

zalegały i w stanie prostracji ginęły pomimo leczenia (stosowano antybiotyki, wlewy elektrolitów, glukozy).

Właściwości chorobotwórcze 10 wyosobnionych szczepów *C. perfringens* A ilustruje tab. 2. Wynika z niej, że wytwarzały one nadzwyczaj silną toksynę alfa (4—8 DLM₁₀₀/ml, 1000—2000 j. zm./ml), theta (20—200 DHM/ml) i kappa (1—4 DCM/ml), a większość z nich także mi (128—1024 j. hial./ml) oraz ni (10—100 dawek wsk./ml).

Blizszego omówienia wymaga fakt nie wykazania toksyny alfa w jelitach padłych cieląt. Wytlumaczyć to można jej szybkim — w miejscu wytworzenia — związaniu przez tkanki (1, 20). Co więcej — wiadomo, że wprowadzona dożylnie zanika w 90% po 5 minutach (20), a dodatkowy wpływ neutralizujący wywiera cystyna i siarkowódór (20).

Uzyskane wyniki upoważniają do uznania etiologicznej roli — w opisanej biegunce cieląt — nienterotoksynogennych, ale aktywnych w zakresie wytwarzania toksyny alfa szczepów *C. perfringens* A. Za takim poglądem przemawia wysoka koncentracja zarazka, wielokrotnie przekraczająca wartość fizjologiczną (10⁸ g, wg 20). Poza tym wyosobnione szczepy cechowała nadzwyczaj silna toksynogenność w zakresie wielu toksyn, nade wszystko alfa — znanej jako czynnik destrukcyjny błon komórkowych (19, 20) i następnych, czasem nawet krwawych biegunek (7, 20, 22) obserwowanych w badanych stadach, a wcześniej opisanych przez innych autorów (cyt.

wg 7). Ostatecznego wreszcie dowodu dostarczyły wyniki badań przekonujące o możliwości zahamowania padnięć cieląt metodą ich immunizacji przeciw toksynie alfa, dawniej sygnalizowane (cyt. wg 7), a w pełni potwierdzone we własnej pracy (następna publikacja).

Piśmiennictwo

1. Aikat B. K., Dible J. H.: J. Path. Bact. 76, 431, 1956.
2. Briant P. C., Riemann H. P., Franti C. E., Torres Anjel M.: Revue Lat. Am Microbiol. 20, 135, 1978.
3. Cygan Z.: Clostridia w narządach zwierząt zdrowych i padłych, praca doktorska, Lublin 1967.
4. Cygan Z. M.: Choroby beztlenowcowe zwierząt. Akad. Roln., Lublin 1991.
5. Cygan Z., Wawrzekiewicz K.: Medycyna Wet. 24, 518, 1936.
6. Dart A. J., Pascoe R. P., Gibson J. A., Harrower B. J.: Aust. vet. J. 65, 330, 1988.
7. Daube G.: Annls Med. vet. 136, 5, 1990.
8. Ellner P. D.: J. Bact. 71, 495, 1956.
9. Griner L. A., Bracken F. K.: J. Am. vet. med. Ass. 124, 99, 1953.
10. Hepple J. R.: Vet. Rec. 55, 203, 1952.
11. MacRae D. R., Murray E. G.: Vet. Rec. 55, 703, 1967.
12. Mansson L., Olhagen B.: Bull. Off. int. Epizoot. 67, 1319, 1967.
13. Meisel H., Albrecht H.: Med. dośw. 1, 27, 1955.
14. Montgomerie R. P.: Rev. vet. Can. 3, 439, 1981.
15. Oakley C. L., Warrack G. H.: J. Path. Bact. 63, 45, 1951.
16. Pesti L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1955.
17. Schofield D. V., Frank W. J. Am. vet. med. Ass. 126, 192, 1955.
18. Sigurdsson S., Thorsteinsson T.: Vet. Rec. 126, 517, 1990.
19. Smith L. DS.: The pathogenic anaerobic bacteria. Butterworths, London and Boston 1975.
20. Smith L. DS.: Rev. infect. Dis. 1, 245, 1979.
21. Sterne M., Batty L.: Pathogenic Clostridia. Butterworths, London and Boston 1975.
22. Stubbings D. P.: Vet. Rec. 127, 431, 1990.
23. Warrack G. H., Bidwell E., Oakley C. L.: J. Path. Bact. 63, 293, 1951.
24. Worrall E. E., Ronohardjo L. N., Partoutomo S.: Vet. Rec. 121, 278, 1987.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6/13, 20-845 Lublin

