UTJECAJ IMUNOMODULATORA MIKROBNOG PODRIJETLA NA STANIČNU IMUNOST SVINJA CIJEPLJENIH ATENUIRANIM CJEPIVOM PROTIV BOLESTI AUJESZKOGA

Andrišić, Miroslav

Doctoral thesis / Disertacija

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:178:995456

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Veterinary Medicine - Repository of PHD, master's thesis

DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI



Sveučilište u Zagrebu

VETERINARSKI FAKULTET

Miroslav Andrišić

UTJECAJ IMUNOMODULATORA MIKROBNOG PODRIJETLA NA STANIČNU IMUNOST SVINJA CIJEPLJENIH ATENUIRANIM CJEPIVOM PROTIV BOLESTI AUJESZKOGA

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2018.

University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Miroslav Andrišić

EFFECT OF IMMUNOMODULATORS OF MICROBIAL ORIGIN ON CELL-MEDIATED IMMUNITY OF PIGS VACCINATED WITH ATTENUATED VACCINE AGAINST AUJESZKY'S DISEASE

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2018

Sveučilište u Zagrebu
VETERINARSKI FAKULTET

MIROSLAV ANDRIŠIĆ

UTJECAJ IMUNOMODULATORA MIKROBNOG PODRIJETLA NA STANIČNU IMUNOST SVINJA CIJEPLJENIH ATENUIRANIM CJEPIVOM PROTIV BOLESTI AUJESZKOGA

DOKTORSKI RAD

Mentori:
Prof. dr. sc. Frane Božić
Doc. dr. sc. Svjetlana Terzić

Zagreb, 2018.

University of Zagreb
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Miroslav Andrišić

EFFECT OF IMMUNOMODULATORS OF MICROBIAL ORIGIN ON CELL-MEDIATED IMMUNITY OF PIGS VACCINATED WITH ATTENUATED VACCINE AGAINST AUJESZKY'S DISEASE

DOCTORAL THESIS

Supervisors:
Prof. Frane Božić, PhD
Asst. Prof. Svjetlana Terzić, PhD

Zagreb, 2018



VETERINARSKI FAKULTET

I Z J A V A

Ja, Miroslav Andrišić, potvrđujem da je moj doktorski rad izvorni rezultat mojega rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima do onih navedenih u radu.

Miroslav Andrišić

Zagreb, 2018.

SAŽETAK

Bolest Aujeszkoga (BA) je akutna virusna zarazna bolest uzrokovana svinjskim herpes virusom 1 (SHV-1). Najznačajnija mjera iskorjenjivanja BA u domaćih svinja je cijepljenje. Iako se u programima iskorjenjivanja BA mogu koristiti markirana cjepiva koja sadržavaju atenuirani ili inaktivirani SHV-1, kao i subjedinična cjepiva, cjepiva s atenuiranim SHV-1 su se pokazala učinkovitijima u poticanju stanične imunosti. Nadalje, istraživanja su utvrdila da inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* i kombinacija inaktivirane bakterije *Propionibacterium granulosum* i detoksificiranih lipopolisaharida (LPS) bakterije *Escherichia coli* imaju izražena imunomodulacijska svojstva te da njihova primjena s cjepivima može u svinja rezultirati jačim imunosnim odgovorom na razini stanične i humoralne imunosti u odnosu na primjenu samo cjepiva.

Nakon što su svinjama primijenjeni cjepivo (atenuirani SHV-1), odabrani imunomodulatori (inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* ili kombinacija inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli*) ili cjepivo s pojedinim imunomodulatorom, provedene su hematološke pretrage uzoraka periferne krvi, određena su protutijela za glikoproteine B (gB) i E (gE) SHV-1 u uzorcima seruma te je analiziran fenotip NK stanica, B limfocita i T limfocita, kao i pojedinih populacija i subpopulacija T limfocita u uzorcima mononuklearnih stanica periferne krvi.

Rezultati hematoloških pretraga bili su unutar referentnih vrijednosti u većini skupina tijekom cijelog pokusa. Serumska protutijela za gB SHV-1 utvrđena su nakon jedanaestog dana pokusa samo u cijepljenih svinja, a protutijela za gE SHV-1 nisu utvrđena niti u jedne svinje. Primjena cjepiva i/ili imunomodulatora nije imala značajan učinak na udjele T i B limfocita te NK stanica u limfocitima periferne krvi, kao ni na većinu istraživanih subpopulacija T limfocita periferne krvi. Zajednička primjena cjepiva s kombinacijom inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS bakterije *E. coli* je sedmi dan pokusa potaknula statistički značajno veći porast udjela $CD4^{+}CD8\alpha^{+}$ i $CD4^{-}CD8\alpha^{+}$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi. Rezultati ukazuju na adjuvantni učinak jednokratne primjene cjepiva i dvokratne primjene kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS bakterije *E. coli* na subpopulacije T limfocita svinja s važnim funkcijama stanične imunosti u zaštiti svinja od infekcije sa SHV-1.

Ključne riječi: cjepiva protiv bolesti Aujeszkoga, imunomodulatori, stanična imunost, višebojna protočna citometrija

ABSTRACT

INTRODUCTION: Aujeszky's disease (AD) is an infectious disease of many mammalian species. It is caused by suid herpesvirus 1 (SuHV-1) which belongs to the *Herpesviridae* family. Domestic pigs and wild boar are natural hosts of SuHV-1 because they are the only species that can survive infection. Aujeszky's disease is economically important because it can cause a high mortality in suckling piglets, slower growth of fattening pigs and reduced fertility in sows. SuHV-1 persists in latent state in pigs that survive infection. That is why many countries completed eradication programs for AD while in others eradication programs are still in process. Although many countries are free of AD in domestic pigs, SuHV-1 circulates in wild boar populations which can be the source of infection for domestic pigs. One of the most important measures for eradication of AD in domestic pigs is vaccination with marker vaccines and the use of appropriate diagnostic tests which can distinguish infected from vaccinated animals (DIVA vaccines, Differentiating Infected from Vaccinated Animals). The most widely used marker vaccines are the ones that lack glycoprotein E of SuHV-1. Marker vaccines that contain the whole virus (attenuated or inactivated) or viral glycoproteins (subunit vaccines) are available. Although vaccines with inactivated SuHV-1 and subunit vaccines are generally considered to be safer, vaccines with attenuated SuHV-1 have shown to be more efficacious in inducing protective immunity in pigs and stronger cell-mediated immune response. Previous studies also showed that SuHV-1 can stimulate different components of innate and adaptive immunity in pigs and that antibodies protect pigs from mortality after SuHV-1 infection, but early protection against clinical signs and reduced virus shedding after infection were related to *in vitro* T-cell proliferation. Development of monoclonal antibodies directed against porcine leukocyte differentiation antigens have led to immunophenotyping of different T-cell subpopulations and enabled the study of their immune functions and development of more efficacious vaccines. Flow cytometry is one of the most commonly used techniques for analysis of cell phenotype, which also enables quantitative analysis of cell subpopulations. Although much knowledge about phenotype and function of porcine NK cells and different T-cell subpopulations is gained by *in vitro* studies with SuHV-1, little is known about frequencies of NK cells and different T-cell subpopulations in peripheral blood of pigs vaccinated or infected with SuHV-1. Immunostimulators are biological or chemical substances that stimulate mechanisms of innate and adaptive immunity in a non-specific way. Some immunostimulators, mainly bacteria, components of bacterial cells and plant extracts, are used in veterinary medicine for immunotherapy but can be also

used as adjuvants in veterinary and human vaccines, because they can accelerate, enhance or prolong the immune response to vaccine antigen. The studies have shown that administration of vaccines together with inactivated *Parapoxvirus ovis* or combination of inactivated *Propionibacterium granulosum* and detoxified lipopolysacharides (LPS) of *Escherichia coli* in pigs can induce stronger humoral and cellular immune responses than sole administration of vaccines.

The aim of this research is to determine effects of selected immunomodulators of microbial origin and vaccine against AD on leukocytes, NK, B- and T-cells and T-cell subpopulations in peripheral blood of pigs. Results might provide an insight whether use of investigated immunomodulators can enhance cell-mediated immunity in pigs vaccinated with attenuated SuHV-1 and whether their use at the time of vaccination against AD is justified.

MATERIAL AND METHODS: For the purpose of this research a study using six groups of five, three month old, pigs was conducted. Pigs from five groups were intramuscularly injected with: i) one dose of vaccine (attenuated SuHV-1, strain Bartha K-61 gE-); ii) two doses of inactivated *Parapoxvirus ovis*; iii) two doses of the combination of an inactivated *P. granulosum* and detoxified LPS of *E. coli*; iv) one dose of vaccine together with two doses of *Parapoxvirus ovis* or v) one dose of vaccine together with two doses of combination of inactivated *P. granulosum* and detoxified LPS of *E. coli*. Sixth group was negative control. Samples of peripheral blood were collected by venipuncture on days 1, 7, 11 and 18. Clinical health of animals was observed at least once daily throughout the study. Differential blood count (DBC) and complete blood count (CBC) were analysed in peripheral blood samples by microscopy and automated hematology analyser. Antibodies for SuHV-1 glycoproteins B (gB) and E (gE) in serum samples were analysed by ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay). Phenotype of NK cells ($CD3^-CD16^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^-$), B-cells ($CD3^-CD21^+$) and T-cells ($CD3^+CD16^-$) and phenotype of T-cell subpopulations with respect to expression of TCR-δ, CD4, CD8α and SLA-DR were analysed in samples of peripheral blood mononuclear cells by multicolour flow cytometry.

RESULTS: Local and general reactions were not observed in any group. Results of DBC and CBC were within reference values in most groups during entire study. Serum antibodies for SuHV-1 gB were present only in vaccinated groups from day 11. Serum antibodies for SuHV-1 gE were absent in all groups during entire study. Vaccine and/or immunomodulators did not show a significant effect neither on relative numbers of T-, B- and NK cells in peripheral

blood lymphocytes, nor on the relative numbers of most T-cell subpopulations. On study day 7 group that received vaccine together with the combination of an inactivated *P. granulosum* and detoxified LPS of *E. coli* induced significantly higher ($p < 0.05$) relative numbers of $CD4^+CD8\alpha^+$ and $CD4^-CD8\alpha^+$ αβ-T cell subpopulations in peripheral blood T-cells compared to the other groups, except the one that received the same immunomodulator alone.

CONCLUSION: Administration of a combination of an inactivated *P. granulosum* and detoxified LPS of *E. coli* together with an attenuated SuHV-1 showed a synergistic effect on αβ-T cell subpopulations that contain activated/memory helper T cells and SLA I restricted cytolytic T cells, later of which seem important for early protection of pigs against SuHV-1 infection.

This research suggests that a combination of an inactivated *P. granulosum* and detoxified LPS of *E. coli* is a potential adjuvant candidate for vaccines against AD. Further studies should be undertaken to evaluate the fraction of virus specific T cells within $CD4^+CD8\alpha^+$ and $CD4^-CD8\alpha^+$ αβ-T cell subpopulations.

KEY WORDS: Vaccines against Aujeszky's Disease, Immunomodulators, Cell-mediated Immunity, Multicolour Flow Cytometry

Zahvaljujem se mentorima doc. dr. sc. Svjetlani Terzić i prof. dr. sc. Frani Božiću na vodstvu, stručnoj pomoći i potpori prilikom izrade doktorskog rada.

Zahvaljujem se Hrvatskom veterinarskom institutu, posebice akademiku Željku Cvetniću i izv. prof. dr. sc. Borisu Habrunu na ukazanoj sveobuhvatnoj potpori prilikom izrade doktorskog rada te dr. sc. Kseniji Šandor na pomoći i savjetima.

Zahvaljujem se dr. sc. Kreši Bendelji, viši znanstveni suradnik iz Imunološkog zavoda Zagreb i kolegici Andreji Jungić, dr. med. vet. iz Laboratorija za serološku dijagnostiku na savjetima i pomoći prilikom izvođenja laboratorijskih pretraga, a ponajviše susretljivosti.

Također se zahvaljujem Ireni Žarković, dr. med. vet., Anji Vujnović, dr. med. vet. i ostalim kolegicama iz Laboratorija za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka uz čiju pomoć je ovaj doktorski rad završen.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Miroslavu Beniću i Luki Cvetniću, dr. med. vet. iz Laboratorija za mastitise, prof. dr. sc. Nadi Oršolić iz Zavoda za animalnu fiziologiju PMF-a, Jadranki Foršek, dipl. ing. s Veterinarskog fakulteta Zagreb i drugim kolegama i prijateljima koji su mi pomogli u izvođenju praktičnog dijela ili na bilo koji način doprinijeli izradi ovog doktorskog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji na podršci i razumijevanju.

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA 5

2.1. Bolest Aujeszkoga 6

2.1.1. Uzročnik bolesti Aujeszkoga i primljive vrste 6

2.1.2. Klinički znakovi bolesti Aujeszkoga u domaćih svinja 7

2.1.3. Rasprostranjenost i iskorjenjivanje bolesti Aujeszkoga 8

2.1.4. Cjepiva protiv bolesti Aujeszkoga 9

2.2. Mehanizmi imunosnog sustava protiv virusnih infekcija 11

2.2.1. Mehanizmi urođene imunosti 12

2.2.2. Mehanizmi stečene imunosti 14

2.3. Fenotip T limfocita svinja 18

2.4. Fenotip NK stanica svinja 24

2.5. Fenotip B limfocita svinja 25

2.6. Fenotip T limfocita i NK stanica svinja nakon izlaganja SHV-1 26

2.7. Imunomodulatori 28

2.7.1. Imunomodulacijsko djelovanje virusa *Parapoxvirus ovis* 30

2.7.2. Imunomodulacijsko djelovanje lipopolisaharida i bakterija iz roda *Propionibacterium* 31

3. OBRAZLOŽENJE TEME 34

4. MATERIJAL I METODE 37

4.1. Materijal 38

4.1.1. Životinje u pokusu 38

4.1.2. Cjepivo i imunomodulatori 38

4.1.3. Kompleti za serološke pretrage 38

4.1.4. Monoklonska protutijela za višebojnu protočnu citometriju 39

4.2. Plan istraživanja 40

4.2.1. Pokus 40

4.2.2. Uzorci 41

4.3. Metode 41

4.3.1. Hematološke pretrage 41

4.3.1.1. Kompletna krvna slika 41

4.3.1.2. Diferencijalna krvna slika 41

4.3.2. Serološke pretrage 43
4.3.2.1. Priprema uzoraka krvnog seruma 43
4.3.2.2. Dokazivanje serumskih protutijela za gE SHV-1 43
4.3.2.2.1. Etape metode 43
4.3.2.2.2. Izračun rezultata 45
4.3.2.2.3. Tumačenje rezultata 45
4.3.2.3. Dokazivanje serumskih protutijela za gB SHV-1 46
4.3.2.3.1. Etape metode 46
4.3.2.3.2. Izračun rezultata 46
4.3.2.3.3. Tumačenje rezultata 47
4.3.3. Višebojna protočna citometrija 47
4.3.3.1. Izdvajanje PBMC-a na gradijentu gustoće 47
4.3.3.2. Odmrzavanje i priprema PBMC-a za obilježavanje 48
4.3.3.3. Priprema monoklonskih protutijela 49
4.3.3.3. Obilježavanje uzoraka PBMC-a korištenjem monoklonskih protutijela 50
4.3.3.5. Analiza obilježenih PBMC-a protočnim citometrom 52
4.3.3.6. Izračun rezultata 54
4.3.4. Statistička obrada rezultata 58
5. REZULTATI 59
5.1. Zdravstveni nadzor životinja u pokusu 60
5.2. Serumska protutijela za gE i gB SHV-1 60
5.3. Rezultati hematoloških pretraga 60
5.4. Fenotip T i B limfocita te NK stanica periferne krvi 70
6. RASPRAVA 82
7. ZAKLJUČCI 101
8. POPIS LITERATURE 103
9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA 133

1. UVOD

Bolest Aujeszkoga (BA) je virusna zarazna bolest mnogih vrsta domaćih i divljih sisavaca, uzrokovana svinjskim herpes virusom 1 (SHV-1) koji pripada porodici *Herpesviridae*. Svinje, domaće i divlje, prirodni su domaćini SHV-1 i jedine su vrste koje mogu preživjeti infekciju. Klinička slika BA u domaćih svinja prvenstveno ovisi o dobi i imunosnom statusu svinja te o virulenciji sojeva SHV-1. Oboljela sisajuća prasad pokazuje teške neurološke poremećaje uz vrlo visoki pomor (do 100%). S porastom dobi pomor se smanjuje, a simptome infekcije središnjeg živčanog sustava zamjenjuju simptomi infekcije dišnog sustava. Pomor u odraslih svinja je 1-2%, ali su ekonomske štete zbog manjeg prirasta uzrokovanog infekcijom velike. Uz to, transplacentalna infekcija sa SHV-1 može uzrokovati uginuće plodova, pobačaj ili mrtvorođenu prasad. Svinje koje prežive infekciju sa SHV-1 ostaju latentno inficirane.

Stoga su u mnogim zemljama provedeni programi iskorjenjivanja BA ili se još uvijek provode. Unatoč iskorjenjivanju BA u domaćih svinja, u mnogim zemljama SHV-1 je prisutan u populacijama divljih svinja te su stoga one mogući izvor infekcije za domaće svinje. Jedna od glavnih mjera iskorjenjivanja BA u domaćih svinja je primjena tzv. „markiranih" cjepiva za koja moraju biti dostupni odgovarajući dijagnostički testovi (cjepiva „DIVA", engl. *Differentiating Infected From Vaccinated Animals*). Markiranim cjepivima protiv BA nedostaje jedan ili više glikoproteina ovojnice SHV-1 ili njegov enzim timidin-kinaza. Dijagnostičkim testovima moguće je razlikovati serumska protutijela potaknutih virulentnim sojevima SHV-1 od onih potaknutih tzv. „markiranim cjepivima" protiv BA, odnosno moguće je razlikovati zaražene od cijepljenih svinja. S obzirom da su se imunoenzimski testovi (engl. *Enzyme Linked Immunosorbant Assay*, ELISA) za dokazivanje serumskih protutijela za glikoprotein E (gE) SHV-1 pokazali pouzdanijima od testova ELISA za dokazivanje serumskih protutijela za druge glikoproteine SHV-1, u programima iskorjenjivanja BA najčešće se koriste markirana cjepiva kojima nedostaje gE. Markirana cjepiva protiv BA mogu sadržavati atenuirani ili inaktivirani SHV-1, ili samo glikoproteine SHV-1 (subjedinična cjepiva). Iako su cjepiva s inaktiviranim virusom i subjedinična cjepiva općenito sigurnija i prikladnija za određene skupine životinja (vrlo mlade ili gravidne životinje), istraživanja su pokazala da su cjepiva s atenuiranim SHV-1 većinom učinkovitija u zaštiti domaćih svinja od infekcije te da mogu bolje potaknuti staničnu imunost.

Dosadašnja istraživanja su također pokazala da SHV-1 u svinja potiče aktivnost različitih komponenti urođene i stečene imunosti te da protutijela mogu zaštiti svinje od uginuća uzrokovanog infekcijom sa SHV-1, ali da je rano smanjenje kliničkih znakova i

izlučivanje virusa nakon infekcije sa SHV-1 povezano s *in vitro* proliferacijom specifičnih T limfocita.

Razvoj monoklonskih protutijela za leukocitne antigene svinja omogućio je identifikaciju fenotipa pojedinih subpopulacija T limfocita u svinja te podrobnije istraživanje njihovih funkcija, posebice u razvoju učinkovitijih cjepiva. Protočna citometrija je jedna od najčešće korištenih tehnika za analizu fenotipa stanica te kvantitativno određivanje zastupljenosti pojedinih subpopulacija stanica. Ujedno, u kombinaciji s drugim tehnikama, neophodna je za određivanje funkcije limfocita na staničnoj razini.

Iako su spoznaje o fenotipu i funkciji NK stanica te pojedinih subpopulacija T limfocita svinja značajno doprinijela istraživanja sa SHV-1, nedostaju studije koje pokazuju promjene u udjelima NK stanica te pojedinih subpopulacija T limfocita u krvi svinja cijepljenih ili inficiranih sa SHV-1 bez *in vitro* manipulacije.

Imunostimulatori su tvari biološkog ili kemijskog podrijetla koje nespecifično potiču aktivnost mehanizama urođene i stečene imunosti te se stoga mogu primijeniti u slučajevima kao što su stres, nezrelost imunosnog sustava te zarazne, kronične i tumorske bolesti, odnosno kada treba pojačati opću otpornost organizma. Neki imunostimulatori, ponajviše bakterije, dijelovi bakterijske stanice te biljni ekstrakti, koriste se u veterinarskoj medicini u terapijske svrhe, a brojne tvari se još uvijek intenzivno istražuju. Osim samostalno, imunostimulatori se primjenjuju i u cjepivima za ljude i životinje kao adjuvansi jer mogu ubrzati, produljiti ili pojačati specifični odgovor imunosnog sustava na cjepni antigen.

Imunostimulacijsko djelovanje inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* te inaktiviranih bakterija iz roda *Propionibacterium* dokazano je u ljudi i životinja. Inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* te kombinacija inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih lipopolisaharida (LPS) bakterije *Escherichia coli* se u veterinarskoj medicini primjenjuju samostalno za povećanje opće otpornosti organizma i kao pomoć u sprječavanju i liječenju infekcija. Istraživanja su također pokazala da primjena cjepiva svinjama zajedno s inaktiviranim virusom *Parapoxvirus ovis* ili kombinacijom inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* može rezultirati jačim imunosnim odgovorm na razini stanične i humoralne imunosti u odnosu na primjenu samo cjepiva.

Pretpostavka ovog istraživanja je da istovremena primjena imunomodulatora mikrobnog podrijetla u kombinaciji s cjepivom protiv BA u svinja potiče bržu pojavu većih udjela populacija i subpopulacija limfocita periferne krvi, koje su se prema dosadašnjim spoznajama pokazale važnim za ranu zaštitu od prirodne infekcije sa SHV-1, nego primjena samo cjepiva.

Cilj istraživanja je utvrditi učinke odabranih imunomodulatora mikrobnog podrijetla i cjepiva protiv BA na raspodjelu leukocita, NK stanica, B limfocita, T limfocita te njihovih subpopulacija u perifernoj krvi svinja nakon zasebne primjene i usporediti ih s učincima zajedničke primjene cjepiva protiv BA s pojedinim imunomodulatorom. Dodatno, cilj je istražiti moguće sinergijsko djelovanje istraživanih imunomodulatora i cjepiva protiv BA na subpopulaciju citotoksičnih T limfocita, važnu za ranu zaštitu svinja od infekcije, odnosno moguću opravdanost primjene istraživanih imunomodulatora prilikom cijepljenja svinja protiv BA.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Bolest Aujeszkoga

2.1.1. Uzročnik bolesti Aujeszkoga i primljive vrste

Bolest Aujeszkoga (BA) je virusna zarazna bolest mnogih domaćih i divljih sisavaca, kao što su svinje, goveda, ovce, psi, mačke, konji, kunići, lisice, kune, štakori, miševi, medvjedi, rakuni, kojoti, jeleni i pume (BITSCH i MUNCH, 1971.; FIELD i HILL, 1974.; PENSAERT i KLUGE, 1989.; KIMANN i sur., 1991.; GLASS i sur., 1994.; CAPUA i sur., 1997.; BANKS i sur., 1999.).

