli, a następnie bardzo precyzyjne określenie stopnia ich proliferacji po stymulacji określonymi antygenami bądź miogenami, poprzez zmiany natężenia fluorescencji użytego markera. Do tego celu używane są m.in. barwniki

z serii PHK, bromodeoksyurydyna (BrdU) czy ester bursztynylowy karboksyfluoresceiny (CFSE). Wszystkie te związki były już z powodzeniem wykorzystywane w badaniach immunologicznych u wielu gatunków zwierząt (3, 6, 11, 20, 23). Bromodeoksyurydyna jest analogiem nukleotydu, który zostaje wbudowany w DNA nowo powstających komórek. Substancja ta jest dodawana do hodowli badanych limfocytów po upływie pewnego czasu od ekspozycji na antygen czy miogen (zwykle po upływie 48-72 h), podobnie jak ma to miejsce w przypadku testu proliferacji z zastosowaniem znakowanej trytem tymidyny. Przed dodaniem BrdU do hodowli jest on wiązany z odpowiednim przeciwciałem monoklonalnym znakowanym fluorochromem. Pozostałe barwniki są dodawane od razu podczas zakładania hodowli. Wnikają one do wnętrza komórek i łączą się kowalencyjnie z białkami cytoplazmy (CFSE) bądź też barwią błony komórkowe (PHK). W obu przypadkach każdy podział komórek pociąga za sobą powstanie komórek potomnych zawierających połowę wyjściowego poziomu barwnika zawartego w komórce macierzystej. Tak przeprowadzony test pozwala oznaczyć liczbę komórek podlegających proliferacji z danej populacji oraz liczbę nowo powstałych generacji (6). Niewątpliwie dodatkowym atutem oceny proliferacji z wykorzystaniem cytometrii przepływowej jest możliwość określenia fenotypu populacji podlegającej transformacji, poprzez wykorzystanie odpowiednio dobranego panelu przeciwciał monoklonalnych znakowanych fluorochromami.

Ocena ekspresji markerów aktywacji. Pod wpływem stymulacji limfocytów *in vitro* odpowiednimi antygenami lub miogenami na ich powierzchni pojawiają się tzw. markery aktywacji. Ich obecność można uwiidocznic przy pomocy cytometru przepływowego, wykorzystując znakowane przeciwciała monoklonalne. Za markery aktywacji limfocytów uważane są: CD25 (receptor dla IL-2), CD69, MHC klasy II (1, 5). Ocena ekspresji poszczególnych markerów aktywacji może być prowadzona równolegle z oceną subpopulacji limfocytów, co daje dodatkową informację na temat populacji, która w danym przypadku odpowiada na bodziec antygenowy. Dostępnych jest coraz więcej komercyjnych przeciwciał monoklonalnych przeciwko markerom aktywacji dla zwierząt. Pociąga to za sobą możliwość coraz pełniejszego wykorzystywania tej techniki w ocenie odporności komórkowej zwierząt. Jak wynika z piśmiennictwa, w części przypadków może dojść do ekspresji markerów aktywacji bez towarzyszącej temu proliferacji, co powoduje, że odpowiedź takich limfocytów mogłaby zostać przeoczona w teście transformacji blastycznej (2).

Ocena antygenowo-swoistej produkcji cytokin przez uczulone limfocyty T. Zdolność limfocytów do produkcji cytokin w odpowiedzi na badany antygen może być oceniona różnymi sposobami. Większość technik opiera się na wcześniejszej inkubacji limfocytów *in vitro* w obecności antygeny. Do najczęściej ocenianych interleukin należą IL-4 oraz INF- γ , jako dominujące produkty, odpowiednio, limfocytów Th₂ i Th₁.