JACEK KUŹMAK, LEOKADIA BICKA, JADWIGA GRUNDBOECK-JUŚKO,
EWA BUZAŁA*, BOŻENA KOZACZYŃSKA

Zastosowanie metody western blot do wykrywania antygenów wirusa białaczki bydła (BLV) w limfocytach zakażonych zwierząt

Zakład Biochemii i Pracownia Patologii Komórkowej* Instytutu Weterynarii,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Summary

Application of the Western blot method for the detection of viral proteins of bovine leukaemia virus (BLV) in lymphocytes of infected cattle

The protein antigens of BLV were detected in the lysates of bovine lymphocytes stimulated *in vitro* using the Western blot method. Specific antibodies against BLV were detected in the sera of animals by the ELISA test. Protein bands of the molecular weight 72, 51, 35 and 24 kD were detected by the rabbit antiserum against BLV in the blots from infected lymphocytes and FLK cells. The proteins mentioned above were not detected in the lysates of lymphocytes of uninfected animals. Densitometry analysis of immunoblots from FLK cells indicated that a minimal amount of 100 ug of gp51 viral protein can be discovered. The presence of BLV antigens and specific antibodies were detected in 18 of 25 animals. The antibodies were also found in four cows of the remaining seven animals whose lymphocytes were free from BLV proteins.

Western blot, określane też jako immunoblot, jest techniką badawczą stosowaną do analizy białek (27). Poddane elektroforetycznemu rozdzielaniu na żelu poliakrylamidowym (SDS-PAGE) i rozfrakcjonowane pod względem ich ciężaru cząsteczkowego białka, zostają przeniesione z żelu na filtr nitrocelulozowy, gdzie wykrywane są metodami immunoenzymatycznymi (26). Identyfikacja określonych białek, widocznych w postaci barwnych prążków, następuje na zasadzie porównania ich położenia z markerem ciężaru cząsteczkowego. W opinii wielu badaczy metoda western blot, w zależności od użytego systemu detekcji, dorównuje czułością metodzie ELISA i bez wątplenia jest metodą bardziej swoistą

W diagnostyce chorób zakaźnych metodą tą oznaczone mogą być swoiste przeciwciała (4, 6), względnie białka antygenowe. To ostatnie postępowanie stosowane było do wykrywania i identyfikowania antygenów rotawirusów (21), retrowirusów (19) i wirusa RSV (23).

W prezentowanej pracy zastosowano metodę western blot do wykrywania antygenów wirusa BLV

w limfocytach krwi obwodowej zakażonych krów. Jedną z konsekwencji zakażenia wirusem BLV jest obecność w limfocytach cząsteczek wirusa lub swoistych białek antygenowych (3). Ich oznaczenie ma mniejszą wartość diagnostyczną niż wykrywanie swoistych przeciwciał metodą immunodifuzji i ELISA. Postępowanie takie jest jednak przydatne w pierwszym okresie po zakażeniu oraz przy latentnym zakażeniu, co związane jest z brakiem odpowiadzi humoralnej.

Material i metody

Preparatyka limfocytów. Do izolacji limfocytów krew pobierano z żyły jarzmowej w ilości 10 ml z dodatkiem wersenianu. Krew, rozcieńczoną 1:1 PBS bez jonów Ca^{++} i Mg^{++} , nawarstwiano równą objętością na Lymphoprep (Nyegaard, Oslo) i wirowano 30 min. przy 2500 obr./min. Następnie zbierano warstwę limfocytów i płukano je dwa razy w podłożu hodowlanym RPMI 1640 (Gibco). Krew do badań pobrano od 25 krów ze stada, w którym stwierdzono wysoki procent zwierząt serologicznie dodatnich i od 5 krów ze stada, w którym od kilku lat nie stwierdzono zwierząt z wynikami dodatnimi.