Bolest Aujeszkoga uzrokuje svinjski herpes virus 1 (SHV-1) koji pripada porodici *Herpesviridae,* potporodici *Alphaherpesvirinae* i rodu *Varicellovirus* (DAVISON, 2010.). Kao i ostali herpesvirusi, SHV-1 se sastoji od jezgre s dvostrukom uvojnicom deoksiribonukleinske kiseline (DNK), nukleokapside oblika ikozaedra, proteinskog tegumenta i lipidne ovojnice koja potječe od unutarstaničnih membrana domaćina (METTENLEITER, 2008.). Ovojnica sadržava glikoproteine B (gB), ranije poznat i kao gII, gC (ranije poznat i kao gIII), gD (ranije poznat i kao g50), gE (ranije poznat i kao gI), gG (ranije poznat i kao gX), gH, gI (ranije poznat i kao g63), gK, gL, gM i gN, koji su važni za ulazak SHV-1 u stanice domaćina, izlazak iz stanica, širenje između stanica, virulenciju i za izazivanje imunosnog odgovora domaćina (METTENLEITER, 2000.; ZUCKERMAN, 2000.).

Svinje, domaće i divlje, prirodni su rezervoar SHV-1 jer su jedini domaćini koji mogu preživjeti infekciju uzrokovanu navedenim virusom (METTENLEITER, 2000.). Ljudi i viši primati nisu primljivi za infekciju uzrokovanu SHV-1 (KLUGE i sur., 1999.). Iako je poznat samo jedan serotip SHV-1, sojevi SHV-1 se razlikuju s obzirom na virulenciju, tropizam nakon infekcije i patogenezu. U svinja su vrlo virulentni sojevi SHV-1 neuroinvazivni, dok slabije virulentni sojevi imaju tropizam za pluća. U drugih primljivih vrsta životinja SHV-1 je isključivo neuroinvazivan. SHV-1 se u svinja primarno umnaža u epitelnim stanicama gornjeg dišnog sustava (nosna šupljina, tonzile, ždrijelo) i pluća. Neuroinvazivni sojevi ulaze u živce koji inerviraju mjesto primarnog umnažanja, posebice olfaktorni, trigeminalni i glosofaringealni živac i centripetalno se šire do tijela živčanih stanica. Nakon umnažanja u središnjem živčanom sustavu (SŽS) slijedi viremija koja omogućuje širenje virusa u različite organe i posljedično umnažanje u epitelnim stanicama, endotelnim stanicama krvnih žila, limfocitima i makrofagima (NAUWYNCK, 1997.; KRITAS i sur., 1999.; METTENLEITER i sur., 2012.).

2.1.2. Klinički znakovi bolesti Aujeszkoga u domaćih svinja

Težina kliničkih znakova BA u domaćih svinja ovisi o dobi, imunosnom statusu, virulenciji sojeva SHV-1 i putu infekcije (NAUWYNCK, 1997.). Prasad na sisi pokazuje izražene neurološke poremećaje kao što su tremor, hipersalivacija, nekoordinacija, ataksija, napadaji, paraliza stražnjih nogu, nemogućnost ustajanja uz veslanje nogama ili hodanje u krug. Prasad ove dobne skupine ugiba 24 do 36 sati nakon pojave simptoma SŽS-a, uz visoki pomor koji može doseći 100%. Odbijena prasad u dobi od 3 do 4 tjedana također pokazuje neurološke poremećaje nakon infekcije, ali uz manji pomor (oko 50%). Nakon infekcije svinja u dobi od 5 do10 tjedana, osim neuroloških poremećaja, javlja se potištenost, anoreksija i vrućica te simptomi infekcije dišnog sustava kao što su kihanje, iscjedak iz nosa, jaki kašalj i otežano disanje, a zbog slabijeg apetita javlja se gubitak tjelesne mase. Simptomi u ovoj dobnoj skupini obično traju 5 do 10 dana i pomor najčešće ne prelazi 10% ako se spriječe sekundarne bakterijske infekcije. U odraslih svinja prevladavaju simptomi infekcije dišnog sustava te se, uz opće simptome (vrućica, potištenost, smanjeni apetit), pojavljuju kihanje i iscjedak iz nosa koji mogu preći u teže simptome, kao što su jaki kašalj i otežano disanje. Simptomi u odraslih svinja traju 6 do10 dana pri čemu može uginuti 1 do 2% inficiranih životinja. Bolesne životinje imaju manji prirast, gube tjelesnu masu i sporadično mogu pokazivati simptome SŽS-a, od blagog tremora do jakih konvulzija. U gravidnih krmača SHV-1 može proći posteljicu i, u slučaju infekcije tijekom prve trećine graviditeta, može uzrokovati uginuće i resorpciju plodova, a u slučaju infekcije tijekom zadnje dvije trećine graviditeta pobačaj, mrtvorođenu prasad ili uginuće prasadi unutar 48 sati nakon prasenja (KLUGE i sur., 1999.).

U svinja koje prežive infekciju, SHV-1 uzrokuje doživotnu latentnu infekciju (WITTMANN i RZIHA, 1989.). Mjesta latentne infekcije SHV-1 u domaćih svinja najčešće su ganglij trigeminalnog živca i tonzile, a u divljih svinja sakralni gangliji, što ukazuje na to da se u divljih svinja SHV-1 uglavnom prenosi spolnim putem. Tijekom latentne infekcije ne dolazi do tvorbe potpunog virusa, već je prisutna samo virusna DNK izvan kromosoma domaćina (RZIHA i sur., 1986.; BROWN i sur., 1995.; ROMERO i sur., 2003.). Stres (npr. transport), hormonalna neravnoteža (npr. graviditet i prasenje) i primjena imunosupresivnih tvari (npr. deksametazon) mogu izazvati reaktivaciju SHV-1 u latentno inficiranih svinja (MENGELING i sur., 1992.; METTENLEITER i sur., 2012.). Latentno inficirane svinje mogu u slučaju reaktivacije i izlučivanja SHV-1 biti izvor infekcije za druge svinje te druge

primljive vrste. Za ostale primljive vrste sisavaca BA je smrtonosna, a jedini klinički znak može biti jaki svrbež praćen samoozljeđivanjem (METTENLEITER i sur., 2012.).

Bolest je prvi puta opisana u goveda 1813. godine u Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) pod nazivom „*Mad Itch*", zbog izraženog svrbeža. U Švicarskoj je 1849. godine bolest nazvana „lažna bjesnoća", zbog simptoma sličnih bjesnoći. Mađarski veterinar Aládar Aujeszky je 1902. godine dokazao da je bolest zarazna jer je prenošenjem izolata podrijetlom od bolesnog vola, psa i mačke na kuniće uspio uzrokovati slične simptome, ali različite od simptoma bjesnoće. Od tada je bolest bila poznata pod nazivom „bolest Aujeszkoga". Njemački znanstvenik Schmiedhoffer je 1910. godine prvi dokazao da BA uzrokuje virus, a američki znanstvenik Shope 1931. godine da je virus BA prisutan i u uzgojima domaćih svinja. Traub je 1933. godine u Njemačkoj prvi uspio umnožiti virus BA na staničnoj kulturi, a Sabin i Wright su ga godinu dana kasnije svrstali u skupinu herpesvirusa (NAUWYNCK, 1997.; METTENLEITER i sur., 2012.).

2.1.3. Rasprostranjenost i iskorjenjivanje bolesti Aujeszkoga

Do 1960. godine SHV-1 je bio slabo rasprostranjen izvan istočne Europe, ali je do 1989. godine utvrđen u 43 zemlje svijeta (PENSAERT i KLUGE, 1989.).

Bolest Aujeszkoga uzrokuje velike izravne gospodarske štete u svinjogojstvu (uginuće, slabiji rast, pobačaj), ali i neizravne (zabrana izvoza proizvoda podrijetlom od svinja iz zemalja u kojima je SHV-1 prisutan ili u kojima se provodi cijepljenje protiv BA u zemlje sa statusom slobodnih od SHV-1), BOUMA, 2005. Stoga su u mnogim zemljama provedeni nacionalni programi iskorjenjivanja BA u domaćih svinja. Navedeni programi uspješno su provedeni u Austriji, Republici Češkoj, Danskoj, Finskoj, većini Francuske, Njemačkoj, Mađarskoj, Luksemburgu, Nizozemskoj, Švedskoj, Švicarskoj, Slovačkoj, Velikoj Britaniji, Kanadi, SAD-u te na Cipru i Novom Zelandu. Bolest Aujeszkoga se enzootski još uvijek pojavljuje u zemljama jugoistočne Europe, Južnoj Americi, Aziji i Africi (METTENLEITER i sur., 2012.; WU i sur., 2013.). Iako je BA iskorijenjena u domaćih svinja u mnogim zemljama, SHV-1 je još uvijek prisutan u populacijama divljih svinja, što je dokazano serološkim nadzorom i izdvajanjem virusa (HAHN i sur., 2010; MÜLLER i sur., 2010.; BOADELLA i sur., 2012.). Isti autori su zaključili da inficirane divlje svinje predstavljaju stalnu opasnost za prijenos SHV-1 na domaće svinje. Serumska protutijela za SHV-1 dokazana su i u populacijama divljih svinja i u uzgojima domaćih svinja u Republici Hrvatskoj (ŽUPANČIĆ i sur., 2002.; ROIĆ i sur., 2013.).

Programi iskorjenjivanja BA u domaćih svinja se, ovisno o zemljopisnom položaju pojedinih zemalja i regija te prevalenciji infekcije sa SHV-1, mogu temeljiti na ekonomskom iskorištavanju (klanju) cijelih zaraženih stada ili samo životinja s protutijelima za SHV-1, primjeni tzv. „markiranih cjepiva" i provođenju bio-sigurnosnih mjera (NAUWYNCK i PENSAERT, 1994.; STEGMAN i sur., 1997.).

2.1.4. Cjepiva protiv bolesti Aujeszkoga

Za cijepljenje svinja protiv BA najčešće se primjenjuju markirana cjepiva zbog njihove važnosti za programe iskorjenjivanja. Markirana cjepiva protiv BA mogu sadržavati samo pojedine glikoproteine SHV-1 ili SHV-1 kojem nedostaju geni za jedan ili više glikoproteina virusne ovojnice ili virusni enzim timidin-kinazu (TK). Poznati su cjepni sojevi SHV-1 (soj Norden podrijetlom od soja Bucharesti i soj Bartha) koji su atenuirani *in vitro* pasažama (MCFERRAN i DOW, 1975.; LOMNICZI i sur., 1984a.) i za koje je utvrđeno da im nedostaje gE (METTENLEITER i sur., 1985.). Kasnije su proizvedeni cjepni sojevi SHV-1 kojima je rekombinantnom DNK tehnologijom uklonjen gE (QUINT i sur., 1987.), gC (KIT i sur., 1987.) ili gG (MARCHIOLI i sur., 1987.). Navedenim cjepnim sojevima rekombinantnom DNK tehnologijom dodatno je uklonjen enzim timidin-kinaza (TK) pri čemu su dobiveni mutirani virusi s dvostrukom delecijom gena za pojedine virusne glikoproteine i TK, s vrlo izraženom atenuacijom (KIT i sur., 1987.; MOORMANN i sur., 1990.; SWENSON i sur., 1993.; WU i sur., 2016.). Glikoproteini C, G i E, su zajedno s gI, gM i gN, neesencijalni glikoproteini jer ne utječu na umnažanje SHV-1 (METTENLEITER i sur., 2012.). Glikoprotein E je, uz TK, i jedan od glavnih čimbenika virulencije i neuroinvazivnosti SHV-1 u svinja (LOMNICZI i sur., 1984b.; MCGREGOR i sur., 1985.; KRITAS i sur., 1994.), dok je gC, uz gB i gD, važan za poticanje imunosnog odgovora protiv SHV-1 (GERDTS i sur., 1997.; ZARIPOV i sur., 1998.; VAN ROOIJ i sur., 1998.; 2000.). Osim markiranih cjepiva s atenuiranim SHV-1, mogu se primjenjivati i markirana cjepiva s inaktiviranim SHV-1 ili markirana subjedinična cjepiva koja sadržavaju samo neke od glikoproteina SHV-1. Ova cjepiva se ponajviše koriste u slučajevima kada treba osigurati neškodljivost primjene, kao npr. u slučaju cijepljenja gravidnih krmača (VANDEPUTTE i sur., 1990.; NAUWYNCK i PENSAERT, 1994.; MENGELING i sur., 1997.).

U svrhu epizootiološkog praćenja infekcije svinja sa SHV-1 razvijeni su dijagnostički testovi koji omogućuju razlikovanje serumskih protutijela potaknutih virulentnim sojevima virusa i markiranim cjepivima protiv BA, odnosno razlikovanje zaraženih i cijepljenih svinja

(VAN OIRSCHOT i sur., 1986.). Stoga se u programima iskorjenjivanja BA domaćih svinja koriste markirana cjepiva za koja su dostupni dijagnostički testovi za serološko razlikovanje zaraženih i cijepljenih svinja te se još nazivaju i cjepiva „DIVA" (engl. *Differentiating Infected From Vaccinated Animals*), (VAN OIRSCHOT, 1999.). S obzirom da su se imunoenzimski testovi (engl. *Enzyme Linked Immunosorbant Assay*, ELISA) za dokazivanje serumskih protutijela za gE SHV-1 pokazali pouzdanijima od testova ELISA za dokazivanje serumskih protutijela za gG SHV-1 (SCHMITT i sur., 1991.; WHITE i sur., 1996.), u programima iskorjenjivanja BA najčešće se koriste markirana cjepiva kojima nedostaje gE SHV-1, posebice u zemljama članicama Europske Unije (NAUWYNCK i PENSAERT, 1994.; MENGELING i sur., 1997.).

Cijepljenje domaćih svinja ima važnu ulogu u programima iskorjenjivanja BA u zemljama/regijama s velikom gustoćom svinja i velikom prevalencijom infekcije sa SHV-1, jer se cijepljenjem postiže sprječavanje širenja virusa i smanjenje broja zaraženih životinja, te njihovo uklanjanje ili klanje tako postaje ekonomski prihvatljivo (STEGMAN i sur., 1995.; ELBERS i STEGMAN, 1996.; PENSAERT i sur., 2004.). Zahtjevi za učinkovitost cjepiva protiv BA (ANONIMNO, 2012a.; 2017a.; 2017b.), prilikom njihovog odobravanja za stavljanje u promet u zemljama članicama EU, propisuju da svinje bez serumskih protutijela za SHV-1 nakon cijepljenja i infekcije virulentnim sojem SHV-1 u pokusnim uvjetima moraju: 1) biti zaštićene od uginuća uzrokovanog virulentnim sojem SHV-1, 2) izlučivati virulentni soj u značajno nižem titru i kraćem vremenu nego necijepljene svinje te 3) imati statistički značajno veći prirast od necijepljenih svinja tijekom prvih sedam dana od početka infekcije virulentnim sojem (STELLMANN i sur., 1989.). Budući da u terenskim uvjetima majčinska protutijela za SHV-1 mogu utjecati na razvoj imunosti nakon cijepljenja, također je važno ispitati učinkovitosti cjepiva protiv BA i u prasadi podrijetlom od cijepljenih krmača (VISSER, 1997.).

Rezultate učinkovitosti cjepiva protiv BA pojedinih studija teško je uspoređivati zbog različitih programa cijepljenja, različitih cjepnih i virulentnih sojeva SHV-1 i njihovih doza te s obzirom na prisutnost majčinskih protutijela za SHV-1 i njihovu razinu u trenutku cijepljenja. Međutim, cjepiva s atenuiranim SHV-1 su se uglavnom pokazala učinkovitijima u smanjenju kliničkih znakova i izlučivanja virusa u svinja nakon izazivačke infekcije s virulentnim sojevima SHV-1 (DE LEEUW i VAN OIRSCHOT, 1985.; VANNIER, 1986.; VAN ROOIJ i sur., 2004.), kao i u povećanju prirasta u terenskim uvjetima (DE LEEUW i VAN OIRSCHOT, 1985.; VANNIER, 1985.) od cjepiva s inaktiviranim SHV-1. Intramuskularna (i/m) primjena cjepiva protiv BA najčešći je način cijepljenja svinja

(VISSER, 1997.), ali su intradermalni i intranazalni (i/n) načini primjene pokazali podjednaku učinkovitost (VISSER i sur., 1994.; LABARQUE i sur., 1999.). Dvokratno cijepljenje rezultira učinkovitijom zaštitnom imunosti protiv BA od jednokratnog cijepljenja, posebice u terenskim uvjetima s visokim rizikom od infekcije virulentnim sojevima SHV-1 (STEGEMAN i sur., 1995.), kao i u svinja s majčinskim protutijelima za SHV-1 (BOUMA i sur., 1997.).

Provedena su istraživanja i s eksperimentalnim rekombinantnim virusnim cjepivima, odnosno plazmidnim vektorima, koji kodiraju za gene glikoproteina SHV-1. Primjena cjepiva s rekombinantnim vakcinija virusom koji eksprimira gB ili gD SHV-1 (BROCKMEIER i sur., 1997.) ili cjepiva s plazmidnim vektorima koji kodiraju za gene gD (HAAGMANS i sur., 1999.), gC (GERDTS i sur., 1997.), gB i gD (VAN ROOIJ i sur., 2006.) ili gB, gC i gD SHV-1 (DORY i sur., 2005.) može smanjiti pomor, kliničke znakove i izlučivanje virusa nakon infekcije svinja s virulentnim sojem SHV-1. Isti rezultati su postignuti kombiniranom primjenom cjepiva s rekombinantnim ORF virusom (*Parapoxvirus*) koji eksprimira gD SHV-1 i cjepiva s plazmidnim vektorom koji kodira za gene istog glikoproteina (VAN ROOIJ i sur., 2010.), kao i kombiniranom primjenom cjepiva s rekombinantnim ORF virusom koji eksprimira gC i gD SHV-1 i cjepiva s plazmidnim vektorom koji kodira za gene istih glikoproteina (DORY i sur., 2006.). Istraživanja koja su proveli VAN ROOIJ i sur. (2006.; 2010.) pokazala su da su cjepiva s rekombinantnim virusom i/ili s plazmidnim vektorom koji eksprimira/kodira glikoproteine SHV-1 manje učinkovita u svinja bez majčinskih protutijela od cjepiva s atenuiranim SHV-1, ali da je njihova prednost manja mogućnost utjecaja majčinskih protutijela za SHV-1 na razvoj imunosti (VAN ROOIJ i sur., 2006.).

Iako cjepiva protiv BA mogu smanjiti ili spriječiti štetne posljedice infekcije svinja virulentnim sojevima SHV-1 (kliničke znakove i smanjenje prirasta), ne mogu spriječiti infekciju i umnažanje virulentnih sojeva SHV-1 u cijepljenih svinja te posljedično pojavu latentne infekcije (KLUGE i sur., 1999.). Međutim, cijepljenje svinja atenuiranim sojevima SHV-1 ipak može smanjiti razinu latentne infekcije virulentnim sojevima (SCHANG i sur., 1994.; VILNIS i sur., 1998.).

2.2. Mehanizmi imunosnog sustava protiv virusnih infekcija

U zaštiti životinja od virusnih infekcija sudjeluju mehanizmi urođene imunosti koji podjednako djeluju na različite patogene i mehanizmi stečene imunosti koji djeluju samo na određene (specifične) patogene (TIZARD, 2000a.). Komponente oba tipa imunosti važne su

za zaštitu organizma od infekcije i međusobno su povezane. Komponente urođene imunosti štite organizam u ranoj fazi infekcije i neophodne su za razvoj stečene imunosti u slučaju prvog kontakta organizma s nekim antigenom. Stoga u slučaju prvog kontakta s nekim patogenom komponente stečene imunosti štite organizam u kasnijoj fazi infekcije, djelujući izravno na određeni patogen ili na stanice inficirane tim patogenom. U slučaju ponovne infekcije s istim patogenom odgovor komponenti stečene imunosti puno je brži i dodatno pojačava aktivnost komponenti urođene imunosti (CHRISTOPHER i sur., 2012.).

2.2.1. Mehanizmi urođene imunosti

Komponente urođene imunosti koje životinje štite od virusnih infekcija uključuju fagocite, sustav komplementa, interferone i NK stanice, dok su dendritične stanice važne za razvoj stanične imunosti (TIZARD, 2000a.).

Fagociti važni za obranu organizma od infekcija uzrokovanih različitim mikroorganizmima, uključujući i viruse, su makrofagi i neutrofili.

Neutrofili su fagociti koji pripadaju granulocitima ili polimorfonuklearnim leukocitima, zajedno sa eozinofilima i bazofilima. Potječu od mijeloidne loze stanica koštane srži i manji broj (1 do 2%) cirkulira u krvi, dok je većina neutrofila prisutna u kapilarama jetre, slezene, pluća i koštane srži (TIZARD, 2013a.). Neutrofili se vrlo brzo aktiviraju tijekom upalne reakcije. Njihova glavna funkcija je fagocitoza mikroorganizama, nakon što ih u područje upale privuku tvari koje sintetiziraju mikroorganizmi, proteini koje eksprimira endotel krvnih žila nakon aktivacije medijatorima upale, komponente aktiviranog sustava komplementa, ili tvari koje oslobađaju limfociti na mjestu infekcije ili upale. Neutrofili mogu fagocitirati mikroorganizme izravno, ali ih najčešće fagocitiraju nakon opsonizacije protutijelima ili komponentama aktiviranog sustava komplementa. Mehanizmi kojima neutrofili mogu ubiti mikroorganizme nakon unošenja u stanicu fagocitozom, prvenstveno su usmjereni na bakterije i uključuju razgradnju lizosomalnim hidrolitičkim enzimima te izravnu baktericidnost putem antibakterijskih peptida i reaktivnih kisikovih metabolita, zbog kojih potencijalno mogu djelovati fungicidno i virucidno (CHRISTOPHER i sur., 2012.).

Makrofagi su mononuklearni fagociti koji potječu od monocita, odnosno od mijeloidne loze stanica koštane srži (EZQUERRA i sur., 2009.). Osim što se mogu naći u različitim tkivima svinja, makrofagi su prisutni i između endotelnih stanica kapilara limfnih čvorova, slezene, koštane srži i pluća. Mehanizmi ubijanja mikroorganizama makrofagima jednaki su kao i u neutrofila, ali makrofagi mogu fagocitirati ugibajuće i mrtve stanice te ih,

osim tvari koje oslobađaju bakterije i komponenti aktiviranog sustava komplementa, na mjesto aktivnosti privlače i tvari koje oslobađaju oštećene stanice. Makrofagi na upalno područje dospijevaju kasnije od neutrofila, ali zato mogu djelovati dulje te fagocitirati bakterije koje ne mogu fagocitirati neutrofili. Zajedničko svojstvo makrofaga i neutrofila je da osim mikroorganizma, mogu fagocitirati i stanice inficirane virusima kada su opsonizirane protutijelima, što je jedan od mehanizama stanične citotoksičnosti ovisne o protutijelima (engl. *Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity*, ADCC) jer imaju receptor za vezanje lanca Fc (engl. *Fragment Cristallizable*) protutijela (CHRISTOPHER i sur., 2012.). Makrofagi svinja sintetiziraju i citokine, kao što su interleukin 1β (IL-1β), IL-6, IL-8, IL-12 i faktor nekroze tumora-α (TNF-α), važne za regulaciju imunosnog odgovora (FAIRBAIRN i sur., 2011.).