Test immunoenzymatyczny (ELISA). Jednym ze sposobów oceny swoistej produkcji cytokin przez limfocyty jest oznaczenie poziomu cytokin obecnych w nadśączu pochodzącym z hodowli stymulowanej badanym antygenem. Nadśącz z hodowli jest kolekcjonowany po upływie określonego czasu kontaktu limfocytów z antygenem, najczęściej po 24-72 godzinach, a następnie oceniany immunoenzymatycznie w kierunku zawartości cytokin. Obecnie mamy do wyboru coraz więcej komercyjnych zestawów ELISA do ilościowych oznaczeń cytokin u różnych gatunków zwierząt. W przypadku braku komercyjnego zestawu można się oczywiście pokusić o opracowanie zestawu *in-house*. Niewątpliwą zaletą oceny produkcji cytokin przy pomocy testów ELISA jest możliwość przechowania próbek poprzez ich zamrożenie, a następnie poddania analizie dużej ich liczby jednocześnie. Metoda ta pozwala na stosunkowo dokładne określenie stężenia cytokin w badanym materiale, ale jest czasochłonna oraz obciążona ryzykiem błędów. Ponadto w czasie pomiaru można określić poziom tylko jednej cytokiny, co ze względu na duże koszty wykonania badania nie jest bez znaczenia (7). Minusem tej metody jest także brak możliwości określenia populacji komórek produkujących badane cytokiny.

Cytometryczne oznaczanie produkcji cytokin. Produkcja cytokin przez poszczególne populacje leukocytów (w tym limfocytów) może być także oznaczona z wykorzystaniem zestawów przeciwciał do wewnątrzkomórkowego ich barwienia, a następnie odczytana w cytometrze przepływowym. Do „uwieżenia” cytokin we wnętrzu badanych komórek stosuje się inhibitory transportu białek np. monenzynę. Tym sposobem możemy oznaczać cytokiny produkowane przez różne populacje, jak również zestaw cytokin produkowanych przez jedną komórkę (4). Ocena rodzaju produkowanych cytokin, z jednoczesną analizą fenotypu komórek, może być pomocna w określeniu polaryzacji odpowiedzi immunologicznej w kierunku Th₁ lub Th₂, gdyż obecnie jesteśmy w stanie zróżnicować te populacje jedynie na podstawie profilu wydzielanych przez nie cytokin (4, 7).

W medycynie ludzkiej stosuje się w ostatnich latach nowoczesną technikę, zwaną „cytometryczne macierze kulkowe” (Cytometric Beads Array – CBA). Wykorzystuje się w niej mikrokulki sprzężone z fluorochromem oraz kowalencyjnie związane z przeciwciałem monoklonalnym swoistym dla badanej cytokiny. Dzięki zastosowaniu tej techniki możemy w relatywnie krótkim czasie ocenić stężenie kilku, a nawet kilkunastu cytokin w jednej próbce (krwi, płynie wysiękowym, popłuczynach oskrzelowych, lizatach komórkowych czy pożywkach hodowlanych) (7). Technika CBA polega na pomiarze średniej wartości fluorescencji znacznika sprzężonego z daną grupą mikrokulek oraz różnicy intensywności fluorescencji po inkubacji materiału z przeciwcytokinowymi swoistymi przeciwciałami sprzężonymi z fikoerytryną (PE). Do zestawu testowego dołączone są standardy badanej cytokiny umożliwiające wyznaczenie krzywej standardowej, z której odczytywane jest stężenie badanej substancji. Istnieje już możliwość indywidualnego doboru mikrokulek połączonych z przeciwcia-

łami monoklonalnymi skierowanymi przeciwko cytokinom, co umożliwia tworzenie dowolnych paneli macierzy analitycznych oceniających koncentrację cytokin (7).