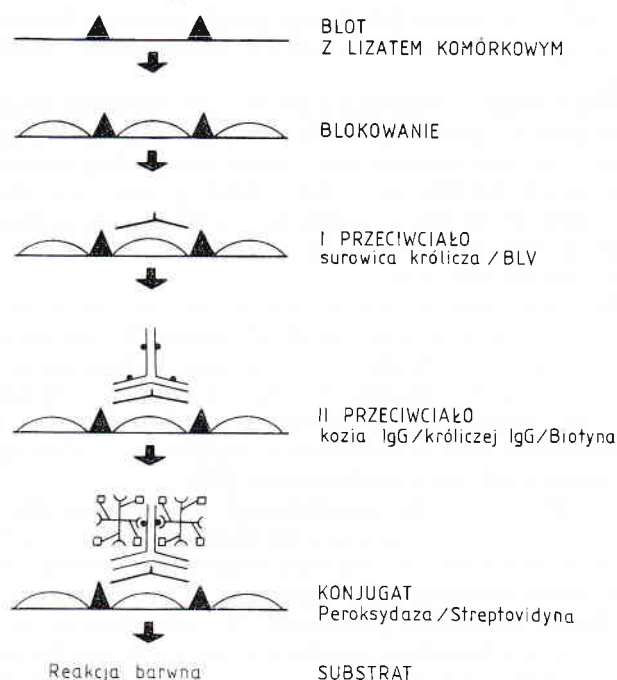
Hodowla limfocytów. Uzyskane komórki w koncentracji $2 \times 10^6/ml$ zawieszano w 10 ml podłoża RPMI z 20% surowicy cielęcej płodowej, 100 j/ml penicyliny, 100 ug/ml streptomycyny i mitogenami: PHA 10 ul/ml i PWM 10 ul/ml podłoża. Komórki hodowano w butelkach plastikowych (Falcon) przez 48 godz. w 37°C.

Preparatyka lizatów limfocytów. Komórki, w liczbie około 10^7 , zbierano z hodowli i płukano 2 razy w buforze (10 mM Tris—HCl pH 7,2 0,9% NaCl) i zawieszano w 1 ml takiego buforu uzupełnionego 0,05% Tritonu X-100 i 2 mM PMSF (fluorek fenylometylosulfonowy), a następnie inkubowano 20 min. w łaźni wodnej. Potem wirowano przy 3000 obr./min. i 5000 obr./min. przez 10 min. zbierano supernatant i przechowywano w -70°C. Podobnie postępowano z lizatami z komórek linii ciągłej FLK, permanentnie zakażonej wirusem BLV, użytej jako kontrola dodatnia reakcji.

Elektroforeza na żelu poliakrylamidowym i blot. Otrzymane supernatanty rozcieńczano 1:1 $2 \times$ stężonym buforem (125 mM Tris—HCl pH 6,8, 16% 2-merkaptotanol, 4% SDS, 20% glicerol, 0,002% błękit bromofenolowy) i ogrzewano 3 min. w 100°C. 15 ul próbki supernatantów rozdzielano elektroforetycznie na żelu poliakrylamidowym przy użyciu SE 280 Small Slab Unit (Hoefer), najpierw na 3% żelu koncentrującym przy 15 mA, a następnie na 10% żelu migracyjnym przy 20 mA w buforze (20 mM Tris, 152 mM glicyny, 0,1% SDS) o pH 8,5. W podobny sposób rozdzielano marker ciężaru cząsteczkowego będący mieszaniną: albuminy bydłej 66 kD, ovalbuminy 45 kD, pepsynogenu 34 kD i tripsynogenu 24 kD. Rozdzielone białka były następnie przenoszone na nitrocelulozę (Hybond-C, Ameraham) przy użyciu Mighty Small Transfor Unit (Hoefer) przy 60 V przez 1,5 godz. w buforze (20 mM Tris, 152 mM glicyny, 20% metanolu) o pH 8,5.

Immunoenzymatyczne wykrywanie białek. Ryc. 1 przedstawia schemat postępowania przy immunoenzymatycznym wykrywaniu białek. Po wysuszeniu nitrocelulozę cięto na paski i inkubowano kolejno z: A. 10% roztworem surowicy końskiej w buforze TBS (20 mM Tris, 0,5 M NaCl) o pH 7,5, 2 razy po 20 min., B. surowicą króliczą zawierającą przeciwciała swoiste dla BLV, rozcieńczoną 1/25 przez 1,5 godz., C. kozimi IgG przeciw króliczym IgG, znakowanymi biotyną (Sigma) w rozcieńczeniu 1/10 000 przez 1 godz., D. koniugatem peroksydaza-streptawidyna (Amersham) w rozcieńczeniu 1/300 przez 1 godz., E. roztworem substratu — 0,5 mg/ml dwuaminobenzydyny (DAB) (Sigma) w 10 mM Tris pH 7,5 z 0,2 ml 1% roztworu H_2O_2 i inkubowano 10—15 min. w ciemni. Po około 1—2 godz. paski płukano w TBS z surowicą końską. Każda inkubacja poprzedzona była trzema płukaniami po 5 min. w buforze TBS z 0,05% Tweenu 20. Swoistą dla BLV antysurowicę otrzymano uodporniając króliki lizatami korpuskularnego wirusa BLV, otrzymanego wg metody podanej przez Steca i wsp. (25).