Dendritične stanice su, kao i makrofagi, prisutne u mnogim organima, ali se od makrofaga razlikuju po podrijetlu, izgledu i funkciji. Poznate su dvije glavne populacije dendritičnih stanica, odnosno mijeloične i plazmacitoidne dendritične stanice. Mijeloične dendritične stanice, kao i makrofagi potječu od monocita, dok plazmacitoidne dendritične stanice potječu od limfoidne loze stanica koštane srži. Dendritične stanice imaju dulje i tanje citoplazmatske izdanke od makrofaga te, iako i makrofagi T limfocitima mogu prikazati dijelove antigena nakon unošenja u stanicu (engl. *Antigen Presenting Cells*, APC), dendritičnim stanicama je to glavna funkcija i barem su sto puta učinkovitije od makrofaga. Stoga su dendritične stanice glavna poveznica urođene i stečene imunosti. Za zaštitu od virusnih infekcija posebno su važne plazmacitoidne dendritične stanice. To su dugoživuće stanice koje su najviše prisutne u krvi, koštanoj srži i limfatičnim tkivima. Osim što mogu T limfocitima prikazati antigene, one na viruse reagiraju sintezom interferona tipa I, kao što je IFNα (SUMMERFIELD i MCCULLOUGH, 2009.; TIZARD, 2013b.; DAY i SCHULTZ, 2013a.). Interferoni tipa I (IFNα i IFNβ) pojačavaju otpornost stanica na virusnu infekciju, aktiviraju NK stanice i pojačavaju ekspresiju molekula glavnog sustava tkivne podudarnosti (engl. *Major Histocompatibility Complex*, MHC) klase II (MHC II), odnosno prikazivanje stranih antigena. Osim plazmacitoidnih dendritičnih stanica, interferone tipa I sintetiziraju i mnoge druge stanice inficirane virusom (CHRISTOPHER i sur., 2012.; DAY i SCHULTZ, 2013b.).

Urođenoubilačke ili NK stanice (engl. *Natural Killer Cells*) potječu od limfoidne loze stanica koštane srži. U svinja su NK stanice prisutne u krvi, različitim limfatičnim tkivima (slezeni, limfnim čvorovima, tonzilama, timusu) te jetri i plućima. Nakon infekcije NK stanice se brzo aktiviraju i migriraju na mjesto infekcije (unutar 1 do 2 dana). Obrambene

funkcije NK stanica uključuju nespecifično liziranje tumorski promijenjenih stanica i stanica inficiranih virusima, ovisno ili neovisno o protutijelima (CRISTOPHER i sur., 2012.; DAY i SCHULTZ, 2013b.). Ujedno, NK stanice sintetiziranje citokina IFN-γ i TNF-α (MAIR i sur., 2013.). Ti citokini sudjeluju u regulaciji imunosnog odgovora, pri čemu IFN-γ aktivira stanice stečene i urođene imunosti, dok TNF-α također promiče upalu i potiče apoptozu nekih tumorskih stanica (TIZARD, 2000c.; CHRISTOPHER i sur., 2012.; DAY i SCHULTZ, 2013d.).

Sustav komplementa se sastoji od tridesetak proteina plazme koji nakon aktivacije djeluju proteolitički u kaskadnom sustavu koji završava tvorbom pora u staničnoj membrani i lizom mikroorganizama ili stanice domaćina. Proteine sustava komplementa tvore različite stanice, posebice stanice jetre i makrofagi. Sustav komplementa mogu aktivirati protutijela vezana za virus ili inficiranu stanicu (klasični put aktivacije), što za posljedicu ima lizu virusa ili inficiranih stanica. Sustav komplementa mogu aktivirati i virusi izravno (alternativni put aktivacije), pri čemu dolazi do lize virusa (TIZARD, 2000a.; DAY i SCHULTZ, 2013c.). Aktivirani sustav komplementa omogućuje i uklanjanje patogena fagocitozom budući da sustav kmplementa putem opsonizacije olakšava interakciju fagocita i patogena (DAY i SCHULTZ, 2013c.).

2.2.2. Mehanizmi stečene imunosti

Komponente stečene imunosti koje životinje štite od virusnih infekcija uključuju T i B limfocite te protutijela (TIZARD, 2000a.).

Limfociti T su stanice koje potječu od limfoidne loze stanica koštane srži. Sazrijevaju u timusu i nakon toga cirkuliraju između krvi i sekundarnih limfatičnih organa, kao što su limfni čvorovi, slezena i Peyerove ploče. Kao i u ostalih vrsta, limfociti svinja mogu ući u limfne čvorove limfom iz tkiva ili iz krvi kroz kapilare. No za razliku od ostalih vrsta domaćih sisavaca, limfociti svinja ne napuštaju limfne čvorove limfom, već putem krvi, zbog drugačije građe limfnih čvorova, kod kojih je srž mala, a korteks i parakorteks veći i dosežu središnji dio limfnog čvora (ROTHKÖTTER, 2009.). Limfociti T prepoznaju peptidne antigene pomoću receptora T limfocita (engl. *T-Cell Receptor*, TCR). Receptor TCR se sastoji od proteinskih lanaca čiji slobodni krajevi omogućuju prepoznavanje specifičnih antigena dok su suprotni krajevi ugrađeni u staničnu membranu T limfocita. Receptor TCR je okružen molekulama, kao što su lanci δ, ε, γ i ζ, koje omogućuju prijenos signala nakon kontakta s antigenom (DAY i SCHULTZ, 2013c.).

Za početak specifičnog imunosnog odgovara neophodna je aktivacija pomoćničkih T limfocita. Ako pomoćnički T limfociti prethodno nisu bili u kontaktu s antigenom, mogu se aktivirati samo nakon kontakta s antigenom prikazanim u sklopu MHC II na APC. Za aktivaciju pomoćničkih leukocita potrebni su još citokini koje sintetiziraju APC i kontakt s kostimulatornim molekulama na njihovoj površini. Aktivirani pomoćnički T limfociti, ovisno o vrsti antigena, sintetiziraju odgovarajuće citokine i usmjeravaju imunosni odgovor na stanični ili humoralni. Stoga se mogu podijeliti na dvije glavne populacije, odnosno Th1-limfocite (engl. *Helper 1 T-cells*) i Th2-limfocite (engl. *Helper 2 T-cells*). Limfociti Th1 sintetiziraju citokine IL-2 i IFN-γ koji primarno potiču razvoj staničnog imunosnog odgovora, dok Th2-limfociti sintetiziraju citokine IL-4 i IL-13 koji primarno potiču humoralni imunosni odgovor (CHRISTOPHER i sur., 2012.; DAY i SCHULTZ, 2013d.). Međutim, MURTAUGH i sur. (2009.) su pokazali da IL-4 u svinja nema pozitivan učinak na aktivaciju B limfocita i tvorbu protutijela, kao što je slučaj kod ljudi i miševa. Prema izvršnim funkcijama i proizvodnji citokina pomoćnički T limfociti se mogu dodatno opisati kao regulacijski T limfociti (Treg) koji sintetiziraju IL-10 i TGF-β i mogu regulirati funkcije pomoćničkih i citotoksičnih T limfocita (KÄSER i sur., 2011.) te Th17 T limfociti koji sintetiziraju IL-17 (STEPANOVA i sur., 2012.). Limfociti Th17 bi mogli nadopunjavati funkciju Th1-limfocita kod upale, autoimunih i tumorskih bolesti (DAY i SCHULTZ, 2013d.), ali njihova funkcija u svinja još uvijek nije detaljnije istražena (GERNER i sur., 2015.).

Citotoksični T limfociti su vrlo važna komponenta stanične imunosti protiv unutarstaničnih mikroorganizama, posebice virusa, ali i tumorskih stanica. Kao i u slučaju pomoćničkih T limfocita, citotoksični T limfociti koji nikada nisu bili u kontaktu s antigenom, moraju se prvo aktivirati kako bi mogli izvršiti svoju funkciju. Za aktivaciju citotoksičnih T limfocita potreban je kontakt s antigenom prikazanim u sklopu MHC I na APC i kontakt s kostimulatornim molekulama na njihovoj površini te citokini koje sintetiziraju Th1-limfociti, posebice IL-2 i IFN-γ. Nakon aktivacije, citotoksični T limfociti mogu prepoznati stanice inficirane unutarstaničnim mikroorganizmima ako su antigeni tih mikroorganizma prikazani na površini inficiranih stanica u sklopu MHC I, kao i promijenjene peptide tumorskih stanica. Citotoksični T limfociti sintetiziraju perforin i granzime. Perforin nakon polimerizacije u membrani ciljnih stanica stvaraju kanale koji uzrokuju osmotsku neravnotežu i omogućuju ulazak enzima granzima koji izravno oštećuje ciljnu stanicu i aktiviraju unutarstanične mehanizme apoptoze. Na taj način citotoksični T limfociti sprječavaju umnažanje mikroorganizama unutar stanica ili njihovo daljnje širenje. Citotoksični T limfociti također sintetiziraju citokine (IFN-γ i TNF-α) kojima aktiviraju makrofage i NK stanice

(CHRISTOPHER i sur., 2012.; DAY i SCHULTZ, 2013d.). U svinja je poznata i posebna skupina T limfocita koji pokazuju funkciju urođenog imunosnog sustava, odnosno γδT limfociti (TAKAMATSU i sur., 2002.; DE BRUIN i sur., 2000a.).

Limfociti B su stanice koje, kao i T limfociti, potječu od limfoidne loze stanica koštane srži, ali za razliku od njih sazrijevaju u sekundarnim limfatičnim organima, kao što su koštana srž, limfni čvorovi, slezena i Peyerove ploče. Limfociti B specifično prepoznaju antigene pomoću receptora B limfocita (engl. *B-Cell Receptor*, BCR). Ako B limfociti prethodno nisu bili u kontaktu s antigenom također se moraju prvo aktivirati, ali za razliku od T limfocita, B limfociti mogu na antigen reagirati izravno, bez da im je prethodno prikazan u sklopu MHC. Za potpunu aktivaciju B limfocita potrebni su signali od strane pomoćničkih T limfocita u obliku izlučenih citokina i kontakta s kostimulatornim molekulama na njihovoj površini. Prije aktivacije, BCR u svinja pretežno ima strukturu imunoglobulina razreda M (IgM). Tijekom aktivacije B limfocita specifičnost BCR za antigen ostaje ista, ali se mijenja njegova struktura, odnosno prelazi iz IgM u IgG (IgG1 i IgG2), IgA, IgE ili IgD. Promjena razreda imunoglobulina na površini B limfocita ovisi o svojstvima antigena i vrsti citokina koje sintetiziraju pomoćnički T limfociti. Aktivirani B limfociti pod utjecajem citokina Th2-limfocita prelaze u plazma stanice koje tvore protutijela, odnosno slobodne imunoglobuline iste strukture i specifičnosti za antigen kao BCR (CHRISTOPHER i sur., 2012; DAY i SCHULTZ, 2013e.). Na tvorbu pojedinih vrsta protutijela utječe i mjesto početka imunosnog odgovora. Ako imunosni odgovor započne u limfnim čvorovima ili slezeni, B limfociti su obično preusmjereni na tvorbu protutijela razreda IgG, kojih ima najviše u perifernoj krvi svinja. S druge strane, ako imunosni odgovor započne na sluznicama, B limfociti su obično preusmjereni na tvorbu protutijela razreda IgA i/ili IgE (CHRISTOPHER i sur., 2012.). Osim strukture, protutijela imaju i različite funkcije u zaštiti od virusnih infekcija. Protutijela neutraliziraju i aglutiniraju viruse čime sprječavaju vezanje virusa na stanicu domaćina i smanjuju broj virusa koji mogu inficirati stanice domaćina. Protutijela također posreduju u fagocitozi i lizi virusa te lizi stanica inficrianih virusom, odnosno olakšavaju njihovo ubijanje komponentama urođenog imunosnog sustava, tj. sustavom komplementa, fagocitima ili NK stanicama (TIZARD, 2000a.). Protutijela su komponente humoralne stečene imunosti s obzirom da se u pravilu nalaze u krvi i tjelesnim tekućinama. Limfociti B mogu djelovati i kao APC jer nakon kontakta s antigenom mogu antigen unijeti u stanicu i prikazati ga u sklopu MHC II (CHRISTOPHER i sur., 2012.).

Limfociti T i B koji prethodno nisu bili u kontaktu s antigenima, mogu se aktivirati samo na mjestima na kojima je antigen zarobljen i prikazan (pomoćnički T limfociti i

citotoksični T limfociti), odnosno na kojima su pomoćnički T limfociti aktivirani (citotoksični T limfociti i B limfociti), a to su najčešće limfni čvorovi, ali i drugi sekundarni limfatični organi. Prilikom aktivacije T i B limfociti prelaze u limfoblaste i zatim proliferiraju, pri čemu dolazi do povećanja broja identičnih stanica, specifičnih za isti antigen kao i T ili B limfocit iz kojeg su nastali (klonovi). Citotoksični T limfociti nakon proliferacije većinom postaju izvršni T limfociti koji cirkuliraju po organizmu u potrazi za stranim antigenima, jer moraju doći u izravni kontakt s antigenom kako bi mogli izvršiti svoju funkciju. Proliferirani B limfociti ostaju u sekundarnim limfatičnim organima (limfni čvorovi, slezena) gdje tvore zametna središta. U zametnim središtima većina B limfocita prelazi u plazma stanice koje tvore protutijela. Protutijela se, ovisno o razredu i funkciji, raspoređuju po različitim dijelovima organizma (krv, sluznice) kako bi što lakše došla u kontakt sa stranim antigenima. Od manjeg dijela proliferiranih T i B limfocita nastaju memorijske stanice, koje se nakon ponovnog kontakta s istim antigenom mogu brže aktivirati i djelovati. Međutim, memorijski T i B limfociti u životinja još uvijek nisu dovoljno istraženi (CHRISTOPHER i sur., 2012.; DAY i SCHULTZ, 2013d.; 2013e.).

Dosadašnja istraživanja su pokazala da SHV-1 u svinja nakon cijepljenja/infekcije može potaknuti komponente urođene i stečene imunosti, što je rezultiralo proizvodnjom protutijela koja *in vitro* mogu neutralizirati virus, sudjelovati u ADCC i lizi stanica inficiranih virusom pomoću sustava komplementa (MARTIN i sur., 1986.). Ujedno nakon specifične restimulacije izdvojenih PBMC-a (engl. *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) detektirana je proliferacija citotoksičnih T limfocita koji prepoznaju antigen prikazan u sklopu MHC I i pomoćničkih T limfocita (SUMMERFIELD i sur.,1996.; ZUCKERMANN i HUSMANN, 1996.; DE BRUIN i sur., 2000a.), kao i proliferacija citotoksičnih stanica neovisnih o MHC (KIMMAN i sur., 1996.; DE BRUIN i sur., 2000a.; 2000b.) te sinteza citokina (OBER i sur., 1998.; VAN ROOIJ i sur., 2004.; POMORSKA-MÓL i MARKOWSKA-DANIEL, 2010.).

Istraživanja su također pokazala da protutijela koja neutraliziraju virus mogu svinje zaštiti od uginuća uzrokovanog infekcijom sa SHV-1 (MARTIN i WARDLEY, 1987.), ali da je rano smanjenje kliničkih znakova i izlučivanje virusa nakon infekcije sa SHV-1 povezano s *in vitro* proliferacijom T limfocita i njihovim nakupljanjem na mjestu infekcije (KIMMAN i sur., 1995.; BOUMA i sur., 1997.; VAN ROOIJ i sur., 2004.).

2.3. Fenotip T limfocita svinja

Praćenje specifičnog odgovora T limfocita na antigene zahtjeva detaljno poznavanje fenotipa subpopulacija T limfocita. Diferencijacijski antigeni leukocita (engl. C*luster of Differntation*, CD) u svinja označavaju se sa CD ako su njihove molekule homologne molekulama diferencijacijskih antigena leukocita u ljudi, s obzirom na redoslijed aminokiselina ili DNK. Ako molekule antigena leukocita svinja nisu homologne s drugim vrstama, označavaju se sa SWC (engl. *Swine Workshop Cluster*), (LUNNEY, 1993.; SAALMÜLLER, 1996.). Razvoj monoklonskih protutijela za diferencijacijske antigene leukocita svinja omogućio je identifikaciju fenotipa pojedinih populacija i subpopulacija T limfocita (imunofenotip), ali i istraživanje njihovih funkcija, posebice u razvoju učinkovitijih cjepiva (GERNER i sur., 2009.).

Molekula CD3 s TCR tvori proteinski kompleks na membrani T limfocita i omogućuje prijenos signala nakon vezanja TCR s antigenom i aktivaciju T limfocita (YANG i sur., 2005.) U svinja se, kao i u ostalih kralješnjaka, razlikuju dvije populacije T limfocita s obzirom na peptidne lance koji tvore TCR. To su T limfociti čiji se TCR sastoji od lanaca α i β (αβT limfociti) i T limfociti čiji se TCR sastoji od lanaca γ i δ (γδT limfociti), (ŠINKORA i BUTLER, 2009.; GERNER i sur., 2015.). Budući da monoklonska protutijela za lance α i β T limfocita svinja nisu dostupna, kao za lanac δ (DAVIS i sur., 1998.; TANG i sur., 2005.), αβT limfociti svinja mogu se fenotipski definirati kao $CD3^{+}TCR\text{-}\gamma\delta^{-}$ limfociti, za razliku od γδT limfocita koji se mogu izravno identificirati kao $CD3^{+}TCR\text{-}\gamma\delta^{+}$ limfociti (GERNER i sur., 2009.). GERNER i sur. (2009.) su pokazali da se αβT limfociti periferne krvi svinja s obzirom na ekspresiju molekula CD4 i CD8α fenotipski mogu definirati kao $CD4^{+}CD8\alpha^{+}$, $CD4^{-}CD8\alpha^{+}$, $CD4^{+}CD8\alpha^{-}$ ili $CD4^{-}CD8\alpha^{-}$ stanice. Molekula CD4 je receptor za MHC II, a molekula CD8 receptor za MHC I. Stoga je molekula CD4 pomoćničkim T limfocitima važna za prepoznavanje procesuiranih antigena prikazanih u sklopu MHC II, dok je molekula CD8 važna citotoksičnim T limfocitima za prepoznavanje endogenih antigena prikazanih u sklopu MHC I (TIZARD, 2000b.). Dosadašnja istraživanja su pokazala da je udio T limfocita koji eksprimiraju CD4 u limfocitima periferne krvi svinja između 5% i 60 %, s različitim udjelima subpopulacija koje eksprimiraju, odnosno ne eksprimiraju molekulu CD8α, ovisno o dobi (SAALMÜLLER i sur., 1987.; YANG i PARKHOUSE, 1996.; ZUCKERMANN i HUSMANN, 1996.; STEPANOVA i sur., 2007.). Slično kao i u majmuna i kokoši (ZUCKERMANN, 1999.), specifičnost limfocita periferne krvi svinja je značajan udio T limfocita koji istovremeno eksprimiraju molekule CD4 i CD8α (do 55%), (ZUCKERMANN,

1999.). U perifernoj krvi tek oprasene prasadi $CD4^+CD8\alpha^+$ T limfocita gotovo i nema, ali im se udio kontinuirano povećava do odrasle dobi (ZUCKERMANN i HUSMANN, 1996.; TALKER i sur., 2013.).

Limfociti γδT periferne krvi svinja su do sada najčešće identificirani na temelju ekspresije molekula CD2 i CD8α te se mogu razvrstati u tri subpopulacije: $CD2^+CD8\alpha^+$, $CD2^+CD8\alpha^-$ i $CD2^-CD8\alpha^-$ (YANG i PARKHOUSE, 1996.; ŠINKORA i BUTLER, 2009.). Najčešći fenotip γδT limfocita u perifernoj krvi svinja je $CD2^-CD8\alpha^-$. Molekula CD2, poznata i kao LFA-2 (engl. *Lymphocyte Function-associated Antigen* 2), je transmembranski glikoprotein tipa I čiji ligand je molekula CD58 (LFA-3). Interakcija molekule CD2 na T limfocitima i molekule 58 na APC pojačava prepoznavanje antigena, a poznato je i da se molekula CD2 veže za molekulu 58 prilikom interakcije citotoksičnih T limfocita i ciljnih stanica (TIZARD, 2000b.). Svinje, kao i ostali papkari, pripadaju vrstama s velikim udjelom populacije γδT limfocita u limfocitima periferne krvi (HOLDERNESS i sur., 2013.). Prema većini autora, udio populacije γδT limfocita u limfocitima periferne krvi svinja povećava se nakon prasenja te između četvrtog i dvanaestog mjeseca života doseže najveće vrijednosti (do 50%), a nakon toga opada (YANG i PARKHOUSE, 1996., TAKAMATSU i sur., 2006.; GERNER i sur., 2009.; TALKER i sur., 2013.; SEDLAK i sur., 2014a.).

U nastojanju da se odrede biljezi za pomoćničke T limfocite svinja dosadašnja istraživanja ukazuju da se oni mogu identificirati kao $CD4^+$ stanice unutar populacije αβT limfocita (CHARERNTANTANAKUL i ROTH, 2006.; GERNER i sur., 2009.). Otežavajuću okolnost u fenotipskoj analizi pomoćničkih T limfocita predstavlja koekspresija molekule CD8. To je posebno izraženo nakon specifične, odnosno nespecifične *in vitro* stimulacije jer većina $CD4^+CD8\alpha^-$ T limfocita eksprimira molekulu CD8α *de novo*, ali ne i svi $CD4^+CD8\alpha^-$ T limfociti (FACHINGER i sur., 2000a.; SAALMÜLLER i sur., 2002.; REUTNER i sur., 2013.). Slično, imunizacija te *in vitro* specifična restimulacija potiče uglavnom proliferaciju $CD4^+CD8\alpha^+$ T limfocita (SUMMERFIELD i sur., 1996.; OBER i sur., 1998.; SAALMÜLLER i sur., 2002.; REVILLA i sur., 2005a.). SUMMERFIELD i sur., (1996.), OBER i sur. (1998.) te SAALMÜLLER i sur. (2002.) također su potvrdili funkciju pomoćničkih T limfocita za $CD4^+CD8\alpha^+$ T limfocite jer je ta subpopulacija mogla prepoznati antigen prikazan isključivo prikazan u sklopu MHC II, zahvaljujući molekuli CD4, te sintetizirati IL-2 i pružiti pomoć B limfocitima u proizvodnji protutijela (OBER i sur., 1998.). Ranija istraživanja su također pokazala da $CD4^+CD8^+$ T limfociti eksprimiraju samo lanac α molekule CD8, odnosno CD8α homodimer (CD8αα), (SAALMÜLLER i sur., 1994d.; 2002.; YANG i PARKHOUSE, 1997.). Sustav molekula MHC u svinja se još naziva SLA (engl.