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR). Ocena transkrypcji genów kodujących badane cytokiny, zarówno po namnażaniu komórek *in vitro*, jak i bezpośrednio po pobraniu materiału, może być przeprowadzona z zastosowaniem techniki PCR. Dzięki dostępności sekwencji genów kodujących wiele cytokin zwierzęcych opracowanie odpowiednich zestawów starterów i sond nie powinno nastęrczać większych trudności (20). Technika ta umożliwia zbadanie aktywności transkrypcyjnej genów cytokin, a także ilościowe określenie poziomu ich produkcji przez badane limfocyty w obecności antygenów. Informacyjny RNA może być wyizolowany z limfocytów przy użyciu szeregu dostępnych zestawów komercyjnych, a następnie przepisany na DNA przy pomocy standardowych procedur. Stosując konwencjonalny PCR, powstałe w procesie amplifikacji produkty są poddawane procesowi elektroforezy w żelu agarozowym. Jest to jednak metoda jakościowa, nie dająca informacji o stężeniu cytokin w badanym materiale. Intensywność świecenia prążka może zostać wykorzystana jedynie do porównania różnych próbek badanych i w ten sposób wnioskowania o różnicach w koncentracji badanych cytokin pomiędzy próbkami. Zdecydowanie bardziej użyteczna jest reakcja łańcuchowa polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym QPCR (quantitative PCR). Technika ta pozwala oznaczyć ilość transkryptów cytokin z zachowaniem wysokiej czułości oraz dokładności. Odczyt następuje na podstawie pomiaru sygnału fluorescencji, który koresponduje z ilością zsyntetyzowanego produktu PCR. Real-time PCR pozwala na monitorowanie ilości produktu reakcji w każdym cyklu prowadzonej reakcji PCR, dzięki czemu cała procedura analizy jest bardzo szybka i pozwala wyeliminować etap szacowania produktu po zakończeniu reakcji. Monitorowanie przyrostu liczby kopii badanej sekwencji możliwe jest dzięki znakowaniu starterów lub sond oligonukleotydowych fluorochromami. Przyrost fluorescencji jest wprost proporcjonalny do liczby kopii DNA znajdującego się w badanej próbce. Koncentrację mRNA w badanej próbce odczytuje się z krzywej kalibracyjnej. Sporządza się w tym celu serię rozcieńczeń roztworu o znanej liczbie kopii RNA, wyznacza się wg nich krzywą kalibracyjną i znając przyrost fluorescencji, na podstawie krzywej odczytuje się liczbę cząstek. Metoda ta jest stosowana dosyć często u zwierząt ze względu na małą dostępność przeciwciał monoklonalnych oraz zestawów ELISA do oznaczeń cytokin zwierzęcych (15). Trzeba jednak pamiętać, że transkrypcja genu nie zawsze koreluje z syntezą odpowiednich białek. Ponadto technika wymaga posiadania przez laboratorium specjalistycznej aparatury.

Podsumowując, istnieje szereg technik, które mogą zostać wykorzystane samodzielnie lub symultanicznie do oceny odpowiedzi komórkowej ustroju, zarówno swoistej, jak i nieswoistej. Ich stosowanie w pracach badawczych z dziedziny immunologii, a zwłaszcza wakcynologii, będzie z pewnością cennym, a wręcz niezbędnym,

elementem doświadczenia. Szczególnie kluczowa wydaje się ocena swoistej odpowiedzi komórkowej, obok odpowiedzi humoralnej, w badaniach oceniających reakcję zwierzęcia na podany antygen szcepienkowy.