Ocena czułości metody western blot. Liza-



Ryc. 1. Schemat postępowania przy immunoenzymatycznym wykrywaniu białek antygenowych wirusa BLV

ty z komórek FLK rozcieńczano od 1/2 do 1/64, oznaczając stężenie białka metodą spektrofotometryczną. Rozcieńczone lizaty poddano procedurze opisanej wyżej. Intensywność zabarwienia prążków analizowano densytometrem TLD 100 (Vitatron) przy 365 nm. Zawartość białka we frakcjach o określonym ciężarze cząsteczkowym oznaczano analizując poszczególne densytogramy.

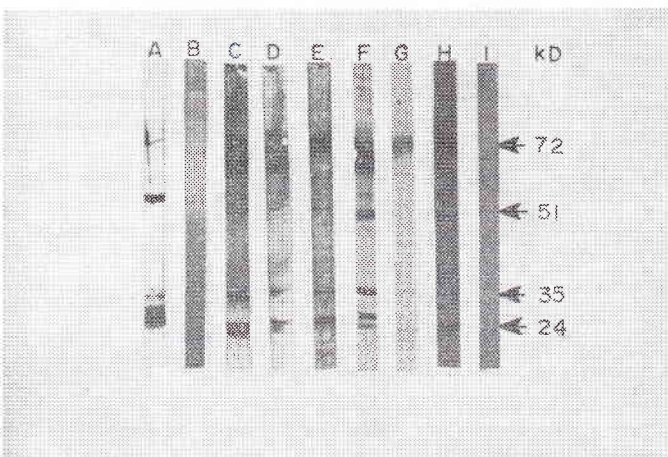
Oznaczenie swoistych przeciwciał. Swoiste przeciwciała w surowicy krwi oznaczano metodą immunoenzymatyczną ELISA wykorzystując zestaw diagnostyczny SERELIFFA firmy Rhône-Merieux, zgodnie z zaleceniami producenta.

Wyniki i omówienie

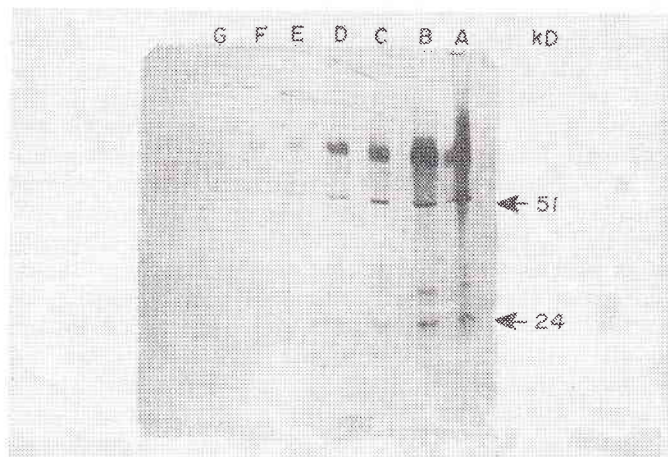
W omawianej pracy przedstawiono zastosowanie metody western blot do wykrywania antygenów wirusa BLV w lizatach hodowanych *in vitro* limfocytów, izolowanych od zakażonych zwierząt. Konieczność hodowli limfocytów stymulowanych mitogenami wynika z faktu, że *in vivo* w limfocytach transkrypcja białek wirusowych jest blokowana przez czynnik o nieznanym charakterze (11) i BLV pozostaje w stanie latencji, a zabiegi te mają na celu odblokowanie transkrypcji białek wirusowych (8). Jakkolwiek komórkami docelowymi dla BLV są limfocyty B (20), to w badaniach użyto mitogenów stymulujących obydwie subpopulacje T i B, co spowodowane jest faktem, że dla pełnej ekspresji BLV potrzebne są limfokiny produkowane przez limfocyty T (7).