Swine Leucocyte Antigen) pri čemu SLA I odgovara sustavu molekula MHC I, a SLA II odgovara sustavu molekula MHC II. Poznato je osam formi SLA II, a molekula SLA-DR je jedna od njih (HO i sur., 2009.; LUNNEY i sur., 2009.). Iako je primarna zadaća molekula SLA II prezentacija peptidnih antigena pomoćničkim T limfocitima, ekspresija molekule SLA-DR na stimuliranim T limfocitima može poslužiti i za identifikaciju aktiviranih pomoćničkih T limfocita. S ciljem dodatne identifikacije subpopulacije pomoćničkih T limfocita, SAALMÜLLER i sur. (2002.) su osim ekspresije molekule CD8α na aktiviranim $CD4^+$ T limfocitima, pokazali i povećanu ekspresiju molekule SLA-DR nakon nespecifične *in vitro* stimulacije. Nakon imunizacije i specifične *in vtiro* restimulacije preferencijalno su proliferirali $CD4^+CD8\alpha^+$ T limfociti koji su eksprimirali i molekulu SLA-DR (SAALMÜLLER i sur., 2002.; REVILLA i sur., 2005a.; GERNER i sur., 2006.). U navedenim istraživanjima koekspresija molekula CD8α i SLA-DR na $CD4^+$ T limfocitima bila je praćena i gubitkom ekspresije molekule CD45RC (SAALMÜLLER i sur., 2002.), odnosno proliferirali su $CD4^+CD8\alpha^+$SLA-DR^+ T limfociti koji nisu eksprimirali molekulu CD45RC (SAALMÜLLER i sur., 2002.; REVILLA i sur., 2005a.). Stoga većina autora smatra da su aktivirani i memorijski pomoćnički T limfociti svinja αβT limfociti s fenotipom $CD4^+CD8\alpha^+$SLA $II^+CD45RC^-$, a neaktivirani pomoćnički T limfociti αβT limfociti s fenotipom $CD4^+CD8\alpha^-$SLA $II^-CD45RC^+$. *In vivo* istraživanja su pokazala da većina $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita periferne krvi svinja eksprimira molekulu SLA-DR, odnosno ne eksprimira molekulu CD45RC (REUTNER i sur., 2013.; TALKER i sur., 2013.). Potonji autori su također pokazali da se broj $CD4^+CD8\alpha^+$SLA-DR^+ αβT limfocita u perifernoj krvi svinja nakon prasenja povećava s dobi, što je u skladu s rezultatima navedenih *in vitro* istraživanja za fenotip memorijskih pomoćničkih T limfocita. Međutim, istraživanja REUTNER i sur. (2013.) te TALKER i sur. (2013.) su pokazala i da izostanak ekspresije molekule CD45RC na $CD4^+CD8\alpha^+$SLA-DR^+ T limfocitima ne ukazuje nužno na aktivirane ili memorijske pomoćničke T limfocite jer $CD4^+CD8\alpha^+$SLA-$DR^+CD45RC^+$ T limfociti također mogu biti prisutni u perifernoj krvi svinja. Također suprotno nalazima ranijih istraživanja, neki autori ukazuju da bi memorijski pomoćnički T limfociti mogli pripadati i $CD4^+$ αβT limfocitima koji ne eksprimiraju molekulu CD8α (ZUCKERMANN i HUSMANN, 1996.; REVILLA i sur., 2005a.), odnosno molekulu SLA-DR (REVILLA i sur., 2005a.), jer su te subpopulacije T limfocita također proliferirale nakon *in vitro* stimulacije s istim antigenom s kojim su svinje cijepljene. U svrhu identifikacije dodatnih subpopulacija pomoćničkih $CD4^+$ αβT limfocita svinja analizirana je ekspresija i drugih leukocitnih antigena za koja su dostupna monoklonska protutijela i/ili sinteza citokina. ZUCKERMANN i HUSMANN

(1996.) su utvrdili da većina (75%) $CD4^+CD8\alpha^+$ T limfocita periferne krvi svinja ima veliku gustoću ekspresije (engl. *High* ili *Bright*) molekule CD29, u ljudi poznata i kao integrin β-1, dok većina (75%) $CD4^+CD8\alpha^-$ T limfocita ima malu gustoću ekspresije (engl. L*ow* ili *Dim*) molekule CD29. Međutim, nakon imunizacije svinja i specifične *in vitro* restimulacije proliferirale su obje subpopulacije $CD4^+$ T limfocita s obzirom na ekspresiju molekule CD8α ($CD4^+CD8\alpha^+$ i $CD4^+CD8\alpha^-$), ali samo je jedna subpopulacija $CD4^+$ T limfocita proliferirala s obzirom na ekspresiju molekule CD29 ($CD4^+CD29^{+high}$). REVILLA i sur. (2005a.) su također utvrdili veliku gustoću ekspresije molekule CD29 na subpopulaciji kojoj prema većini autora pripadaju aktivirani i memorijski pomoćnički T limfociti svinja ($CD4^+CD8\alpha^+CD45RA^-SLA\text{-}DR^+$), odnosno malu gustoću ekspresije molekule CD29 na subpopulaciji kojoj prema većini autora pripadaju neaktivirani pomoćnički T limfociti ($CD4^+CD8\alpha^-CD45RA^+SLA\text{-}DR^-$). Međutim, isti autori su otkrili da $CD4^+$ T limfociti periferne krvi svinja mogu eksprimirati i molekulu 2E3, za razliku od drugih T limfocita, stanica mijeloidne loze, B limfocita i NK stanica. Većina $CD4^+2E3^+$ T limfocita imala je fenotip $CD8\alpha^-CD45RA^+SLA\text{-}DR^-CD29^{+low}$, dok je većina $CD4^+2E3^-$ T limfocita imala fenotip $CD8\alpha^+CD45RA^-SLA\text{-}DR^+CD29^{+high}$. S obzirom da su nakon imunizacije svinja i specifične *in vitro* restimulacije proliferirali samo $CD4^+2E3^-$ T limfociti, autori su na temelju ekspresije molekule 2E3 predložili dodatnu mogućnost diskriminacije neaktiviranih ($CD4^+2E3^+$) i memorijskih ($CD4^+2E3^-$) pomoćničkih T limfocita. REUTNER i sur. (2013.) su također pokušali identificirati dodatne subpopulacije pomoćničkih T limfocita ($CD3^+CD4^+$) svinja, ali s obzirom na ekspresiju molekule CD27, sintezu citokina (IL-2, IFN-γ i TNF-α) te ekspresiju kemokinskog receptora CCR7, koji je karakterističan za neaktivirane i središnje memorijske pomoćničke T limfocite ljudi (SALLUSTO i sur., 2004.). U perifernoj krvi svinja REUTNER i sur. (2013.) su identificirali tri najčešće subpopulacije pomoćničkih T limfocita s obzirom na ekspresiju molekula CD8α i CD27 ($CD8\alpha^-CD27^+$, $CD8\alpha^+CD27^+$ i $CD8\alpha^+CD27^-$). Nakon nespecifične *in vitro* stimulacije i analize ekspresije CCR7 te sinteze navedenih citokina autori su zaključili da subpopulaciji $CD3^+CD4^+CD8\alpha^-CD27^+$ pripadaju neaktivirani pomoćnički T limfociti, a da subpopulacije $CD3^+CD4^+CD8\alpha^+CD27^-$ i $CD3^+CD4^+CD8\alpha^+CD27^+$ pokazuju slična fenotipska i funkcionalna obilježja kao izvršni memorijski, odnosno središnji memorijski pomoćnički T limfociti ljudi (SALLUSTO i sur., 2004.; PEPPER i JENKINS, 2011.).

Također su provedena istraživanja sa svrhom identifikacije Th1- i Th2-limfocita svinja. Međutim, nisu utvrđene razlike u sintezi IFN-γ, odnosno citokina Th1-limfocita, između subpopulacije $CD4^+CD8\alpha^+$ T limfocita koja eksprimira molekulu CD27 i subpopulacije $CD4^+CD8\alpha^+$ T limfocita koja ne eksprimira navedenu molekulu (KOINIG i

sur., 2015.; TALKER i sur., 2015.). REVILLA i sur. (2004.) su također utvrdili da subpopulacija periferne krvi svinja koja pokazuje funkcionalna obilježja memorijskih pomoćničkih stanica ($CD4^+CD23E^-CD8\alpha^+$) eksprimira mRNA (engl. *Messenger RNA*) za IFN-γ, ali i mRNA za IL-4, odnosno citokin Th2-limfocita. Ni REVILLA i sur. (2005b.) nisu utvrdili razlike na istoj subpopulaciji T limfocita svinja s obzirom na ekspresiju mRNA za CXCR3, odnosno kemokinski receptor Th1-limfocita ljudi, te mRNA za CCR4, odnosno kemokinski receptor Th2-limfocita ljudi (MOSER i sur., 2004.). Stoga u navedenim istraživanjima nije bilo moguće razlikovati fenotip Th1- i Th2-limfocita svinja.

Molekule CD4 i CD8 također su analizirane i s ciljem identifikacije citotoksičnih T limfocita svinja. Nakon cijepljenja svinja specifičnu *in vitro* citotoksičnost prema inficiranim stanicama pokazali su limfociti koji ne eksprimiraju molekulu CD4 i eksprimiraju veliku gustoću molekule CD8 ($CD8^{+high}$), (PAULY i sur., 1996.; DE BRUIN i sur., 2000a.). U istraživanjima obje skupine autora citotoksični T limfociti su eksprimirali i molekulu CD6, odnosno molekulu koju eksprimira većina αβ T limfocita svinja (SAALMÜLLER i sur., 1994c). DE BRUIN i sur. (2000a.) su potvrdili da $CD4^-CD6^+CD8^{+high}$ citotoksični T limfociti svinja pripadaju populaciji αβ T limfocita (TCR-$\gamma\delta^-$) te da prepoznaju antigen prikazan u sklopu SLA I. PAULY i sur. (1996.) su također utvrdili da se $CD4^-CD6^+CD8^{+high}$ citotoksični T limfociti fenotipski razlikuju od stanica koje pokazuju spontanu citotoksičnost, odnosno NK stanica ($CD4^-CD6^-CD8^+$), γδ-T limfocita ($CD4^-CD8\alpha^-CD6^-$) i stanica s fenotipom $CD4^-CD6^-CD8^{+low}$.

U svrhu dodatne identifikacije citotoksičnih T limfocita svinja provedena su istraživanja u kojima je analizirana ekspresija lanaca α i β molekule CD8 na TCR-$\gamma\delta^-CD4^-CD8^{+high}$ T limfocitima (YANG i PARKHOUSE, 1997.) i $CD4^-CD6^+CD8^+$ T limfocitima (DENYER i sur., 2006.), koji su *in vitro* pokazali specifičnu citotoksičnost. U oba istraživanja citotoksični T limfociti su eksprimirali α i β lanac molekule CD8. Međutim, DENYER i sur. (2006.) su identificirali i citotoksične T limfocite koji eksprimiraju samo lanac α molekule CD8 te su utvrdili da je udio te subpopulacije veći od subpopulacije koja eksprimira oba lanca molekule CD8. U istraživanju DENYER i sur. (2006.) obje subpopulacije citotoksičnih T limfocita ($CD8\alpha^+8\beta^-$ i $CD8\alpha^+8\beta^+$) također su eksprimirale i perforin. TALKER i sur. (2013.) su pokazali da većina $CD3^+CD8\alpha^+8\beta^+$ limfocita periferne krvi prasadi tijekom prva tri tjedna života eksprimira molekulu CD27 i ne eksprimira perforin, ali i nagli porast udjela $CD3^+CD8\alpha^+8\beta^+CD27^-perforin^+$ limfocita u sljedećim tjednima. Međutim, malo se zna o fenotipu aktiviranih i memorijskih citotoksičnih T limfocita koji prepoznaju antigen prikazan u sklopu SLA I (GERNER i sur., 2015.). Utvrđeno je da stanice s fenotipom citotoksičnih T

limfocita koji prepoznaju antigen prikazan u sklopu SLA I mogu eksprimirati i molekulu SLA-DR, kao i stanice s fenotipom pomoćničkih T limfocita (GERNER i sur., 2009.; TALKER i sur., 2013.) te da se udio SLA-DR^+ citotoksičnih T limfocita povećava s dobi (TALKER i sur., 2013.). Međutim, značaj ekspresije molekule SLA-DR za funkciju citotoksičnih T limfocita nije jasan, kao niti za funkciju aktiviranih i memorijskih pomoćničkih T limfocita (GERNER i sur., 2015.).

Neka istraživanja ukazuju i na citotoksičnu funkciju subpopulacije T limfocita svinja za koju je većinom dokazana funkcija pomoćničkih T limfocita ($CD4^+CD8^+$). DE BRUIN i sur. (2000b.) i DENYER i sur. (2006.) su pokazali da $CD4^+CD8^+$ T limfociti periferne krvi *in vitro* liziraju stanice inficirane s istim virusom s kojim su svinje cijepljene, ali s određenim razlikama u fenotipskim i funkcionalnim obilježjima. U istraživanju DE BRUIN i sur. (2000b.) citotoksični $CD4^+CD8^+$ T limfociti su imali malu gustoću ekspresije molekule CD8 ($CD8^{dull}$) i bili su usmjereni na antigen prikazan u sklopu SLA II inficiranih stanica. U istraživanju DENYER i sur. (2006.) citotoksični $CD4^+CD8^+$ T limfociti su eksprimirali α i β lanac molekule CD8 te su autori pretpostavili da nisu usmjereni na antigen prikazan u sklopu SLA II inficiranih stanica. Iako su dosadašnja istraživanja pokazala veliku fenotipsku raznolikost citotoksičnih T limfocita svinja koji prepoznaju antigen prikazan u sklopu SLA I (klasični citotoksični T limfociti), većina ih je potvrdila da se klasični citotoksični T limfociti fenotipski mogu opisati kao $CD4^-CD8\alpha^{+bright}$ αβT limfociti (GERNER i sur., 2015.).

LEE i sur. (2004.) su nakon cijepljenja svinja i specifične *in vitro* restimulacije utvrdili značajno veću proliferaciju γδT limfocita periferne krvi koji sintetiziraju IFN-γ, nego nakon *in vitro* stimulacije γδT limfocita neimuniziranih svinja. Iako navedeno istraživanje ukazuje na prisutnost dugoživućih memorijskih T limfocita u populaciji γδT limfocita svinja, γδT limfociti nisu analizirani s obzirom na ekspresiju dodatnih biljega, kao što su analizirani u drugim istraživanjima. U sličnom istraživanju (TAKAMATSU i sur., 2002.) autori su identificirali dvije subpopulacije γδT limfocita periferne krvi s obzirom na ekspresiju molekula CD2 i CD8 ($CD2^+CD8\alpha^+$ ili $CD2^-CD8\alpha^+$). Obje subpopulacije podrijetlom od cijepljenih svinja su nakon specifične *in vitro* restimulacije pokazale nekoliko funkcionalnih obilježja APC, odnosno unos stranog antigena u stanicu, ekspresiju SLA II i kostimulatornih molekula CD80 i CD86 te su potaknuli proliferaciju stanica s fenotipom pomoćničkih T limfocita ($CD4^+CD8\alpha^{+low}$). Istraživanja su također pokazala da γδT limfociti (TCR-$\gamma\delta^+$) iz periferne krvi svinja *in vitro* spontano liziraju inficirane i neinficirane stanice, slično NK stanicama, bez obzira da li su životinje prethodno cijepljene ili ne (YANG i PARKHOUSE, 1997.; DE BRUIN i sur., 1997.; 2000a.; OLIN i sur., 2005.). U većini navedenih istraživanja

citotoksični γδT limfociti su eksprimirali molekulu CD8 (YANG i PARKHOUSE, 1997.; DE BRUIN i sur., 1997.; 2000a.), a u istraživanju DE BRUIN i sur. (1997.) i molekulu CD2. Međutim, DE BRUIN i sur. (1997.; 2000a.) na citotoksičnim γδT limfocitima nisu utvrdili ekspresiju molekula koje mogu biti prisutne na površini αβT limfocita (CD4, CD5 i CD6), (SAALMÜLLER i sur., 1994a.; 1994b.; 1994c.; PAULY i sur., 1996.; GERNER i sur., 2009.). Za razliku od klasičnih citotoksičnih T limfocita i NK stanica, dosadašnja istraživanja nisu pokazala ekspresiju perforina na citotoksičnim γδT limfocitima svinja (DENYER i sur., 2006.; TAKAMATSU i sur., 2006.) pa mehanizam njihove citotoksičnosti nije poznat. ŠINKORA i sur. (2005.) su na temelju fenotipskog istraživanja γδT limfocita, izdvojenih iz timusa i slezene svinja, pretpostavili da su na periferiji prisutne dvije subpopulacije koje eksprimiraju molekule CD2 i CD8α, odnosno subpopulacija koja taj fenotip pokazuje već u timusu i subpopulacija koja ekspresiju molekule CD8α stječe nakon aktivacije. Također su pretpostavili da se subpopulacija koja je ekspresiju molekule CD8α stekla nakon aktivacije može razlikovati od subpopulacije $CD2^+CD8\alpha^+$ podrijetlom iz timusa po ekspresiji molekula SLA II. Međutim, ekspresija molekula SLA II nakon aktivacije ne mora nužno biti povezana s ekspresijom molekule CD8α jer i subpopulacije γδT limfocita s fenotipom $CD2^-CD8\alpha^-$ i $CD2^+CD8\alpha^-$ mogu nakon aktivacije eksprimirati molekule SLA II. Isti autori smatraju i da molekule CD8α i SLA II ostaju trajno eksprimirane na γδT limfocitima svinja. TALKER i sur. (2013.) su pokazali da do 83% $CD2^+$ γδT limfocita iz krvi svinja, već nakon prasenja eksprimira molekulu CD8α te da nakon drugog tjedna života samo $CD2^+CD8\alpha^+$ γδT limfociti eksprimiraju molekulu SLA-DR, ali bez porasta ekspresije molekule SLA-DR tijekom vremena.

2.4. Fenotip NK stanica svinja

Linijska kultura stanica eritroleukemije ljudi (K562) pokazala se prikladnom za ispitivanje funkcije NK stanica svinja (KOREN i sur., 1978.; KIM i sur., 1980.). Prema dosadašnjim istraživanjima spontanu *in vitro* citotoksičnost prema linijskoj kulturi stanica K562, odnosno funkciju NK stanica, pokazale su PBMC svinja koje ne pripadaju T limfocitima ($CD3^-$) i koje eksprimiraju molekule CD2 i CD8 (DE BRUIN i sur., 1997.; DENYER i sur., 2006.; TOKA i sur., 2009.; MAIR i sur., 2012.), molekulu CD16 i perforin (DENYER i sur., 2006.; MAIR i sur., 2012.) te molekulu CD11b (DENYER i sur., 2006.). Molekula CD16 (FcγRIII) je jedan od receptora za lanac Fc protutijela razreda IgG. Receptore Fcγ eksprimiraju različite stanice, kao što su polimorfonuklearne stanice, makrofagi i NK

stanice i omogućuju imunosne mehanizme u kojima zajedno sudjeluju protutijela i stanice, uključujući fagocitozu i ADCC (KACSKOVICS, 2004.; NIMMERJAHN i RAVETCH, 2006.). DE BRUIN i sur. (1997.) te DENYER i sur. (2006.) su također pokazali da NK stanice ne eksprimiraju molekule CD4 i CD5, kao ni molekulu CD6 (DENYER i sur., 2006.). Istraživanja su pokazala da NK stanice eksprimiraju lanac α (DENYER i sur., 2006.; MAIR i sur., 2012.) i ne eksprimiraju lanac β molekule CD8 (DENYER i sur., 2006.). U istraživanju DE BRUIN i sur. (2000a.) NK stanice s fenotipom $CD3^{-}TCR\text{-}\gamma\delta^{-}CD4^{-}CD6^{-}CD8^{+dull}$, izdvojene iz krvi necijepljenih svinja i svinja cijepljenih/inficiranih sa SHV-1, su osim linijske kulture stanica K562 *in vitro* lizirale i stanice svinja inficirane i neinficirane sa SHV-1.

U ljudi i drugih sisavaca NKp46 (CD335) pripada skupini receptora prirodno citotoksičnih stanica kojeg eksprimiraju mirujuće i aktivirane NK stanice (SIVORI i sur.; 1997.; BIASSONI i sur., 1999.; DE MARIA i sur., 2001.; WESTGAARD i sur., 2004.; STORSET i sur., 2004.; CONNELLEY i sur., 2011.). MAIR i sur. (2012.) su ispitali ekspresiju receptora NKp46 na NK stanicama svinja korištenjem monoklonskog protutijela specifičnog za navedeni receptor u te vrste životinja. Rezultati su pokazali da je ekspresija receptora NKp46 na NK stanicama ($CD2^{+}CD3^{-}C8\alpha^{+}CD16^{+}perforin^{+}$) iz krvi svinja u dobi od 6 do 7 mjeseci različita (između 15% i gotovo 100%, ali u većine svinja oko 50%), da citotoksičnost prema linijskoj kulturi stanica K562 i linijskim kulturama stanica svinja pokazuju $NKp46^{+}$ i $NKp46^{-}$ NK stanice te da receptor NKp46 eksprimira i manja subpopulacija T limfocita ($CD3^{+}$). Stoga se receptor NKp46 nije pokazao kao specifični biljeg NK stanica svinja. Istraživanja u kojima su PBMC svinja s funkcijom NK stanica *in vitro* stimulirani citokinima (IL-2, IL-12 i IL-18) pokazala su povećanu citotoksičnost prema stanicama svinja inficiranim virusom (TOKA i sur., 2009.) i sintezu IFN-γ (PINTARIČ i sur., 2008.; TOKA i sur., 2009.) te da IFN-γ sintetiziraju samo NK stanice koje eksprimiraju receptor NKp46 (MAIR i sur., 2012.). U dosadašnjim istraživanjima NK stanice koje eksprimiraju molekulu SLA-DR utvrđene su u perifernoj krvi svinja tek nakon tri mjeseca života (TALKER i sur., 2013.), odnosno u šestomjesečnih svinja (PINTARIČ i sur., 2008.). U oba istraživanja udio $SLA\text{-}DR^{+}$ NK stanica bio je mali.

2.5. Fenotip B limfocita svinja

U svinja jedinstveni biljeg stanične loze B limfocita nije poznat kao niti za NK stanice, ali su istraživanja pokazala da B limfociti svinja mogu eksprimirati više molekula kao što su CD2, CD25, CD21, IgM, SLA-DR, CD45RC, CD5 (ŠINKORA i sur., 1998.; 2003.;

WILSON i WILKIE, 2007.) i molekule koje reagiraju s monoklonskim protutijelima za molekule CD79α, CD20 i CD86 ljudi (JONES i sur., 1993.; FALDYNA i sur., 2007.), te da se ekspresija tih molekula razlikuje tijekom fetalnog i postnatalnog života svinja, kao i tijekom sazrijevanja i diferencijacije B limfocita. Općenito se smatra da neaktivirani B limfociti eksprimiraju molekule IgM, CD2 i CD21 te da nakon aktivacije, odnosno kontakta sa stranim antigenom nepovratno gube ekspresiju molekule CD21. Molekula CD21 s molekulama CD19 i CD81 tvori kompleks koji zajedno s BCR omogućuje aktivaciju B limfocita. Ujedno, CD21 je receptor komplementa tipa 2 koji sudjeluje u vezanju razgradnih proizvoda komponente C3 sustava komplementa i pospješuje prikazivanje antigena na B limfocitima (ZABEL i WEIS, 2001.). Plazmablasti podrijetlom od aktiviranih B limfocita gube i ekspresiju molekule IgM, koji nakon prelaska u plazma stanice gube i ekspresiju molekule CD2. Memorijski B limfociti također gube ekspresiju molekule CD2, ali zadržavaju ekspresiju molekule IgM (ŠINKORA i BUTLER, 2009.).