Piśmiennictwo

1. Canals A., Dominguez J., Tomilla J., Babin M., Alonsoet F.: Inhibition of IL-2R and SLA class II expression on stimulated lymphocytes by a suppressor activity found in homogenates of African swine fever virus infected cultures. Arch. Virol. 1995, 140, 1075-1085.
2. Caruso A., Licenziati S., Corulli M., Canaris A. D., Francesco De M. A., Fiorentini S., Peroni L., Fallacara F., Dima F., Balsari A., Turano A.: Flow cytometric analysis of activation markers on stimulated T cells and their correlation with cell proliferation. Cytometry 1997, 27, 71-76.
3. Dorn A. T., Waters W. R., Byers V. M., Pesch B. A., Wannemuehler M. J.: Characterization of mitogen-stimulated porcine lymphocytes using a stable fluorescent dye (PHK2) and multicolor flow cytometry. Vet. Immunol. Immunopathol. 2002, 87, 1-10.
4. Drela N.: Wykrywanie wewnątrzkomórkowych cytokin metodą cytometrii przepływowej – zastosowanie i problemy. Post. Biol. Kom. 2001, 28, 129-146.
5. Fachinger V., Schlapp T., Strube W., Schmeer N., Saalmüller A.: Poxvirus-induced immunostimulating effects on porcine leukocytes. J. Virol. 2000, 74, 7943-7951.
6. Givan A. L., Fisher J. L., Waugh M., Ernstoff M. S., Wallace P. K.: A flow cytometric method to estimate the precursor frequencies of cells proliferating in response to specific antigens. J. Immunol. Methods 1999, 230, 99-112.
7. Izycki D.: Zastosowanie cytometrii przepływowej w klinicznej diagnostyce laboratoryjnej. Voice 2006, 2, 8-17.
8. Kristensen C. S., Andreasen M., Ersbøll A. K., Nielsen J. P.: Antibody response in sows and piglets following vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* toxigenic *Pasteurella multocida* and *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Can. J. Vet. Res. 2004, 68, 66-70.
9. Mojžišova J., Hromada R., Paulik S., Ondrašovič M., Bajova V.: Immune response and immunomodulatory effect of levamisole in immunosuppressed dogs vaccinated against parvovirus. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2004, 48, 93-97.
10. Mosmann T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J. Immunol. Methods 1983, 65, 55-63.
11. Motubu M., El-Abasy M., Na K., Hirota Y.: Detection of mitogen-induced lymphocyte by bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation in chicken. J. Vet. Med. Sci. 2002, 64, 377-379.
12. Nowell P. C.: Differentiation of human leukemic leukocytes in tissue culture. Exp. Cell Res. 1960, 19, 267-277.
13. Nowell P. C.: Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res. 1960, 20, 462-466.
14. Pejsak Z., Markowska-Daniel I.: Randomised, placebo-controlled trial of a live vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome in sows on infected farms. Vet. Rec. 2006, 158, 475-478.
15. Raymond C. R., Wilkie B. N.: Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig T-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells. Vaccine 2004, 22, 1016-1023.
16. Riber U., Jungersen G.: Cell-mediated immune responses differentiate infections with *Brucella suis* from *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 2007, 116, 13-25.
17. Rustemeyer T., De Ligter S., Von Blomberg B. M. E., Frosch P. J., Schepers R. J.: Human T lymphocyte priming in vitro by haptenated autologous dendritic cells. Clin. Exp. Immunol. 1999, 117, 209-216.
18. Saker K. E., Kalnitsky J., Gogal R. M., Ward D. L.: Evaluation of a nonradioactive colorimetric assay for analysis of lymphocyte proliferation in healthy cats. Am. J. Vet. Res. 2001, 62, 567-571.
19. Sanchez A., Maruta C., Sato M., Ribeiro R., Zomignan C., Nunes R., Reis V.: Study on lymphocyte proliferation in nickel sensitive patients. An. Bras. Dermatol. 2005, 80, 149-158.
20. Sathiyaseelan T., Baldwin C. L.: Evaluation of cell replication by bovine T cells in polyclonally activated cultures using carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) loading and flow cytometric analysis. Res. Vet. Sci. 2000, 69, 275-281.
21. Stec J., Rachubik J., Szczotka M., Kuźmak J.: Effects of penicillium mycotoxins: citrinin, ochratoxin a, and patulin on in vitro proliferation of bovine lymphocytes. Bull. Vet. Inst. Pulawy 2008, 52, 163-167.
22. Waters W. R., Pesch B. A., Hontecillasa R., Saccoc R. E., Zuckermannd F. A., Wannemuehler M. J.: Cellular immune responses of pigs induced by vaccination with either a whole cell sonicate or pepsin-digested *Brachyspira* (*Serpulina*) hyodysenteriae bacterin. Vaccine 2000, 18, 711-719.
23. Waters W. R., Palmer M. V., Pesch B. A., Olsen S. C., Wannemuehler M. J., Whipple D. L.: Lymphocyte subset proliferation responses of *Mycobacterium bovis*-infected cattle to purified protein derivative. Vet. Immunol. Immunopathol. 2000, 77, 257-273.

Adres autora: dr Małgorzata Pomorska-Mól, Al. Partyzantów 57, 24-100 Pulawy; e-mail: mpomorska@piwet.pulawy.pl