Na ryc. 2 zestawiono bloty zawierające różne lizaty. Analiza ich wykazała, że białka wirusowe reagujące dodatnio z surowicą anti-BLV mają ciężar około 7—72 kD, 51 kD, 35 kD i 24 kD. Białek tych nie wykrywano, gdy badano lizaty otrzymane z limfocytów nie zakażonych zwierząt (blot I). Nie obserwowano również dodatnich reakcji stosując, jako pierwsze przeciwciała, normalną surowicę króliczą (blot B).

W lizatach z leukocytów zakażonych zwierząt



Ryc. 2. Analiza białek antygenowych wirusa BLV w różnych lizatach. Scieżka A — lizat wirusa BLV, B i C — lizat komórek FLK, D — H — lizaty limfocytów krów zakażonych, I — lizat limfocytów krów nie zakażonych



Ryc. 3. Ocena czułości metody western blot na podstawie analizy białek antygenów BLV w rozcieńczonych lizatach. Scieżki od A — G przedstawiają kolejne rozcieńczenia (1/1—1/64) lizatu komórek FLK

(blot D-H) i lizatach komórek FLK (C) surowica anti-BLV szczególnie silnie reagowała z białkiem o ciężarze 72—70 kD. W badaniach nad biogenezą białek BLV, Mamcun i wsp. (14) obserwowali podobną reakcję, za którą odpowiedzialny był prokursor dla gp 51 gp 35, białko o ciężarze 72 kD. Jego obecność w zakażonych komórkach jest wynikiem translacji wirusowego mRNA o stałej sedymentacji 35 s, będącego produktem transkrypcji genów gag-pol prowirusowego DNA (9). Potwierdzeniem tego może być fakt, że najsilniejsza reakcja z białkiem 72 kD obserwowana była w lizatach komórek FLK i lizatach limfocytów krwi z postacią guzową białaczki (D). W komórkach tych występuje intensywna synteza białek wirusowych. Natomiast bardzo słabą reakcję obserwowano w lizacie z korpuskularnego wirusa (A).

We wszystkich analizowanych blotach reakcja z białkiem o ciężarze 24 kD i 35 kD była o wiele silniejsza niż z białkiem 51 kD. Jest to glikoproteid otoczki wirusa (gp51), zawierający spośród ośmiu, trzy główne epitopy (F, G, H), niezbędne do indukowania przeciwciał neutralizujących (2). Epitopy te obecnie są na natywnym antygenie, lecz warunki, jakim były poddawane lizaty (temp. 100°C w obecności SDS oraz działanie Tritonu X-100) niszczy je (15). Słaba reakcja z antygenem gp51 spowodowana mogła być destrukcją tych epitopów, względnie wynikać mogła z niskiego miana przeciwciał w surowicy królików immunizowanych nie natywnym BLV, lecz jego lizatem.

W dwóch badanych blotach (G, F) razem z białkiem 24 kD, któremu odpowiada polipeptyd rdzenia wirusa (p24), obserwowano komponentę o ciężarze 26—28 kD. Według Walkera i wsp. (28) spowodowane jest to akumulacją, w trakcie mrożenia w -70°C, nieglikozydowanego fragmentu gp 51.

Na ryc. 3 przedstawiono ocenę czułości metody western blot. Analiza densytometryczna blotów wykazała, że metodą tą można wykryć glikoproteid gp 51 jeszcze w rozcieńczeniu 1/32, co odpowiada około 100 ng białka. Polipeptyd p 24 wykrywany był w ilości około 1,1 ug. W przedstawionym sposobie detekcji zastosowano system z tzw. drugim przeciwciałem, tj. biotynolowane kozie IgG przeciw króliczym IgG i koniugat peroksydaza-streptawidyna. Po-

Tab. 1. Wyniki badań porównawczych oznaczania przeciwciał i antygenów BLV u 25 krów

WESTERN BLOT	+	ELISA		
		+	-	
	+	16	2	18
	-	4	3	7
		20	5	25

równując różne systemy detekcji Oberfeld (17) wykazał, że stosując ten system wykryć można około 50 ug białka i taki system jest czterokrotnie czulszy od systemu bez streptawidyny. Ta wysoka czułość obserwowana przez licznych badaczy (1, 22) wynika z faktu, że biotynolowane IgG zawierają liczne cząsteczki kowalencyjnie związanej biotyny, która mając silne powinowactwo do streptawidyny (stała reakcji $K = 10^{-15} M^{-1}$) (10) powoduje wysoką retencję koniugatu peroksydazowego na membranie i w efekcie silny sygnał. Dodatkową zaletą stosowania streptawidyny jest fakt, że w przeciwieństwie do awidyny, koniugaty takie nie dają reakcji nieswoistych (12).