2.6. Fenotip T limfocita i NK stanica svinja nakon izlaganja SHV-1

U većini istraživanja su fenotip NK stanica i pojedinih subpopulacija T limfocita iz krvi svinja cijepljenih/inficiranih sa SHV-1, te udjeli tih stanica, analizirani nakon *in vitro* stimualcije. Prema istraživanju ZUCKERMANN i HUSMANN (1996.), u kojem su PBMC izdvojene iz svinje cijepljene sa SHV-1, populacija T limfocita nakon *in vitro* stimulacije s inaktiviranim SHV-1 sadržavala je 10 do 20% limfoblasta (aktivirane stanice) i većinom mirujuće T limfocite. Populacija limfoblasta sadržavala je najviše T limfocita s fenotipom $CD4^+CD8^+$ (41%), a zatim $CD4^-CD8^-$ (38%), $CD4^-CD8^+$ (13%) i $CD4^+CD8^-$ (7%), dok je populacija mirujućih T limfocita sadržavala najviše stanica s fenotipom $CD4^-CD8^+$ (30%) te zatim $CD4^-CD8^-$ (29%), $CD4^+CD8^-$ (24%) i $CD4^+CD8^+$ (16%). U sličnom istraživanju (SUMMERFIELD i sur., 1996.), odnosno nakon izdvajanja PBMC-a iz svinje cijepljenje sa SHV-1 i *in vitro* stimulacije s inaktiviranim SHV-1, najveći udio T limfocita bio je s fenotipom kojem pripadaju klasični citotoksični T limfociti ($CD4^-CD8^+$, 49%), potom fenotipom kojem pripadaju pomoćnički T limfociti ($CD4^+CD8^-$, 29%), zatim s fentipom kojem pripadaju memorijski pomoćnički T limfociti ($CD4^+CD8^+$, 15%) i s fenotipom kojem pripadaju γδT limfociti ($CD4^-CD8^-$, 7 %). Međutim, prethodna dva istraživanja provedena su samo na jednoj životinji te navedeni nalazi nisu relevantni za širu populaciju. DE BRUIN i sur. (2000a.) su ispitivali proliferaciju stanica s fenotipom klasičnih citotoksičnih ($CD6^+C8^+$) i pomoćničkih ($CD4^+CD8^+$) T limfocita te $CD8^+$ γδT limfocita nakon specifične *in vitro*

restimulacije PBMC-a podrijetlom od svinja koje su nakon i/m cijepljenja s genski modificiranim SHV-1 (gE^-) u dobi 7 mjeseci bile trokratno ili jednokratno i/n inficirane s virulentnim sojem SHV-1. Rezultati su pokazali da su udjeli $CD6^+C8^+$ i $CD4^+CD8^+$ T limfocita u ukupnim limfocitima podrijetlom od svinja višekratno inficiranih nakon cijepljenja bili statistički značajno veći, a udio $CD8^+$ γδT limfocita statistički značajno manji, nego udjeli istih subpopulacija T limfocita podrijetlom od svinja jednokratno inficiranih nakon cijepljena. U istom istraživanju, nakon *in vitro* stimulacije PBMC-a s IL-12, udjeli stanica s fenotipom klasičnih citotoksičnih i pomoćničkih T limfocita u limfocitima cijepljenih svinja bili su veći, a udjeli $CD8^+$ γδT limfocita i NK stanica ($CD6^-CD8^+$) manji, nego u slučaju necijepljenih svinja. U *in vivo* istraživanju (DE BRUIN i sur., 1998.) nije utvrđena razlika u udjelima subpopulacija T limfocita koje eksprimiraju jednu molekulu (CD2, CD3, CD4, CD8, CD5 i CD6) ili dvije molekule ($CD2^+CD3^+$, $CD3^+$TCR-$\gamma\delta^+$, $CD4^+CD8^+$ i $CD5^+CD8^+$) u limfocitima periferne krvi između necijepljenih svinja i svinja i/m cijepljenih s atenuiranim genski modificiranim SHV-1 (gE^-) u dobi 7 mjeseci, unatoč povećanoj *in vitro* proliferaciji limfocita nakon cijepljenja.

Proveden je vrlo mali broj istraživanja u kojima je ispitivan utjecaj pojedinih subpopulacija T limfocita na zaštitu svinja od infekcije sa SHV-1. Jedno od njih su proveli VAN ROOIJ i sur. (2004.) na četiri skupine cijepljenih svinja. Sve svinje su i/m cijepljene protiv BA u dobi dvanaest tjedana i docijepljene četiri tjedna kasnije te i/n inficirane virulentnim sojem SHV-1 šest tjedana nakon drugog cijepljenja. Prva skupina svinja je cijepljena s atenuiranim SHV-1 i adjuvansom (voda u ulju), druga skupina s atenuiranim SHV-1, treća skupina s inaktiviranim SHV-1 i istim adjuvansom, a četvrta skupina s inaktiviranim SHV-1. Treći dan nakon infekcije ispitivana je proliferacija limfocita (specifična *in vitro* restimulacija PBMC-a) te udjeli stanica s fenotipom memorijskih pomoćničkih T limfocita ($CD4^+CD6^+CD8^{+dull}$) i fenotipom klasičnih citotoksičnih T limfocita ($CD4^-CD6^+CD8^{+bright}$) u proliferiranim limfocitima. Ovo istraživanje je pokazalo da je najbolja zaštita svinja (izostanak vrućice i izlučivanja virusa orofaringealnim ekskretom) postignuta nakon cijepljenja s atenuiranim SHV-1 i adjuvansom, koja je treći dan nakon infekcije virulentnim SHV-1 bila povezana sa značajno većom *in vitro* proliferacijom limfocita periferne krvi i značajno većim udjelom stanica s fenotipom klasičnih citotoksičnih T limfocita u odnosu na nezaštićene svinje. Iako je udio $CD4^+CD6^+CD8^{+dull}$ T limfocita podrijetlom od svinja cijepljenih atenuiranim SHV-1 bez adjuvansa bio statistički značajno manji nego za svinje cijepljene inaktiviranim SHV-1 i adjuvansom, vrućica i izlučivanje virusa u potonjih svinja trajali su statistički značajno dulje. Za razliku od udjela stanica s

fenotipom memorijskih pomoćničkih T limfocita, udio $CD4^{-}CD6^{+}CD8^{+bright}$ T limfocita podrijetlom od svinja cijepljenih atenuiranim SHV-1 bez adjuvansa bio je veći nego za svinje cijepljene inaktiviranim SHV-1 i adjuvansom. Stoga navedeno istraživanje ukazuje na to da pomoćnički T limfociti nemaju presudnu ulogu u zaštiti svinja od infekcije virulentnim sojem SHV-1, odnosno ukazuje na veći značaj klasičnih citotoksičnih T limfocita za ranu zaštitu svinja od infekcije.

2.7. Imunomodulatori

Imunomodulatori su tvari biološkog ili kemijskog podrijetla koje utječu na funkciju imunosnog sustava. Imunomodulatori nespecifično djeluju na mehanizme urođene i stečene imunosti. Mogu se primijeniti u slučajevima kada treba potaknuti imunosnu reakciju organizma, odnosno pojačati opću otpornost organizma, kao što su stres, nezrelost imunosnog sustava te zarazne, kronične i tumorske bolesti ili u slučajevima kada imunosnu reakciju organizma treba potisnuti, kao što su alergijske i autoimune bolesti (DAY i SCHULTZ, 2013f.; DHAMA i sur., 2015.).

Za razliku od imunosupresivnih tvari, čije djelovanje je dobro poznato i koje se često primjenjuju u veterinarskoj medicini (glukokortikoidi, citostatici), djelovanje imunostimulacijskih tvari se još uvijek istražuje i vrlo malo ih je registrirano za samostalnu primjenu u veterinarskoj medicini (DAY i SCHULTZ, 2013f.). Dosadašnja istraživanja su pokazala da cjepivo koje sadržava bakteriju *Mycobacterium bovis* Calmette-Guérin te muramil dipeptid (peptidoglikan stanične stjenke gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija, uključujući mikobakterije) ili njegov sintetski analog (muramil tripeptid fosfatidiletanolamin) potiču aktivnost makrofaga, njihovu citotoksičnost prema tumorima i sintezu upalnih citokina, što ima povoljan klinički učinak u pasa s melanomima, hemangiosarkomima i osteosarkomima (MACEWEN i sur., 1999.; CLIFFORD i sur., 2000.; WYCISLO i FAN, 2015.). I neke druge bakterije i bakterijske tvari pokazale su sposobnost nespecifične stimulacije mehanizama urođenog imunosnog sustava te se primjenjuju u liječenju kroničnih bakterijskih piodermija pasa, kroničnih stafilokoknih mastitisa krava i kroničnih upala dišnog sustava konja (inaktivirana bakterija *Propionibacterium acnes*), (BECKER i sur., 1989.; DINSMORE i sur., 1995.; DAVIS i sur., 2003.) te za smanjenje mijelosupresije u pasa (ekstrakt bakterije *Serratia marscences*), (OGILVIE i sur., 1992.).

Citokini su proteini koje ponajviše sintetiziraju makrofagi i limfociti, ali i drugi leukociti te fibroblasti. Važni su za regulaciju upalnih procesa i interakciju stanica urođene i

stečene imunosti, odnosno za usmjeravanje imunosne reakcije (TIZARD, 2000c.). Istraživanja su pokazala da su citokini, poput interferona, interleukina i faktora nekroze tumora, učinkoviti u poticanju urođene i stečene imunosti i mogu pomoći u liječenju virusnih, bakterijskih i gljivičnih infekcija ljudi (TRAPERO-MARUGÁN i sur., 2006.; RIVERO-LEZCANO, 2008.; VAN DE VEERDONK i sur., 2012.) te virusnih i bakterijskih infekcija domaćih životinja (DALEY i sur., 1991.; OPAL i sur., 1998.; MINAGAWA i sur., 1999.; DE MARI i sur., 2004.; ALLUWAIMI, 2004.). Međutim, njihovu širu primjenu u veterinarskoj medicini otežavaju nepovoljna farmakokinetička svojstva (kratko vrijeme poluživota u plazmi i otežano postizanje distribucije u željene dijelove organizma nakon sustavne primjene) i nuspojave (DHAMA i sur., 2008.). Nativni citokini se također teško proizvode u većim količinama, ali razvoj rekombinantnih citokina bi mogao omogućiti njihovu komercijalnu primjenu (DHAMA i sur., 2015.). Tako se rekombinantni mačji IFN-ω koristi u liječenju parvovirusne infekcije pasa i infekcija mačaka virusima leukemije i imunodeficijencije (DE MARI i sur., 2003.; LEAL i GIL, 2016.).

Imunostimulacijski učinak imaju i neki virusi. Dosadašnja istraživanja su pokazala da inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* ima izraženo imunostimulacijsko djelovanje u različitih vrsta domaćih sisavaca te se zbog tog svojstva primjenjuje u preventivne i terapijske svrhe u veterinarskoj medicini (WEBER i sur., 2013.). Virus *Parapoxvirus ovis* (ORF virus) je uzročnik akutne kožne zarazne bolesti ovaca i koza (zarazni ekcem ovaca), a pripada rodu *Parapoxvirus* i porodici *Parapoxviridae*.

U svinja se istražuje i imunostimulacijsko djelovanje probiotika iz rodova *Lactobacillus* i *Bacillus* (SUN i sur., 2010.; DENG i sur., 2013.; LÄHTEINEN i sur., 2014.), biljnih ekstrakata, kao što su sok i sjemenke *Echinacea purpurea*, polisaharid *Astragalus membranaceus* i timol (MAASS i sur., 2005.; YUAN i sur., 2006.; TREVISI i sur., 2007.) te polisaharida gljivica, kao što su manan i β-glukan podrijetlom od gljivice *Saccharomyces cerevisiae* (DAVIS i sur., 2004.; LI i sur., 2006.; EICHER i sur., 2006.).

Imunomodulatori se mogu koristiti i u cjepivima kao adjuvansi. Adjuvansi su tvari koje mogu ubrzati, produljiti ili pojačati specifični odgovor imunosnog sustava na cjepni antigen (VOGEL, 2000.). Adjuvansi su posebno važni u slučajevima kada cjepni antigeni samostalno teško mogu potaknuti potrebnu imunost, kao što su stare ili vrlo mlade jedinke, te mogu smanjiti dozu cjepnog antigena i broj cijepljenja za postizanje potrebne imunosti (SPICKLER i ROTH, 2003.). Dosadašnja istraživanja ukazuju da adjuvansi mogu djelovati na jedan ili više načina koji uključuju: poticanje sinteze citokina i kemokina, privlačenje stanica na mjesto primjene antigena, povećanje unosa antigena u APC i prikazivanje antigena,

aktiviranje i sazrijevanje APC (ekspresija MHC II i kostimulatornih molekula), aktiviranje pomoćničkih T limfocita te imunomodulaciju, odnosno aktivaciju B limfocita i/ili citotoksičnih T limfocita (AWATE i sur., 2013.; GERDTS, 2015.). Za neke adjuvanse je utvrđeno da u ljudi i životinja mogu usmjeriti imunosnu reakciju na cjepni antigen. Tako neki adjuvansi mogu potaknuti uglavnom citokine Th1-limfocita (monofosforil lipid A bakterije *Salmonella minnesota* i citidin-fosfat-gvanozin oligodeoksinukleotidi, CpG ODN), neki uglavnom citokine Th2-limfocita (aluminijeve soli i hidrofilni derivati muramil dipeptida), a neki podjednako citokine oba tipa Th-limfocita (emulzija skvalena u vodi, liposomi, arheosomi, saponini, imunostimulacijski kompleksi i flagelin bakterije *Salmonella typhimurium*). Jednako tako, neki adjuvansi mogu potaknuti uglavnom staničnu imunost (CpG ODN), neki uglavnom humoralnu imunost (aluminijeve soli, emulzija skvalena u vodi, flagelin bakterije *S. typhimurium*), dok adjuvansi, kao što su emulzija vode u ulju, liposomi, arheosomi, saponini i imunostimulacijski kompleksi, mogu podjednako potaknuti staničnu i humoralnu imunost (SPICKLER i ROTH 2003.; COFFMAN i sur., 2010.; HEEGAARD i sur., 2011.; AWATE i sur., 2013.). Stoga je za svako cjepivo, ali i za ciljnu vrstu i način primjene cjepiva, potrebno odabrati odgovarajući adjuvans kako bi se potaknula imunosna reakcija koja će omogućiti najbolju zaštitu (SPICKLER i ROTH, 2003.; HEEGAARD i sur., 2011.). U tu svrhu je moguće kombinirati više adjuvansa (GERDTS, 2015.). Istraživanja na svinjama su pokazala mogućnost korištenja i drugih tvari s imunostimulacijskim djelovanjem kao cjepnih adjuvansa, uključujući rekombinantne citokine (ZUCKERMANN i sur., 1998.; KIM i sur; 2012.) i lijekove, kao što je antiparazitik levamisol (BOŽIĆ i sur., 2003.; 2011.; KOVŠCA JANJATOVIĆ i sur., 2008.).

2.7.1. Imunomodulacijsko djelovanje virusa *Parapoxvirus ovis*

Inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* se, zbog dokazanog imunostimulacijskog djelovanja, u veterinarskoj medicini samostalno primjenjuje u preventivne i terapijske svrhe (WEBER i sur., 2013.). Istraživanja u kojima je inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* samostalno primijenjen svinjama pokazala su povoljne kliničke, kao i imunomodulacijske učinke. *In vivo* istraživanja u svinja pokazala su da i/m primjena inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* može značajno smanjiti simptome sindroma kržljavosti odbite prasadi (KYRIAKIS i sur., 1998.) te smanjiti simptome i patoanatomske promjene BA (BIUK-RUDAN i sur., 2004.). Inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* može potaknuti *in vitro* proliferaciju izdvojenih PBMC-a svinja te sintezu citokina IL-2, IFN-α i IFN-γ od strane

$CD4^+CD25^+SLA\text{-}DR^+$ limfocita, koji su ujedno bile najbrojnije stanice među limfoblastima (FACHINGER i sur., 2000b.). Međutim, isto istraživanje nije pokazalo učinkovitost inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* u poticanju fagocitoze niti utjecaj na aktivnost NK stanica. Istraživanje BIUK-RUDAN i sur. (2004.) je pokazalo statistički značajno veću nespecifičnu *in vitro* proliferaciju T i B limfocita periferne krvi svinja kojima je i/m primijenjen inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* nego podrijetlom od svinja koje su i/m cijepljene atenuiranim SHV-1. Rezultat navedene razlike može biti taj što je učinak na proliferaciju limfocita analiziran neposredno nakon zadnje primjene inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* (tri doze s razmakom dva dana) i dva tjedna nakon primjene druge doze cjepiva. Međutim, između osmog i trinaestog dana nakon i/n infekcije virulentnim sojem SHV-1 kroz nos, nespecifična *in vitro* proliferacija T i B limfocita periferne krvi svinja kojima je primijenjen inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* bila je očekivano manja nego podrijetlom od cijepljenih svinja, s obzirom da cjepivo potiče razvoj specifične imunosti.

Imunostimulacijski učinak inaktiviranog *Parapoxvirus ovis* je utvrđen i nakon primjene u kombinaciji s cjepivom. TERZIĆ i sur. (2004.) su pokazali veći udio $CD4^+$ i $CD8\alpha^+$ leukocita periferne krvi te veći titar antivirusnih serumskih protutijela u svinja kojima je i/m primijenjeno subjedinično cjepivo protiv klasične svinjske kuge (gE2) u kombinaciji s inaktiviranim virusom *Parapoxvirus ovis*, nego u svinja kojima je primijenjeno samo cjepivo.

2.7.2. Imunomodulacijsko djelovanje lipopolisaharida i bakterija iz roda *Propionibacterium*

Lipopolisaharid je glikolipid koji se nalazi u stjenci gram-negativnih bakterija (endotoksin). Njegova komponenta lipid A ima imunostimulacijsko djelovanje, odnosno potiče aktivnost stanica urođenog imunosnog sustava, sintezu citokina i odgovor Th1-limfocita. Budući da je lipid A toksičan, razvijen je njegovi netoksični oblik. Monofosforil lipid A, dobiven od soja bakterije *Salmonella minnesota* 595, za sada je jedini neškodljivi derivat lipida A koji se primjenjuje kao adjuvans u humanim cjepivima (BOHANNON i sur., 2013.).

Propionibacterium spp. je rod gram-pozitivnih, anaerobnih bakterija koje su najčešće dio normalne mikroflore kože ljudi (WILDEMAN i sur., 2016.), ali se nalaze i u usnoj šupljini, debelom crijevu, zvukovodu i na konjunktivama, kao primjerice *Propionibacterium acnes* (PERRY i LAMBERT, 2011.). Bakterije iz roda *Propionibacterium* obično su nepatogene, ali u određenim okolnostima mogu uzrokovati akne, endokarditis, infekcije oka,

usne šupljine i SŽS-a (*P. acnes*) te infekcije kostiju i zglobova (*P. acnes*, *P. granulosum*, *P. avidum*), posebice nakon ortopedskih kirurških zahvata (PERRY i LAMBERT, 2011.; WILDEMAN i sur., 2016.). Dugo je poznato da bakterije iz roda *Propionibacterium* imaju imunostimulacijsko djelovanje. Istraživanja su pokazala da mogu potaknuti funkciju makrofaga i NK stanica, sintezu citokina i imunosni odgovor na razini stanične i humoralne imunosti, te da imaju antitumorsko djelovanje i mogu pojačati otpornost organizma prema virusnim, bakterijskim i gljivičnim infekcijama u ljudi i životinja (PULVERER i sur., 1985.; ROSZKOWSKI i sur., 1990.). Ranije je spomenuto da se bakterija *P. acnes* zbog imunostimulacijskog djelovanja primjenjuje u liječenju infekcija konja, goveda i pasa. Inaktivirana bakterija *P. granulosum* se u kombinaciji s detoksificiranim lipopolisaharidima (LPS) bakterije *Escherichia coli* može primjenjivati kao imunomodulator za povećanje opće otpornosti organizma svinja i kao pomoćno sredstvo u liječenju bakterijskih infekcija svinja (FERRO i sur., 2000a.; 2000b.). U istraživanju PAPPATERRA MENDOZA i sur. (2000.) kombinacija detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* i inaktivirane bakterije *P. granulosum* je *in vitro* potaknula PMBC na sintezu citokina (IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α i IFN-γ). Razine svih citokina bile su niže nego u slučaju kada su korišteni samo detoksificirani LPS bakterije *E. coli*, osim za IFN-γ. Intramuskularna primjena cjepiva s atenuiranim SHV-1 te kombinacije detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* i inaktivirane bakterije *P. granulosum* svinjama u dobi između osam i deset tjedana života je nakon četiri tjedna rezultirala značajno višim titrom serumskih protutijela za SHV-1 od samostalne primjene cjepiva, unatoč prisutnosti antivirusnih majčinskih protutijela u trenutku cijepljenja. Unatoč boljem humoralnom odgovoru, nije utvrđena statistički značajna razlika u *in vitro* proliferaciji PBMC-a između svinja kojima je cjepivo primijenjeno s i bez kombinacije detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* i inaktivirane bakterije *P. granulosum*.

LO i sur. (2009.) su pokazali da su kombinacija detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* i inaktivirane bakterije *P. granulosum* te cjepivo s *Mycoplasma hyopneumoniae* ili virusom klasične svinjske kuge, nakon zajedničke i/m primjene svinjama u dobi šest tjedana, rezultirali statistički značajno većom nespecifičnom citotoksičnosti NK stanica te nespecifičnom proliferacijom limfocita *in vitro* u odnosu na primjenu samo cjepiva. Ujedno, primjena imunomodulatora u kombinaciji s pojedinim cjepivom doprinijela je statistički značajno višem titru serumskih protutijela za *M. hyopneumoniae* i virus klasične svinjske kuge. Zanimljivo, dodatna doza navedenog imunomodulatora značajno je povećala titar serumskih protutijela za *M. hypopneumoiniae*, ali ne i serumskih protutijela za virus klasične svinjske kuge.

Iako se adjuvansi većinom koriste u cjepivima s inaktiviranim mikroorganizmima i subjediničnim cjepivima, istraživanje VAN ROOIJ i sur. (2004.) je pokazalo da je cjepivo s atenuiranim SHV-1 i adjuvansom učinkovitije u ranoj zaštiti svinja od kliničkih znakova i izlučivanja virusa nakon infekcije s virulentnim SHV-1 od cjepiva s atenuiranim SHV-1 bez adjuvansa. Cjepivo s atenuiranim SHV-1 i adjuvansom rezultiralo je statistički značajno većom *in vitro* proliferacijom stanica s fenotipom memorijskih pomoćničkih T limfocita i većom *in vitro* proliferacijom stanica s fenotipom klasičnih citotoksičnih T limfocita nego cjepivo bez adjuvansa. Intramuskularna primjena cjepiva s atenuiranim SHV-1 svinjama, u kombinaciji s peroroalnom primjenom imunomstimulatora CpG ODN, značajno je povećala specifičnu proliferaciju PBMC-a i razinu IFN-γ *in vitro*, kao i titar antivirusnih serumskih protutijela razreda IgG2, u odnosu na primjenu samo cjepiva (LINGHUA i sur., 2006.).

3. OBRAZLOŽENJE TEME

Bolest Aujeszkoga u svinjogojstvu uzrokuje izravne gospodarske štete zbog uginuća prasadi, slabijeg rasta tovljenika i smanjene plodnosti krmača, ali i neizravne, zbog zabrane izvoza proizvoda podrijetlom od svinja iz zemalja u kojima je SHV-1 prisutan u zemlje sa statusom slobodnih od SHV-1. Iako je BA u domaćih svinja iskorijenjena u većini zemalja Europske unije, Kanadi, SAD-u i na Novom Zelandu, enzootski se još uvijek pojavljuje u zemljama jugoistočne Europe, Južnoj Americi, Aziji i Africi. Virus BA je dokazan u populacijama divljih svinja mnogih zemlja, uključujući i one u kojima je BA iskorijenjena u populaciji domaćih svinja, te su stalni potencijalni izvor infekcije.

Primjenom cjepiva protiv BA u domaćih svinja moguće je smanjiti pomor, kliničke znakove bolesti i izlučivanje virusa nakon infekcije virulentnim sojevima SHV-1, ali nije moguće postići razinu imunosti koja bi spriječila latentnu infekciju. Latentno inficirane svinje mogu u slučaju reaktivacije virusa postati izvor infekcije za druge svinje i druge vrste životinja.