W tab. 1 przedstawiono wyniki badań porównawczych oznaczania antygenów BLV w limfocytach 25 krów i obecności przeciwciał w surowicy krwi tych zwierząt. Ścisłą korelację między tymi parametrami stwierdzono u 16 zwierząt. Rezultaty niezgodne obserwowano u 4 krów, u których obecność przeciwciał nie korelowała z dodatnimi wynikami metody western blot oraz u 2 zwierząt, u których mimo obecności białek wirusowych w limfocytach, w surowicy krwi nie obserwowano przeciwciał dla BLV. Z diagnostycznego punktu widzenia ten ostatni przypadek ma pewne znaczenie. Wskazuje bowiem, że w stadach zakażonych BLV istnieje pewien odsetek zwierząt (8%), u których mimo faktycznego stanu zakażenia, badanie metodami serologicznymi jest nieskuteczne. Spowodowane jest to wczesną fazą zakażenia, kiedy brak jest przeciwciał, względnie ich miano jest niewykrywalne testem ELISA. Według Kono i wsp. (13), dodatni wynik testu syncytialnego z limfocytami eksperymentalnie zakażonych cieląt obserwowany był 4—5 dnia po zakażeniu, a swoiste przeciwciała wykrywane były dopiero począwszy od 8—12 dnia.

Stwierdzenie u 4 krów obecności swoistych przeciwciał przy negatywnym wyniku w metodzie western blot wynikać może z niewystarczającej czułości tej metody, spowodowanej niewielką liczbą zainfekowanych limfocytów w krwi obwodowej. Cockerell i wsp. (5) podają, że u serologicznie dodatnich, hematologicznie ujemnych krów jedynie około 10% limfocytów jest nosicielami prowirusowego DNA, które są potencjalnie zdolne do ekspresji białek wirusowych. W grupie 45 serologicznie dodatnich krów stwierdzili oni ekspresję antygeny gp 51 jedynie u 10 zwierząt. Hipotetycznie przyjąć można pogląd o istnieniu innych, niż limfocyty krwi obwodowej, miejsc replikacji wirusa. Potwierdzają to badania Murtaugh i wsp. (16), którzy pośród 18 serologicznie dodatnich krów, u trzech nie wykazali cząsteczek wirusa, ani też prowirusowego DNA w limfocytach krwi obwodowej.

Przedstawione wyniki wskazują, że metoda western blot, pomimo dość skomplikowanej procedury i konieczności posiadania odpowiedniego wyposażenia, jest swoistą i czułą metodą, pozwalającą na wykrywanie białek antygenowych wirusa BLV w limfocytach zakażonych zwierząt.

Piśmiennictwo

1. Brower M., Brankel C., Garry K.: Anal. Biochem. 147, 382, 1985.
2. Bruck C., Portetelle D., Mammerickx M., Mathot M., Burny A.: Leukemia Res. 8, 315, 1984.

3. Burny A., Cleuter Y., Kettmann R., Mammerickx M., Marbaix G.: Adv. in Vet. Sci. and Comp. Med. 32, 149, 1988.
4. Christie K., Flaegstad T., Traavik T.: J. Med. Virol. 24, 183, 1988.
5. Cockerell G., Rovak J.: Leukemia Res. 12, 465, 1988.
6. Caldwell H., Stewart S., Johnson S., Taylor H.: Infect. Immun. 55, 93, 1987.
7. Cornil L., Delon P., Parodi A., Lewy D.: Leukemia, 2, 313, 1988.
8. Cornil L., Lewy D.: Leukemia, 3, 159, 1970.
9. Ghysdael J., Kattmann R., Burny A.: Ann. Res. Vet. 9, 627, 1978.
10. Green N.: Adv. Prot. Chem. 39, 85, 1970.
11. Gupta Ph., Kashmiri S., Ferrer J.: J. Virol. 50, 287, 1984.
12. Hoffmann K., Wood S., Brinton G., Montibeller J., Finn F.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4666, 1980.
13. Kono Y., Sentsui H., Arai K.: Jpn. J. Vet. Sci. 45, 799, 1983.
14. Mamoun R., Astier T., Guillemain B., Duplan J.: J. Gen. Virol. 64, 1791, 1983.
15. Merza M., Linne T., Hoglund S., Portetelle D., Morein B.: Vaccine 7, 32, 1989.
16. Murtang M., Lin G., Haggard D., Weber A.: J. Virol. Meth. 33, 73, 1991.
17. Oberfeld R.: Focus, 11, 1, 1989.
18. Oda T., Hatsuchika M., Watanabe S., Ikeda S., Sumii H.: Cell. Mol. Biol. 32, 243, 1986.
19. O'Shannessy D., Voorstad P., Quarles R.: Anal. Biochem. 163, 274, 1987.
20. Paul P., Pomeroy K., Johnson D., Muscoplat C., Handwerker B., Sorensen D.: Am. J. Vet. Res. 38, 173, 1977.
21. Reynolds D., Hughes J.: J. Infect. Dis. 152, 647, 1985.
22. Roffman E., Meromsk Y., Ben-Hur H., Bayer E.: Biochem. Biophys. Res. Commun. 136, 83, 1986.
23. Routhedge E., Willcocks M., Morgan L., Samson A.: J. Gen. Virol. 68, 1219, 1987.
24. Slavikova K., Kettmann R., Reinerova M., Zajec V., Portetelle D., Burny A.: Neoplasma 34, 653, 1987.
25. Stez J., Grundboeck J., Grundboeck M.: Med. Wet. 41, 117, 1985.
26. Stott D.: J. Immunol. Meth. 119, 153, 1989.
27. Towbin H., Staehelin T., Gordon J.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 4350, 1979.
28. Walker P., Molloy J., Rodwell B.: J. Virol. Meth. 15, 201, 1987.

Adres autora: dr Jacek Kuźmak, ul. Kościuszki 12 m. 4, 24-100 Puławy

BOŻENA MOSKWA

Zmiany liczebności populacji limfocytów T u owiec i jagniąt nie immunizowanych oraz immunizowanych przeciw inwazji przywry *Parafasciolopsis fasciolaemorpha*

Instytut Parazytologii im. Witolda Stefńskiego PAN, ul. Pasteura 3, 00-973 Warszawa

Summary

Changes in the number of T lymphocytes in sheep and lambs immunized as well as not immunized against the invasion of the trematode *P. fasciolaemorpha*

The experiment was carried out on sheep and lambs inoculated orally with 10 000 mc *P. fasciolaemorpha*. Some of the animals were given intramuscular injections of the somatic antigen from adult flukes together with complete Freund's adjuvant against parasitic infection. Changes in the percentage of T lymphocytes were examined. A slight increase in the number of T lymphocytes was observed in infected animals but stronger reaction was found in lambs. In adult sheep the average intensity of infection was 27.89% compared with only 9.41% in lambs. Statistically significant high levels of lymphocytes also occurred in infected animals after intramuscular immunization up to the end of the prepatent phase of infection. This

increase took place more rapidly and was higher in comparison with nonimmunized hosts. In immunized animals the average intensity was lower: 7.33% in sheep and 3.85% in lambs.

Badania reakcji immunologicznych owiec zarażonych eksperymentalnie *Parafasciolopsis fasciolaemorpha* wykazały obecność przeciwciał precypitujących i wiążących dopełniacz, głównie klasy IgG i IgA (10). Po jednorazowym zarażeniu zwierząt wyższe miana immunoglobulin obserwowano w patentnej fazie inwazji (9). Badania reakcji immunologicznych zwierząt zarażonych *Fasciola hepatica* wykazują dominującą rolę reakcji humoralnych (6). Uzyskiwanie odporności na inwazję drogą przeszczepiania komórek od zwierząt zarażonych jest potwierdzeniem obecności reakcji typu komórkowego. Wynik taki uzyskano u szczurów, owiec i bydła (12, 16). Wykazano ponadto, że komórki przeszczepiane od dawców zarażonych wysoką dawką metacerkarii