Iako se adjuvansi većinom primjenjuju u cjepivima s inaktiviranim mikroorganizmima ili njihovim dijelovima, cjepivo s atenuiranim SHV-1 i adjuvansom (ulje u vodi) se pokazalo učinkovitijim u zaštiti svinja od kliničkih znakova i izlučivanja virusa nakon infekcije s virulentnim sojem SHV-1 od cjepiva s atenuiranim SHV-1 bez adjuvansa. Pritom je najbolja zaštita svinja nakon infekcije sa SHV-1 bila povezana sa značajno većom *in vitro* proliferacijom limfocita i značajno većim udjelom stanica s fenotipom klasičnih citotoksičnih T limfocita.

Istraživanja su također pokazala da inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* te kombinacija inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* u svinja imaju imunostimulacijsko djelovanje te da potencijalno mogu djelovati kao adjuvansi.

Međutim, do sada je objavljeno malo istraživanja o fenotipu limfocita periferne krvi svinja nakon primjene cjepiva protiv BA i/ili navedenih imunomodulatora.

Pretpostavka ovog istraživanja je da istovremena primjena imunomodulatora mikrobnog podrijetla u kombinaciji s cjepivom protiv BA u svinja potiče bržu pojavu većih udjela populacija i subpopulacija limfocita periferne krvi, koje su se prema dosadašnjim spoznajama pokazale važnim za ranu zaštitu od prirodne infekcije sa SHV-1, nego primjena samo cjepiva.

Stoga je cilj istraživanja utvrditi mogući sinergijski učinak odabranih imunomodulatora mikrobnog podrijetla (inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis*, odnosno kombinacije detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* i inaktivirane bakterije *P. granulosum*) i cjepiva s atenuiranim SHV-1 na staničnu imunost svinja. U tu svrhu su rezultati analize leukocita te pojedinih populacija limfocita (T limfocita, B limfocita i NK stanica) i subpopulacija T limfocita iz periferne krvi svinja kojima je cjepivo primijenjeno s pojedinim imunomodulatorom uspoređeni s rezultatima dobivenim za svinje kojima su primijenjeni imunomodulatori bez cjepiva ili samo cjepivo, te za svinje iz negativne kontrolne skupine.

Dobiveni rezultati bi mogli doprinijeti boljem razumijevanju stanične imunosti u perifernoj krvi svinja izloženih atenuiranom SHV-1 sa i bez istraživanih imunomodulatora mikrobnog podrijetla. Također će se dobiti spoznaje o učincima istraživanih imunomodulatora mikrobnog podrijetla na leukocite, NK stanice, B limfocite te T limfocite i njihove subpopulacije u perifernoj krvi svinja.

Navedene spoznaje mogle bi imati značaj u budućim istraživanjima funkcije pojedinih subpopulacija T limfocita svinja, razvoju učinkovitijih cjepiva protiv BA, primjeni imunomodulatora mikrobnog podrijetla kao adjuvansa u cjepivima protiv BA te široj primjeni imunomodulatora u svinjogojstvu.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Materijal

4.1.1. Životinje u pokusu

U svrhu istraživanja utjecaja imunomodulatora mikrobnog podrijetla na staničnu imunost svinja cijepljenih atenuiranim cjepivom protiv bolesti Aujeszkoga proveden je pokus na 30 komercijalnih križanaca svinja. Svinje su bile u dobi tri mjeseca, oba spola i prosječne tjelesne mase 25 kg. Svinje nisu potjecale od krmača cijepljenih protiv BA niti su prethodno cijepljene. Slučajnim odabirom razvrstane su u šest skupina s po pet životinja i označene ušnim markicama. Svaka skupina je držana u zasebnim odjeljcima, u kontroliranim farmskim uvjetima. Svinje su hranjene *ad libitum* komercijalnom hranom za tovne svinje. Pristup vodi za piće bio je neograničen.

4.1.2. Cjepivo i imunomodulatori

U pokusu su primijenjeni komercijalni veterinarsko-medicinski proizvodi (VMP) koji sadržavaju imunomodulatore mikrobnog podrijetla (Inmodulen i Zylexys) i/ili cjepivo protiv BA (AY-VAK Bartha). Inmodulen (Laboratorios Calier, Španjolska) je suspenzija za injekciju koja u jednom mL sadržava 0,25 mg inaktivirane bakterije *Propionibacterium granulosum* i 0,02 mg detoksificiranih LPS-a bakterije *Escherichia coli.* Zylexis (Zoetis SA, Belgija) je liofilizat i otapalo za suspenziju za injekciju, koja sadržava inaktivirani *Prapoxvirus ovis*, soj D1701. Prema deklaraciji proizvođača, jedan mL Zylexis sadržava količinu virusa koja *in vitro* potiče tvorbu najmanje 230 interferonskih jedinica. Cjepivo AY-VAK Bartha (Genera d.d., Republika Hrvatska) je liofilizat i otapalo za suspenziju za injekciju, koja u jednom mL sadržava najmanje $10^{4,5}$ infektivne doze za 50% tkivne kulture (engl. *Tissue Culture Infectious Dose*, $TCID_{50}$) atenuiranog SHV-1, soj Bartha K/61 gE-.

4.1.3. Kompleti za serološke pretrage

Za dokazivanje serumskih protutijela za gE i gB SHV-1 korišteni su komercijalni imunoenzimski testovi HerdCheck Anti-PRV gpI (IDEXX Laboratories, SAD) i HerdCheck Anti-PRV gpB (IDEXX Laboratories, SAD).

4.1.4. Monoklonska protutijela za višebojnu protočnu citometriju

U Tablici 1. prikazan je popis komercijalnih mišjih monoklonskih protutijela za leukocitne antigene svinja koja su korištena za analizu fenotipa T i B limfocita te NK stanica višebojnom protočnom citometrijom.

Tablica 1. Prikaz korištenih mišjih monoklonskih protutijela za leukocitne antigene svinja i fluorokroma s kojima su obilježena

Monoklonsko protutijelo	**Klon**	**Izotip**	**Fluorokrom**	**Izvor**
CD3ε	PPT3	IgG1κ	Alexa Fluor® 405 *	Novus Biologicals, SAD
TCR-δ	PGBL22A	IgG1	Alexa Fluor™ 750 - alofikocijanin **	Washington State University - MonoclonalAntibody Centar, SAD
CD4	74-12-4	IgG2bκ	Spectral Red™ (R-fikoeritrin/cijanin 5) *	Southern Biotech, SAD
CD8α	76-2-11	IgG2a	Alexa Fluor™ 488 ***	Washington State University - MonoclonalAntibody Centar, SAD
CD16	G7	IgG1κ	R-fikoeritrin *	Bio-Rad Laboratories, SAD
CD21	BB6-11C9.6	IgG1κ	R-fikoeritrin *	Southern Biotech, SAD
SLA-DR	2E9/13	IgG2b	Alofikocijanin ****	Bio-Rad Laboratories, SAD

* monoklonsko protutijelo za CD3ε je komercijalno obilježeno s fluorokromom

** monoklonsko protutijelo za TCR-δ je posredno obilježeno komercijalnim kompletom koji sadržava fluorokrom vezan za sekundarna protutijela i koja specifično vežu mišja protutijela izotipa IgG1 (Zenon™AlexaFluor™ 750-Allophycocyanin, Thermo Fisher Scientific, SAD)

*** monoklonsko protutijelo za CD8α je posredno obilježeno komercijalnim kompletom koji sadržava fluorokrom vezan za sekundarna protutijela i koja specifično vežu mišja protutijela izotipa IgG2a (Zenon™AlexaFluor™ 488, Thermo Fisher Scientific, SAD)

**** monoklonsko protutijelo za SLA-DR je posredno obilježeno komercijalnim kompletom koji sadržava fluorokrom i reagense za vezanje fluorokroma na protutijelo (Lightning-Link® Allophycocyanin (APC) Conjugation Kit, Innova Biosciences, UK)

4.2. Plan istraživanja

4.2.1. Pokus

Pokus je započeo sedam dana nakon formiranja skupina i prilagodbe svinja na nove uvjete držanja. Proveden je sukladno Zakonu o dobrobiti životinja (NN 135/06, NN 37/13), usklađenim s europskim propisima, i Pravilniku o zaštiti životinja koje se koriste u znanstvene svrhe (NN 55/13) te na temelju Rješenja Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske i odluke Etičkog povjerenstva Veterinarskog fakulteta (klasa: 640-01/16-17/66) i Hrvatskog veterinarskog instituta.

Svi VMP-i korišteni tijekom pokusa odobreni su u Republici Hrvatskoj za primjenu u svinja. Pokus je klasificiran kao blagi pokus budući su uzorci dobiveni samo venepunkcijom, a za obuzdavanje životinja korištena je samo sajla.

Liofilizirane komponente Zylexis i AY-VAK Bartha suspendirane su u pripadajućim otapalima prema uputama proizvođača neposredno prije primjene svinjama.

Vrijeme primjene cjepiva i imunomodulatora u pojedinim pokusnima skupinama, kao i primijenjene doze, opisani su u Tablici 2.

Tablica 2. Protokol primjene imunomodulatora (Inmodulen i Zylexis) i cjepiva (AY-VAK Bartha) skupinama u pokusu

Skupina	Inmodulen *	Zylexis **	AY-VAK Bartha ***
I.	1. i 4. dan pokusa		4. dan pokusa
II.	1. i 4. dan pokusa		
III.		1. i 4. dan pokusa	4. dan pokusa
IV.		1. i 4. dan pokusa	
V.			4. dan pokusa
VI.			

* 1 mL/10 kilograma tjelesne mase
** 2 mL/životinji
*** 1 mL/životinji

Oba imunomodulatora i cjepivo primijenjeni su injekcijom u mišiće vrata.

Zdravstveni nadzor svinja provodio se najmanje jedanput dnevno tijekom razdoblja prilagodbe i tijekom pokusa.

4.2.2. Uzorci

Uzorci periferne krvi od svake životinje uzeti su venepunkcijom iz prednje šuplje vene (*vena cava cranialis*) 1., 7., 11. i 18. dan pokusa u sterilne epruvete s antikoagulansom (K3-EDTA za hematološke pretrage ili litijev heparin za izdvajanje PBMC-a) ili u epruvete bez antikoagulansa (za serološke pretrage).

4.3. Metode

4.3.1. Hematološke pretrage

Za hematološke pretrage (diferencijalna i kompletna krvna slika) korištena je krv iz epruveta s antikoagulansom K3-EDTA.

4.3.1.1. Kompletna krvna slika

Krv je analizirana pomoću automatskog hematološkog analizatora (ABX Micros ABC Vet-ICHOR, Horiba ABX, Francuska). Rezultati analize eritrocita, leukocita i trombocita izraženi su kao apsolutni broj stanica u litri periferne krvi. Rezultati analize koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi i prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC) izraženi su u jedinici mase (gramima) na litru. Rezultati analize hematokrita izraženi su u postotcima, rezultati prosječnog volumena eritrocita (engl. *Mean Corpuscular Volume*, MCV) u jedinici volumena (femtolitrama, 10^{-15} L), a rezultati prosječne mase hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH) u jedinici mase (pikogramima).

4.3.1.2. Diferencijalna krvna slika

Na predmetno staklo položeno na ravnoj površini, staklenim štapićem kapnuta je kap krvi. Drugo predmetno staklo je prislonjeno uz kap krvi pod kutom 45° u odnosu na prvo predmetno staklo. Nakon što se kap krvi razlila po rubu drugog predmetnog stakla,

jednakomjernim potezom drugog predmetnog stakla krv je razmazana po dužini prvog predmetnog stakla. Krvni razmaz je osušen na zraku tijekom jednog sata. Na isti način je pripremljen razmaz svakog uzorka krvi.

Krvni razmaz je obojen metodom po Pappenheimu. Ukratko: krvni razmaz je prvo preliven bojom May-Grünwald te je nakon 3 minute ispran destiliranom vodom i ocijeđen. Zatim je krvni razmaz preliven bojom Giemsa koja je bila razrijeđena s destiliranom vodom 1:9 (V/V). Nakon 25 minuta krvni razmaz je ispran destiliranom vodom i položen u kosi položaj da se osuši. Na isti način je obojen razmaz svakog uzorka krvi.

Pod imerzijskim povećanjem (1000x) svjetlosnog mikroskopa (ZeissAxiostar Plus, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Njemačka) izbrojani su neutrofili (segmentirani i nesegmentirani), eozinofili, bazofili, limfociti i monociti te su ti brojevi ujedno značili i njihove postotke u leukocitima, budući da su pojedine vrste leukocita brojane u 100 leukocita svakog krvnog razmaza.

Apsolutni broj segmentiranih neutrofila i limfocita u perifernoj krvi svakog uzorka izračunat je na temelju rezultata kompletne krvne slike (apsolutni broj leukocita u perifernoj krvi) i rezultata diferencijalne krvne slike (udio segmentiranih neutrofila i limfocita u leukocitima) prema sljedećim formulama:

$$N_{NEUseg} = \frac{N_{LEU} \times U_{NEUseg}}{100}$$

gdje je:

N_{NEUseg} - apsolutni broj segmentiranih neutrofila u perifernoj krvi (x 10^9/L)
N_{LEU} - apsolutni broj leukocita u perifernoj krvi (x 10^9/L)
U_{NEUseg} - udio segmentiranih neutrofila u leukocitima (%)

$$N_{LIM} = \frac{N_{LEU} \times U_{LIM}}{100}$$

gdje je:

N_{LIM} - apsolutni broj limfocita u perifernoj krvi (x 10^9/L)
N_{LEU} - apsolutni broj leukocita u perifernoj krvi (x 10^9/L)
U_{LIM} - udio limfocita u leukocitima (%)

4.3.2. Serološke pretrage

4.3.2.1. Priprema uzoraka krvnog seruma

U epruvetama bez antikoagulansa krvni ugrušci su odvojeni od stjenki pomoću sterilnog staklenog štapića i nakon centrifugiranja pri 2500 okretaja/min tijekom 10 minuta (Rotina 420, Hettich, Njemačka) serum (nadtalog) je odvojen od krvnog ugruška. Uzorci seruma su pipetom prebačeni u nove epruvete i ostavljeni na sobnoj temperaturi do početka pretrage, koja je uslijedila neposredno nakon pripreme seruma.

4.3.2.2. Dokazivanje serumskih protutijela za gE SHV-1

Za dokazivanje serumskih protutijela za gE (prijašnji gI) SHV-1 korišten je odgovarajući imunoenzimski test (HerdCheck Anti-PRV gpI, IDEXX Laboratories, SAD) prema uputama proizvođača.

4.3.2.2.1. Etape metode

1. Reagensi iz kompleta zagrijani su na sobnoj temperaturi.

2. Ispitivani serumi te pozitivna i negativna kontrola iz kompleta razrijeđeni su u zasebnim epruvetama s puferom za razrjeđivanje seruma iz kompleta („*Sample Diluent*") u omjeru 1:1 (V/V).

3. U ukupno pet jažica mikrotitarske ploče (dvanaest puta osam jažica) presvučene antigenom (SHV-1) pipetom je odmjereno tri puta po 100 µL razrijeđene negativne kontrole (serum svinja bez protutijela za gE SHV-1) i dva puta po 100 µL razrijeđene pozitivne kontrole (serum svinja s protutijelima za gE SHV-1). U potreban broj preostalih jažica iste mikrotitarske ploče pipetom je odmjereno dva puta po 100 µL pojedinog razrijeđenog ispitivanog uzorka seruma.

4. Uslijedila je inkubacija na sobnoj temperaturi tijekom 60 minuta kako bi se protutijelima u pozitivnoj kontroli i ispitivanim uzorcima seruma omogućilo vezanje za antigen.

5. Za vrijeme inkubacije pripremljena je otopina za ispiranje, tako što je koncentrirana otopina za ispiranje iz kompleta („*Wash Concentrate*") razrijeđena destiliranom vodom u omjeru 1:9 (V/V).

6. Nakon inkubacije ispražnjen je sadržaj jažica te je svaka jažica isprana pet puta s 300 μL otopine za ispiranje. Jažice su isprane pomoću automatiziranog ispirača (Hydrofex washer, Tecan, Austria). Ispiranjem su uklonjena nevezana protutijela.

7. U svaku jažicu je dodano 100 μL konjugata iz kompleta (monoklonska protutijela za gE SHV-1 obilježena enzimom peroksidaza iz hrena), nakon čega je uslijedila inkubacija tijekom 20 minuta na sobnoj temperaturi. Tijekom druge inkubacije konjugat se veže za antigen ukoliko ispitivani uzorci seruma ne sadržavaju protutijela za gE SHV-1 ili u količini nedovoljnoj za neutralizaciju. Ukoliko su se protutijela za gE SHV-1 iz ispitivanih uzoraka seruma vezala za antigen tijekom prve inkubacije, tada konjugat ostaje slobodan (nevezan za antigen).

8. Postupak ispiranja je ponovljen i nakon druge inkubacije, kako bi se uklonio nevezani konjugat.

9. Nakon ispiranja u svaku jažicu je pipetom odmjereno 100 μL otopine supstrata iz kompleta („*TMB Substrate*").

10. Uslijedila je inkubacija tijekom 15 minuta na sobnoj temperaturi kako bi se omogućila reakcija između enzima i substrata. Ukoliko se konjugat vezao za antigen, enzim reagira sa supstratom pri čemu nastaje produkt plave boje.

11. Nakon inkubacije u svaku jažicu je dodano 50 μL otopine za zaustavljanje reakcije iz kompleta („*Stop Solution*").

12. Intenzitet boje, odnosno optička gustoća (engl. *Optical Density*, OD) očitana je pomoću spektrofotometra (Sunrise Basic, Tecan, Austrija) uporabom filtera koji propušta svjetlost valne duljine 650 nm.

4.3.2.2.2. Izračun rezultata

Srednja vrijednost negativne kontrole (NKx) izračunava se po sljedećoj formuli:

$$NKx = \frac{ODNK_1 + ODNK_2 + ODNK_3}{3}$$

gdje je:

$ODNK_1$ - optička gustoća prve negativne kontrole na mikrotitarskoj ploči
$ODNK_2$ - optička gustoća druge negativne kontrole na mikrotitarskoj ploči
$ODNK_3$ - optička gustoća treće negativne kontrole na mikrotitarskoj ploči

Srednja vrijednost pozitivne kontrole (PKx) izračunava se po sljedećoj formuli:

$$PKx = \frac{ODPK_1 + ODPK_2}{2}$$

gdje je:

$ODPK_1$ - optička gustoća prve pozitivne kontrole na mikrotitarskoj ploči
$ODPK_2$ - optička gustoća druge pozitivne kontrole na mikrotitarskoj ploči

Kriterij valjanosti testa:

Razlika između NKx i PKx mora biti jednaka ili veća od 0,300.

Rezultat ispitivanog uzorka seruma (R) izračunava se po sljedećoj formuli:

$$R = \frac{ODU}{NKx}$$

gdje je:

ODU - optička gustoća ispitivanog uzorka seruma

4.3.2.2.3. Tumačenje rezultata

Ako je R manji ili jednak 0,60, ispitivani uzorak seruma sadržava protutijela za gE SHV-1.

Ako je R manji ili jednak 0,70 i veći od 0,60, može se posumnjati da ispitivani uzorak seruma sadržava protutijela za gE SHV-1.

Ako je R veći od 0,70, ispitivani uzorak seruma ne sadržava protutijela za gE SHV-1.

4.3.2.3. Dokazivanje serumskih protutijela za gB SHV-1

Za dokazivanje serumskih protutijela za gB SHV-1 korišten je odgovarajući imunoenzimski test (HerdCheck Anti-PRV gpB, IDEXX Laboratories, SAD) prema uputama proizvođača.

4.3.2.3.1. Etape metode

Za dokazivanje serumskih protutijela za gB SHV-1 korišteni su isti postupci kao i za dokazivanje serumskih protutijela za gE SHV-1. Razlika je u tome što imunoenzimski test HerdCheck Anti-PRV gB sadržava drugačije reagense korištene u trećoj i sedmoj etapi metode od imunoenzimskog testa HerdCheck Anti-PRV gI te ima manji broj negativnih kontrola.

3. Pozitivna kontrola sadržava serum svinja s protutijelima za gB SHV-1, a negativna kontrola serum svinja bez protutijela za gB SHV-1. Razrijeđena negativna kontrola je pipetom odmjerena u dvije jažice (2 x100 µL).

7. Konjugat sadržava monoklonska protutijela za gB SHV-1 obilježena istim enzimom. Tijekom druge inkubacije konjugat se veže za antigen ako ispitivani uzorci seruma ne sadržavaju protutijela za gB SHV-1. Ako su se protutijela za gB SHV-1 iz ispitivanih uzoraka seruma vezali za antigen tijekom prve inkubacije, tada konjugat ostaje slobodan (nevezan za antigen).

4.3.2.3.2. Izračun rezultata

Srednja vrijednost negativne kontrole (NKx) izračunava se po sljedećoj formuli:

$$\boldsymbol{NKx = \frac{ODNK_1 + ODNK_2}{2}}$$

gdje je:

$ODNK_1$ - optička gustoća prve negativne kontrole na mikrotitarskoj ploči
$ODNK_2$ - optička gustoća druge negativne kontrole na mikrotitarskoj ploči

Srednja vrijednost pozitivne kontrole (PKx) izračunava se po sljedećoj formuli:

$$PKx = \frac{ODPK_1 + ODPK_2}{2}$$

gdje je:

$ODPK_1$ - optička gustoća prve pozitivne kontrole na mikrotitarskoj ploči
$ODPK_2$ - optička gustoća druge pozitivne kontrole na mikrotitarskoj ploči

Kriterij valjanosti testa:

Razlika između NKx i PKx mora biti jednaka ili veća od 0,300.

Rezultat ispitivanog uzorka seruma (R) izračunava se po sljedećoj formuli:

$$R = \frac{ODU}{NKx}$$

gdje je:

ODU - optička gustoća ispitivanog uzorka seruma

4.3.2.3.3. Tumačenje rezultata

Ako je R manji ili jednak 0,60, ispitivani uzorak seruma sadržava protutijela za gB SHV-1.
Ako je R manji ili jednak 0,70 i veći od 0,60, može se posumnjati da ispitivani uzorak seruma sadržava protutijela za gB SHV-1.
Ako je R veći od 0,70, ispitivani uzorak seruma ne sadržava protutijela za gB SHV-1.

4.3.3. Višebojna protočna citometrija

4.3.3.1. Izdvajanje PBMC-a na gradijentu gustoće

Uzorci krvi su pipetom prebačeni iz epruveta s antikoagluansom (litijev heparin) u sterilne epruvete i u svaku je dodana fiziološka otopina u omjeru 1:1 (V/V). U zasebne sterilne epruvete za potreban broj uzoraka, prvo je dodano sredstvo za izdvajanje PBMC-a iz krvi (Lymphoprep™, Alere Technologies AS, Norveška) te je zatim pažljivo nadslojen pojedini uzorak razrijeđene krvi u omjeru 2:1 (V/V). Epruvete s uzorcima krvi i Lymphoprepom™ su centrifugirane pri 900 x g tijekom 30 minuta (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Njemačka), kako bi se PBMC (sloj između plazme i Lymhoprep™) odvojile od eritrocita i

granuliranih leukocita, koji su bili istaloženi na dnu epruvete. Sloj s PBMC-ima svakog uzorka krvi pokupljen je sterilnom pipetom i prebačen u zasebne sterilne epruvete i dva puta ispran u mediju RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, SAD) na 600 x g tijekom 10 minuta (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Njemačka), kako bi se uklonili zaostali trombociti i Lymphoprep™. Svaki uzorak staničnog taloga (PBMC) je resuspendiran u 1 mL medija za zamrzavanje. Medij za zamrzavanje se sastojao od medija RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, SAD) kojem je dodano 10% (V/V) seruma goveđeg fetusa (Thermo Fisher Scientific, SAD) i 10% (V/V) dimetilsulfoksida (Sigma-Aldrich, SAD). Tako pripremljene suspenzije PBMC-a prvo su zamrznute na -80°C u spremniku (Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo Fisher Scientific, SAD) s izopropilnim alkoholom (Kemika d.d., Republika Hrvatska) te potom pohranjene u spremnik s tekućim dušikom do obilježavanja.

4.3.3.2. Odmrzavanje i priprema PBMC-a za obilježavanje

Suspenzije PBMC-a iz tekućeg dušika su brzo odmrznute u vodenoj kupelji (39 °C) tijekom 5 minuta. Svaki uzorak suspenzije PBMC-a je sterilnom pipetom prebačen u sterilne plastične epruvete i dva puta ispran u mediju RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, SAD) pri 400 x g tijekom 5 minuta (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Njemačka). Nakon drugog ispiranja staničnom talogu (PBMC) je dodano 5 mL medija RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, SAD) kojem je dodan neomicin (Sigma-Aldrich, SAD) i 10% (V/V) seruma goveđeg fetusa (Thermo Fisher Scientific, SAD). Koncentracija PBMC-a u svakom uzorku suspenzije stanica određena je pomoću Bürker-Türkovog hemocitometra, nakon prethodnog bojanja tripanskim plavilom konačne koncentracije 0,04% (m/V). U plastične epruvete dodano je 20 μL pojedinog uzorka suspenzije PBMC-a, 20 μL 0,4%-tne (m/V) otopine tripanskog plavila (Sigma-Aldrich, SAD) i 160 μL puferirane fiziološke otopine s dodatkom 5% (V/V) goveđeg seruma (Thermo Fisher Scientific, SAD). Koncentrirana (10x) puferirana fiziološka otopina (Lonza, Švicarska) je prethodno razrijeđena destiliranom vodom 1:9 (V/V). Na predmetno staklo s Bürker-Türkovim hemocitometrom postavljeno je pokrovno staklo i na njegov rub pipetom kapnuta dovoljno velika kap suspenzije obojanih PBMC-a, kako bi se razlila po cijeloj površini predmetnog stakla. Pod imerzijskim povećanjem (40x) svjetlosnog mikroskopa (Nikon Eclipse TS100, Nikon Corporation, Japan) PBMC su brojane u četiri dijagonalna kvadranta i jednom suprotnom kvadrantu. Na temelju izbrojenih stanica izračunata je koncentracija PBMC-a. Uzorci suspenzije PBMC-a pohranjeni su na 37 °C tijekom jednog sata.

4.3.3.3. Priprema monoklonskih protutijela

Monoklonska protutijela za molekule TCR-δ i CD8α obilježena su fluorokromima (Tablica 1.) pomoću komercijalnih kompleta za obilježavanje Zenon™ (Zenon™Alexa Fluor™ 750-Allophycocyanin za monoklonsko protutijelo za molekulu TCR-δ i Zenon™ Alexa Fluor™ 488 za monoklonsko protutijelo za molekulu CD8α), prema uputama proizvođača. U dvije plastične epruvete pipetom je zasebno odmjerena potrebna količina otopine monoklonskog protutijela za molekulu TCR-δ, odnosno otopine monoklonskog protutijela za molekulu CD8α, za odgovarajući broj uzoraka PBMC-a. U svaku epruvetu s monoklonskim protutijelom pipetom je odmjerena potrebna količina otopine sekundarnog protutijela s fluorokromom („*Component A*") odgovarajućeg kompleta za obilježavanje (pet puta veći volumen od volumena monoklonskog protutijela). Uslijedila je inkubacija tijekom pet minuta na mračnom mjestu i pri sobnoj temperaturi, kako bi se sekundarna protutijela s fluorokromom vezala za monoklonska protutijela. Zatim je u svaku epruvetu s monoklonskim protutijelom pipetom odmjerena potrebna količina otopine reagensa koji veže neutrošeno sekundarno protutijelo („*Component B*") odgovarajućeg kompleta za obilježavanje (pet puta veći volumen od volumena monoklonskog protutijela). Uslijedila je inkubacija tijekom pet minuta na mračnom mjestu i pri sobnoj temperaturi. Monoklonska protutijela za molekule TCR-δ i CD8α su svježe pripremljena prilikom svake analize uzoraka PBMC-a.

Iz komercijalne otopine monoklonskog protutijela za molekulu SLA-DR je prije obilježavanja uklonjen konzervans natrijev azid pomoću kompatibilnog komercijalnog kompleta za pročišćavanje monoklonskih protutijela (AbSelect™ Antibody Purification System, Innova Biosciences, UK) prema uputama proizvođača. Pročišćeno monoklonsko protutijelo za molekulu SLA-DR je zatim obilježeno flurokromom (Tablica 1.) pomoću komercijalnog kompleta za obilježavanje Lightning-Link® prema uputama proizvođača. Otopini monoklonskog protutijela za molekulu SLA-DR pipetom je dodana potrebna količina otopine reagensa koji omogućava vezanje fluorokroma za monoklonsko protutijelo („*LL-modifier reagent*") iz kompleta za obilježavanje (deset puta manji volumen od volumena monoklonskog protutijela). Navedena mješavina je zatim pipetom prebačena u bočicu s liofiliziranim fluorokromom („*Lightning-Link® mix*") iz kompleta za obilježavanje. Nakon inkubacije pripremljene mješavine tijekom 3 sata na sobnoj temperaturi u mraku, pipetom joj je dodana otopina reagensa za neutralizaciju fluoroscencije nevezanog fluorokroma („*LL-quencher reagent*") iz kompleta za obilježavanje (deset puta manji volumen od volumena

monoklonskog protutijela). Tako pripremljeno monoklonsko protutijelo za molekulu SLA-DR pohranjeno je u hladnjak (2 do 8°C) do obilježavanja PBMC-a.
U originalnu bočicu s liofiliziranim monoklonskim protutijelom za molekulu CD16, koje je komercijalno obilježeno flurokromom (Tablica 1.), pipetom je odmjeren potreban volumen destilirane vode prema uputi proizvođača. Pripremljena otopina monoklonskog protutijela za molekulu CD16 je pohranjena u hladnjak (2 do 8°C) do obilježavanja PBMC-a.
Monoklonska protutijela za molekule CD3 (epitop ε), CD4 i CD21 su komercijalne otopine monoklonskih protutijela obilježenih fluorokromom (Tablica 1.) koja se mogu koristiti bez prethodne pripreme. Monoklonska protutijela za molekule CD3, CD4 i CD21 su pohranjena u hladnjak (2 do 8°C) do obilježavanja PBMC-a.

4.3.3.4. Obilježavanje uzoraka PBMC-a korištenjem monoklonskih protutijela

Uzorci suspenzije PBMC-a su dva puta isprani u puferiranoj fiziološkoj otopini na 400 x g tijekom 5 minuta (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Njemačka), kako bi se uklonili medij RPMI 1640 i serum goveđeg fetusa. Nakon drugog ispiranja svakom uzorku staničnog taloga (PBMC) pipetom je dodan odgovarajući volumen kompleta za obilježavanje populacije mrtvih PBMC-a (Zombie Aqua™ Fixable Viability Dye, BioLegend, SAD), prema uputi proizvođača. Prethodno su prema uputi proizvođača pipetom pomiješani fluorescentna boja („*Zombie Aqua™ dye*") i dimetilsulfoksid iz kompleta Zombie Aqua™ te je dobivena otopina razrijeđena puferiranom fiziološkom otopinom 1:99 (V/V). Koncentrirana (10x) puferirana fiziološka otopina (Lonza, Švicarska) je prethodno razrijeđena destiliranom vodom 1:9 (V/V). Nakon inkubacije na mračnom mjestu i pri sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta, uzorci PBMC-a su isprani u puferiranoj fiziološkoj otopini s dodatkom 5% (V/V) goveđeg seruma (Thermo Fisher Scientific, SAD) pri 400 x g tijekom 5 minuta (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG, Njemačka). Koncentrirana (10x) puferirana fiziološka otopina (Lonza, Švicarska) je prethodno razrijeđena destiliranom vodom 1:9 (V/V). Nakon odlijevanja nadtaloga, uzorcima staničnog taloga (PBMC) je pipetom dodan odgovarajući volumen puferirane fiziološke otopine s dodatkom 5% (V/V) goveđeg seruma (Thermo Fisher Scientific, SAD), kako bi se u svakom uzorku postigla koncentracija 2,5 x 10^6 PBMC/mL. Koncentrirana (10x) puferirana fiziološka otopina (Lonza, Švicarska) je prethodno razrijeđena destiliranom vodom 1:9 (V/V).
U zasebne FACS (engl. *Fluorescence-acticated Cell Sorting*) epruvete pipetom je prebačeno 180 µL svakog uzorka pripremljene suspenzije PBMC-a (4,5 x 10^5 PBMC/FACS epruveti). U

svaku FACS epruvetu pipetom je odmjereno 20 μL izdvojenih serumskih mišjih imunoglobulina IgG (Invitrogen, SAD), koji smanjuju nespecifično vezanje obilježenih monoklonskih protutijela za PBMC. Svaki uzorak suspenzije PBMC-a je zatim raspoređen u tri zasebne FACS epruvete, tako što je u svaku FACS epruvetu pipetom prebačeno 50 μL (1,125 x 10^5 PBMC/FACS epruveti). FACS epruvete s PBMC-ima pohranjene su u hladnjak (2 °C do 8°C) do dodavanja obilježenih monoklonskih protutijela.

Kako bi se ubrzao postupak obilježavanja PBMC-a, pripremljene su dvije mješavine monoklonskih protutijela obilježenih fluorokromom. Prva mješavina je sadržavala obilježena monoklonskih protutijela za molekule CD3, TCR-δ, CD4, CD8α, CD16 i SLA-DR, a druga mješavina obilježena monoklonskih protutijela za molekule CD3, CD21 i SLA-DR (Tablica 3.).

U svaku mješavinu pipetom je dodan potreban volumen pojedinih otopina obilježenih monoklonskih protutijela, ovisno o broju uzoraka PBMC-a i broju PBMC-a u FACS epruveti. U prvu mješavinu je za svakih 10^5 PBMC-a dodano 0,3 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu CD3, 0,6 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu CD4, 0,3 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu CD8α, 0,2 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu TCR-δ, 0,3 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu SLA-DR i 0,1 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu CD16, dok je u drugu mješavinu za svakih 10^5 PBMC-a dodano 0,3 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu CD3, 0,6 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu CD21 i 0,3 μg obilježenog monoklonskog protutijela za molekulu SLA-DR. U prvu FACS epruvetu sa suspenzijom PBMC-a svakog uzorka pipetom je dodan odgovarajući volumen prve mješavine monoklonskih protutijela koji sadržava potrebne količine pojedinog obilježenog monoklonskog protutijela. U drugu FACS epruvetu sa suspenzijom PBMC-a svakog uzorka pipetom je dodan odgovarajući volumen druge mješavine monoklonskih protutijela koji sadržava potrebne količine pojedinog obilježenog monoklonskog protutijela. U treću FACS epruvetu sa suspenzijom PBMC-a svakog uzorka (Tablica 3.) nisu dodana obilježena monoklonska protutijela (neobilježene kontrolne stanice).

Nakon dodavanja obilježenih monoklonskih protutijela u odgovarajuće FACS epruvete svakog uzorka uslijedila je inkubacija u hladnjaku (2 do 8°C) tijekom 30 minuta, kako bi se omogućilo vezanje obilježenih monoklonskih protutijela za specifične antigene na PBMC-ima.

Nakon inkubacije PBMC su isprane u puferiranoj fiziološkoj otopini s dodatkom 5% (V/V) goveđeg seruma na 400 x g tijekom 5 minuta (Eppendorf Centrifuge 5810R, Eppendorf AG,

Njemačka), kako bi se uklonila nevezana monoklonska protutijela. Nakon odlijevanja nadtaloga uslijedila je fiksacija stanica, tako što je u svaku FACS epruvetu sa staničnim talogom (PBMC) pipetom odmjereno 70 µL 4%-tne (m/V) otopine formaldehida te 150 µL puferirane fiziološke otopine kojoj je dodano 5% (V/V) goveđeg seruma (Thermo Fisher Scientific, SAD).

Koncentrirana (36%, m/V) otopina formaldehida (Kemika d.d., Republika Hrvatska) je prethodno razrijeđena destiliranom vodom 1:8 (V/V), a koncentrirana (10x) puferirana fiziološka otopina (Lonza, Švicarska) destiliranom vodom 1:9 (V/V). Ovako pripremljene PBMC su analizirane protočnim citometrom.

Tablica 3. Shema obilježavanja uzoraka PBMC-a u pojedinoj FACS epruveti

Monoklonsko protutijelo / fluorokrom	**FACS epruveta**		
	1.	**2.**	**3.**
- / Zombie Aqua™ dye	+	+	+
CD3ε / Alexa Fluor® 405	+	+	-
CD4 / Spectral Red™ (R-fikoeritrin/cijanin 5)	+	-	-
CD8α / Alexa Fluor™ 488	+	-	-
TCR-δ / Alexa Fluor™ 750 - alofikocijanin	+	-	-
SLA-DR / alofikocijanin	+	+	-
CD16 / R-fikoeritrin	+	-	-
CD21 / R-fikoeritrin	-	+	-

4.3.3.5. Analiza obilježenih PBMC-a protočnim citometrom

Suspenzija obilježenih PBMC-a iz sve tri FACS epruvete pojedinog uzorka propuštena je na protočnom citometru (BD LSR II Flow Cytometer, BD Biosciences, SAD), koji je opremljen s tri lasera (plava svjetlost valne duljine 488 nm, crvena svjetlost valne duljine 640 nm i ljubičasta svjetlost valne duljine 405 nm) i sustavom detektora koji omogućavaju istovremenu analizu sedam različitih fluorokroma, korištenih za obilježavanje PBMC-a.

Ograda (engl. *Gate*) prvo je postavljena oko PBMC-a koje su nakon prednjeg raspršenja laserske svjetlosti (engl. *Forward Scatter*) odgovarale pojedinačnim stanicama, a za daljnju

analizu su obuhvaćene samo žive PBMC na temelju nevezanja Zombie Aqua™. Na temelju veličine i zrnatosti stanica korištenjem prednjeg i bočnog raspršenja laserske svjetlosti (engl. *Side Scatter*) obuhvaćena je populacija limfocita. U pojedinoj FACS epruveti analizirano je 10 000 pojedinačnih živih limfocita.

U populaciji limfocita prve FACS epruvete analiziran je udio T limfocita ($CD3^+CD16^-$) i njihovih subpopulacija s obzirom na ekspresiju molekula CD4, CD8α, TCR-δ i SLA-DR te fenotip NK stanica ($CD3^-CD16^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^-$). U populaciji limfocita druge FACS epruvete analiziran je udio B limfocita ($CD3^-CD21^+$). Detaljan opis analize prikazan je u Tablici 4.

Tablica 4. Shema analize T limfocita ($CD3^+CD16^-$) i njihovih subpopulacija s obzirom na ekspresiju molekula CD4, CD8α, TCR-δ i SLA-DR, NK stanica ($CD3^-CD16^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^-$) i B limfocita ($CD3^-CD21^+$)

Limfociti	**$CD3^+CD16^-$**	**$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+$**	$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$
			$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$
		$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+$	$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$
			$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$
		$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-$	$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$
			$CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$
		$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-$	$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$
			$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$
			$CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$
	$CD3^-CD16^+$	**$CD3^-CD16^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^-$**	
	$CD3^-CD21^+$		

Tijekom propuštanja na citometru podatci su prikupljani računskim programom BD FACSDiva Software (verzija 5.0.3.). Prikupljeni podatci analizirani su programom Flow Jo (verzija 7.6.5., FlowJo, LCC, SAD).

Rezultati analize prema shemi opisanoj u Tablici 4. izraženi su u postotcima, pri čemu su rezultati populacija stanica prikazanih u drugom stupcu dobiveni kao udjeli populacije stanica prikazane u prvom stupcu, rezultati populacija stanica prikazanih u trećem stupcu dobiveni su kao udjeli odgovarajuće populacije stanica prikazane drugom stupcu, a udjeli populacija stanica prikazanih u četvrtom stupcu dobiveni su kao udjeli odgovarajuće populacije stanica prikazane u trećem stupcu.

4.3.3.6. Izračun rezultata

Udjeli (%) T ($CD3^+CD16^-$) i B ($CD3^-CD21^+$) limfocita u limfocitima dobiveni su izravno prema analizi opisanoj u Tablici 4.

A) Udio (%) NK stanica ($CD3^-CD16^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^-$) u limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$\frac{\boldsymbol{CD3^-CD16^+}(\%) \times \boldsymbol{CD3^-CD16^+CD8\alpha^+SLA-DR^-}(\%)}{\mathbf{100}}$$

B) Udio (%) γδT limfocita ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^+CD4^-$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$\left[\frac{\{\mathbf{a} \times (\mathbf{b}+\mathbf{c})\}}{\mathbf{100}}\right] + \left[\frac{\{\boldsymbol{d} \times (\boldsymbol{e}+\boldsymbol{f})\}}{\mathbf{100}}\right]$$

gdje je:

a - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+$(%)
b - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$(%)
c - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$(%)
d - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-$(%)
e - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$(%)
f - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$(%)

C) Udio (%) γδT limfocita koji eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^+CD4^-CD8\alpha^+$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$a \times \left(\frac{b+c}{100}\right)$$

gdje je:

a - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+$(%)
b - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$(%)
c - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$(%)

D) Udio (%) γδT limfocita koji eksprimiraju molekule CD8α i SLA-DR ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^+CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$a \times \left(\frac{b+c}{100}\right)$$

gdje je:

a - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+$(%)
b - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^+$(%)
c - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^+SLA\text{-}DR^-$(%)

E) Udio (%) populacije αβT limfocita ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$\left[\frac{\{a \times (b+c)\}}{100}\right] + \left[\frac{\{d \times (e+f)\}}{100}\right] + \left[\frac{\{g \times (h+i)\}}{100}\right] + \left[\frac{\{j \times (k+l)\}}{100}\right]$$

gdje je:

a - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+$(%)
b - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)
c - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$(%)
d - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+$(%)
e - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)
f - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$(%)
g - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-$(%)
h - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)
i - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$(%)
k - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-$ (%)
j - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)
l - $CD3^+CD16^-CD4^-CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$(%)

F) Udio (%) αβT limfocita koji eksprimiraju molekulu CD4 ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$\left[\frac{\{\mathbf{a} \times (\mathbf{b}+\mathbf{c})\}}{\mathbf{100}}\right] + \left[\frac{\{\boldsymbol{d} \times (\boldsymbol{e}+\boldsymbol{f})\}}{\mathbf{100}}\right]$$

gdje je:

a - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+$(%)
b - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)
c - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$(%)
d - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-$(%)
e - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)
f - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^-TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$(%)

G) Udio (%) αβT limfocita koji eksprimiraju molekule CD4 i CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^+$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$\boldsymbol{a} \times \left(\frac{\boldsymbol{b}+\boldsymbol{c}}{\mathbf{100}}\right)$$

gdje je:

a - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+$
b - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)
c - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^-$(%)

H) Udio (%) αβT limfocita koji eksprimiraju molekule CD4, CD8α i SLA-DR ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$\boldsymbol{a} \times \frac{\boldsymbol{b}}{\mathbf{100}}$$

gdje je:

a - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+$(%)
b - $CD3^+CD16^-CD4^+CD8\alpha^+TCR\text{-}\delta^-SLA\text{-}DR^+$(%)

I) Udio (%) αβT limfocita koji eksprimiraju molekulu CD4, a ne eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^-$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$\boldsymbol{a} \times \left(\frac{\boldsymbol{b}+\boldsymbol{c}}{\mathbf{100}}\right)$$

gdje je:

a - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{+}CD8\alpha^{-}$
b - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{+}CD8\alpha^{-}TCR\text{-}\delta^{-}SLA\text{-}DR^{+}$(%)
c - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{+}CD8\alpha^{-}TCR\text{-}\delta^{-}SLA\text{-}DR^{-}$(%)

J) Udio (%) αβT limfocita koji eksprimiraju molekule CD4 i SLA-DR, a ne eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^{+}CD16^{-}TCR\text{-}\gamma\delta^{-}CD4^{+}CD8\alpha^{-}SLA\text{-}DR^{+}$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$a \times \frac{b}{100}$$

gdje je:

a - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{+}CD8\alpha^{-}$(%)
b - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{+}CD8\alpha^{-}TCR\text{-}\delta^{-}SLA\text{-}DR^{+}$(%)

K) Udio (%) αβT limfocita koji ne eksprimiraju molekulu CD4, a eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^{+}CD16^{-}TCR\text{-}\gamma\delta^{-}CD4^{-}CD8\alpha^{+}$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$a \times \left(\frac{b + c}{100}\right)$$

gdje je:

a - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{-}CD8\alpha^{+}$
b - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{-}CD8\alpha^{+}TCR\text{-}\delta^{-}SLA\text{-}DR^{+}$(%)
c - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{-}CD8\alpha^{+}TCR\text{-}\delta^{-}SLA\text{-}DR^{-}$(%)

L) Udio (%) αβT limfocita koji ne eksprimiraju molekulu CD4, a eksprimiraju molekule CD8α i SLA-DR ($CD3^{+}CD16^{-}TCR\text{-}\gamma\delta^{-}CD4^{-}CD8\alpha^{+}SLA\text{-}DR^{+}$) u T limfocitima izračunava se na sljedeći način:

$$a \times \frac{b}{100}$$

gdje je:

a - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{-}CD8\alpha^{+}$(%)
b - $CD3^{+}CD16^{-}CD4^{-}CD8\alpha^{+}TCR\text{-}\delta^{-}SLA\text{-}DR^{+}$(%)

4.3.4. Statistička obrada rezultata

Rezultati mjerenja odabranih populacija leukocita i limfocita, subpopulacija T limfocita i hematoloških parametara obrađeni su statističkim programom Stata 13.1 (STATA Corp., SAD). Statistička značajnost opaženih razlika apsolutnih i relativnih vrijednosti odabranih populacija leukocita, apsolutnih vrijednosti hematoloških parametara te relativnih vrijednosti odabranih populacija limfocita i subpopulacija T limfocita između skupina životinja provjerena je analizom varijance (ANOVA). Opažene razlike apsolutnih i relativnih vrijednosti odabranih populacija leukocita, apsolutnih vrijednosti hematoloških parametara te relativnih vrijednosti odabranih populacija limfocita i subpopulacija T limfocita između vremenskih sljedova unutar iste skupine provjerene su analizom varijance za ponavljajuće uzorke (*Repeated measures* ANOVA).

Pomoću t-testa međusobno su uspoređene apsolutne i relativne vrijednosti odabranih populacija leukocita, apsolutnih vrijednosti hematoloških parametara te relativnih vrijednosti odabranih populacija limfocita i subpopulacija T limfocita između svih skupina životinja prilikom svakog uzimanja uzoraka. Sparenim t-testom međusobno su uspoređene apsolutne i relativne vrijednosti odabranih populacija leukocita, apsolutnih vrijednosti hematoloških parametara te relativne vrijednosti odabranih populacija limfocita i subpopulacija T limfocita dobiveni između svakog pojedinog uzimanja uzorka u svakoj kupini.

Statistička usporedba rezultata varijabli koje nisu udovoljavale kriterijima normalne razdiobe provedena je Kruskall Wallis testom.

Rezultati statističke usporedbe izraženi su pomoću p vrijednosti, a statistički značajnim su smatrane p vrijednosti manje od 0,05 ($p < 0,05$).

5. REZULTATI

5.1. Zdravstveni nadzor životinja u pokusu

Sve svinje su tijekom pokusa pokazivale apetit i prohtjev za vodom primjeren dobi, odnosno fazi tova. Sve životinje su bile odgovarajuće kondicije i niti u jedne životinje nisu primijećeni simptomi poremećaja dišnog i probavnog sustava, kao niti druga odstupanja od fiziološkog stanja. Tijekom pokusa također nisu primijećene lokalne reakcije na mjestu primjene cjepiva i/ili imunomodulatora. Izmet i mokraća bili su normalnog izgleda.

5.2. Serumska protutijela za gE i gB SHV-1

Prvi dan pokusa nijedna svinja nije imala serumska protutijela za gB SHV-1 (R = 0,797 do 1,210) i gE SHV-1 (R = 0,713 do 1,000).
Sedmi dan pokusa nijedna svinja također nije imala serumska protutijela za gB SHV-1 (R = 0,870 do 1,1427) i gE SHV-1 (R = 0,704 do 1,120).
Jedanaesti dan pokusa sve svinje u I., III. i V. skupini imale su serumska protutijela za gB SHV-1 (R = 0,281 do 0,588), dok u II., IV. i VI. skupini nijedna svinja nije imala serumska protutijela za gB SHV-1 (R = 0,757 do 1,136). Jedanaesti dan pokusa nijedna svinja nije imala serumska protutijela za gE SHV-1 (R = 0,706 do 1,070).
Osamnaesti dan pokusa sve svinje u I., III. i V. skupini također su imale serumska protutijela za gB SHV-1 (R = 0,169 do 0,464), dok u II., IV. i VI. skupini nijedna svinja nije imala serumska protutijela za gB (R = 0,746 do 0,999). Osamnaesti dan pokusa nijedna svinja nije imala serumska protutijela za gE SHV-1 (R = 0,870 do 1,040).

5.3. Rezultati hematoloških pretraga

Rezultati kompletne krvne slike izraženi su kao srednje vrijednosti i standardne devijacije srednje vrijednosti apsolutnog broja leukocita, eritrocita i trombocita u litri periferne krvi, koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi, hematokrita, prosječnog volumena eritrocita (engl. *Mean Corpuscular Volume*, MCV), prosječne mase hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin*, MCH) i prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (engl. *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration*, MCHC) za pojedine skupine tijekom pokusa te su prikazani u Tablici 5. (apsolutni broj leukocita u perifernoj krvi), odnosno na Slikama 1., 2., 3., 4., 5., 6. i 7. (apsolutni broj eritrocita i trombocita u perifernoj krvi, koncentracija hemoglobina u perifernoj krvi, hematokrit, MCV, MCH i MCHC).

Za navedene rezultate prikazani su i rezultati statističke usporedbe.

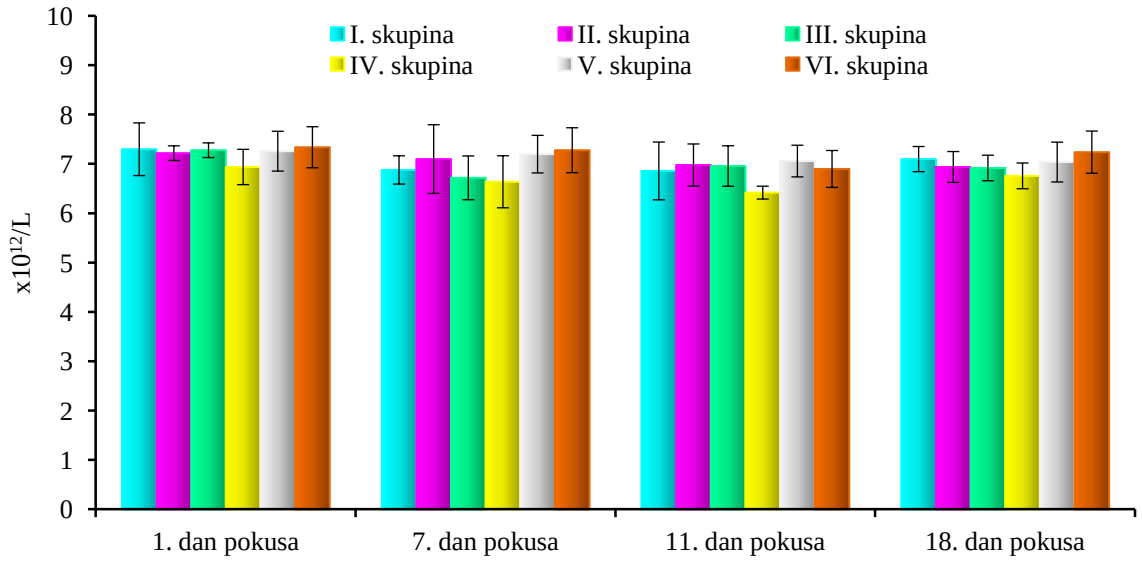
Tablica 5. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi (x 10^9/L) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi (x 10^9/L ± SD*)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	24,52 ± 1,31	22,24 ± 1,50 [a]	21,36 ± 3,33 [a]	19,16 ± 2,80 [a]
II.	19,60 ± 2,62	20,58 ± 4,79	19,34 ± 3,19	18,16 ± 3,77
III.	22,02 ± 3,33	18,10 ± 1,25	19,20 ± 3,50	17,38 ± 1,95
IV.	19,90 ± 5,29	18,70 ± 2,37	21,82 ± 1,65	20,08 ± 3,14
V.	22,89 ± 2,75	22,04 ± 1,74	19,84 ± 1,80 [a, b]	19,08 ± 2,02
VI.	22,14 ± 3,34	20,88 ± 2,97	21,08 ± 3,44	23,36 ± 4,58

* standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 1. dan pokusa u istoj skupini
[b] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 7. dan pokusa u istoj skupini

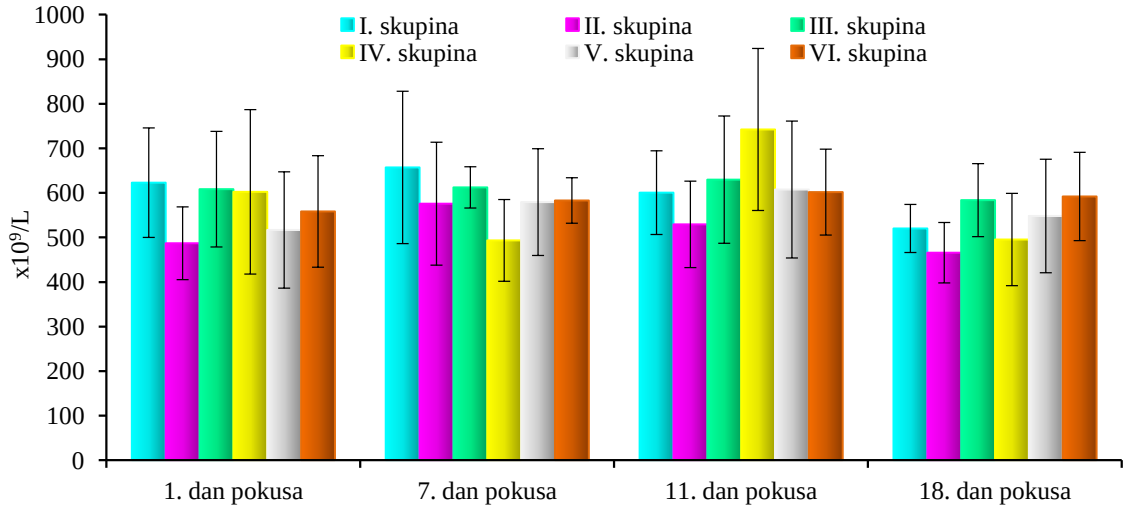
U većini skupina nisu utvrđene statistički značajne promjene srednje vrijednosti apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi (Tablica 5.) između pojedinih dana vađenja krvi. U I. skupini je sedmog, jedanaestog i osamnaestog dana srednja vrijednost apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi bila statistički značajno manja u odnosu na prvi dan ($p = 0,036$, $p = 0,044$, odnosno $p = 0,025$). U V. skupini je srednja vrijednost apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi jedanaestog dana bila statistički značajno manja u odnosu na prvi ($p = 0,025$) i sedmi ($p = 0,016$) dan. Međutim, niti jednog dana vađenja krvi nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti apsolutnog broja leukocita u leukocitima periferne krvi između pojedinih skupina.

U svim skupinama je između prvog i jedanaestoga dana utvrđen pad srednje vrijednosti apsolutnog broja eritrocita u perifernoj krvi (Slika 1.). Između jedanaestog i osamnaestog dana je u nekim skupinama uslijedio porast srednje vrijednosti apsolutnog broja eritrocita, dok je u nekima ostala na istoj razini. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti apsolutnog broja eritrocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.



Slika 1. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti apsolutnog broja eritrocita u perifernoj krvi ($x10^{12}$/L) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

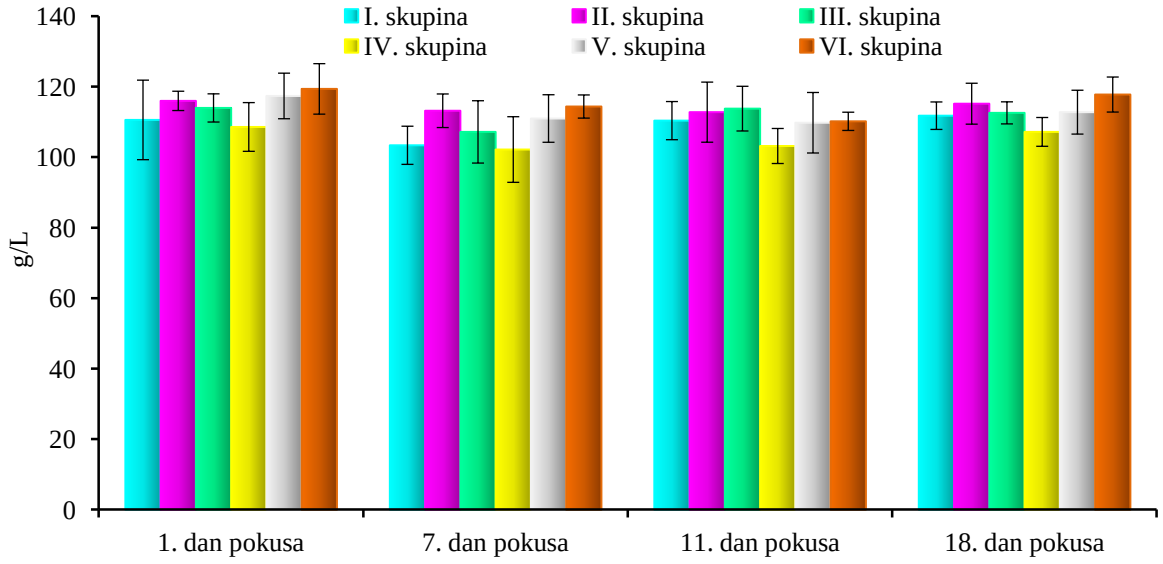
Dinamika srednje vrijednosti apsolutnog broja trombocita u perifernoj krvi (Slika 2.) razlikovala se između skupina tijekom pokusa. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti apsolutnog broja trombocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.



Slika 2. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti apsolutnog broja trombocita u perifernoj krvi ($x10^{9}$/L) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

U svim skupinama je između prvog i sedmog dana pokusa utvrđen pad srednje vrijednosti koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi (Slika 3.), koji se u VI. skupini nastavio i između

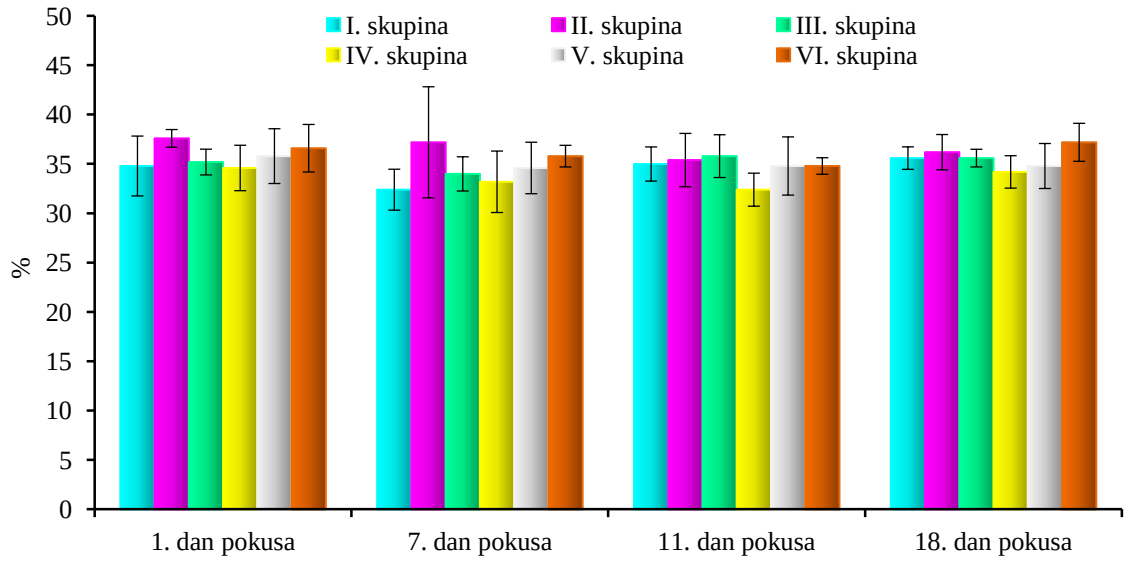
sedmog i jedanaestog dana. Međutim, u svim skupinama je osamnaestog dana srednja vrijednost koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi bila na sličnoj razini kao i prvog dana. Također, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.



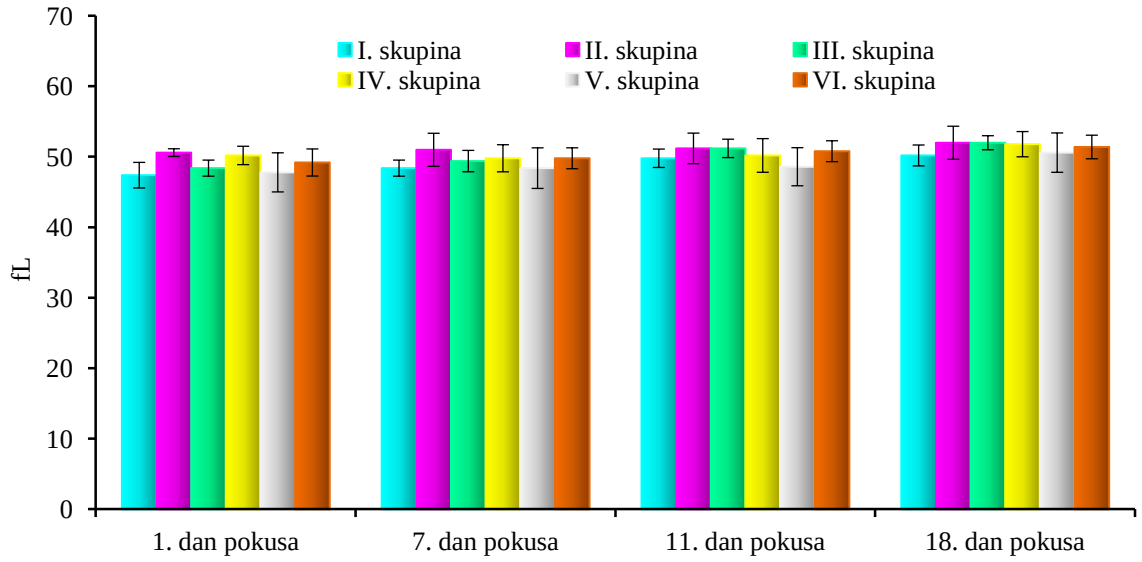
Slika 3. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti koncentracije hemoglobina u krvi (g/L) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

U svim skupinama je utvrđen manji pad srednje vrijednosti hematokrita (Slika 4.) između prvog i sedmog i/ili jedanaestog dana. Međutim, u svim skupinama je osamnaestog dana srednja vrijednost hematokrita bila na sličnoj razini kao prvog dana.
Također, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti hematokrita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

U svim skupinama je tijekom pokusa utvrđen manji, ali kontinuirani porast srednje vrijednosti MCV (Slika 5.). Nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti MCV između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

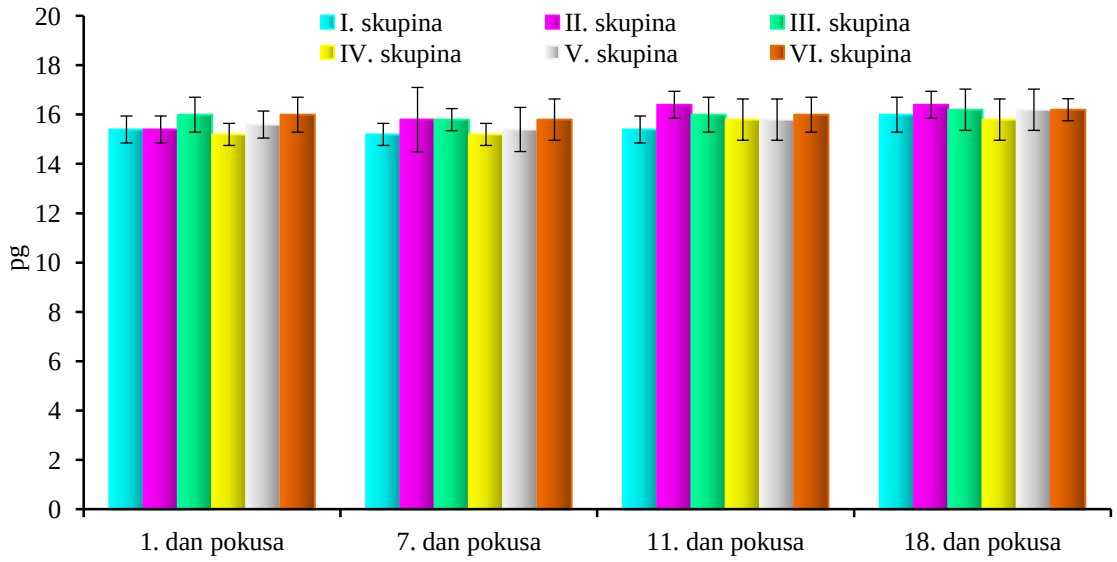


Slika 4. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti hematokrita (%) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi



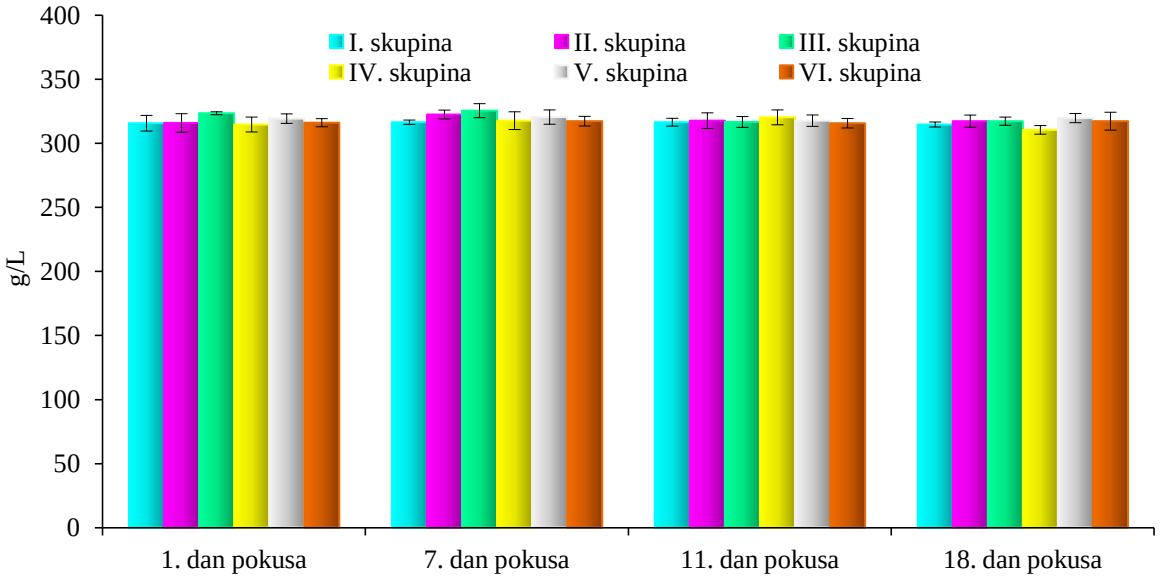
Slika 5. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti MCV (fL) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

U svim skupinama je između prvog i osamnaestog dana utvrđen manji porast srednje vrijednosti MCH (Slika 6.). Također, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti MCH između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.



Slika 6. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti MCH (pg) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Dinamika srednje vrijednosti MCHC (Slika 7.) razlikovala se između skupina tijekom pokusa. Međutim, u svim skupinama je osamnaestog dana srednja vrijednosti MCHC bila na sličnoj razini kao prvog dana. Nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti MCHC između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.



Slika 7. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti MCHC (g/L) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Rezultati diferencijalne krvne slike izraženi su kao srednje vrijednosti i standardne devijacije srednje vrijednosti udjela segmentiranih neutrofila, limfocita i eozinofila u leukocitima periferne krvi za pojedine skupine tijekom pokusa i prikazani su u Tablicama 6., 7. i 8.

Za navedene rezultate prikazani su i rezultati statističke usporedbe.

Udjeli monocita i bazofila u leukocitima periferne krvi su u svih svinja tijekom pokusa bili vrlo mali (između 0% i 2%) te stoga srednje vrijednosti tih rezultata nisu prikazani. U nijedne svinja tijekom pokusa nisu utvrđeni nesegmentirani neutrofili te stoga rezultati za udjele tih leukocita također nisu prikazani.

Tablica 6. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela segmentiranih neutrofila u leukocitima periferne krvi (%) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	**Srednja vrijednost udjela segmentiranih neutrofila u leukocitima periferne krvi (% ± SD*)**			
	1. dan pokusa	**7. dan pokusa**	**11. dan pokusa**	**18. dan pokusa**
I.	32,40 ± 6,35	32,60 ± 10,74	30,20 ± 8,26	30,80 ± 6,83
II.	29,20 ± 10,43	31,80 ± 5,81	32,40 ± 5,08	32,20 ± 5,26
III.	35,80 ± 9,39	38,40 ± 5,60	34,80 ± 2,68	38,80 ± 10,73
IV.	32,20 ± 2,59	26,20 ± 4,82	34,60 ± 6,23	36,20 ± 11,82
V.	32,40 ± 7,23	33,40 ± 8,39	43,00 ± 5,87 [a]	32,60 ± 6,58
VI.	28,80 ± 8,17	26,80 ± 6,46	39,60 ± 6,73 [a, b]	31,60 ± 3,58

* standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno veće ($p < 0,05$) u odnosu na 1. dan pokusa u istoj skupini
[b] statistički značajno veće ($p < 0,05$) u odnosu na 7. dan pokusa u istoj skupini

U većini skupina nisu utvrđene statistički značajne promjene srednje vrijednosti udjela segmentiranih neutrofila u leukocitima periferne krvi (Tablica 6.) između pojedinih dana pokusa. Samo je u V. i VI. skupini jedanaestog dana srednja vrijednost udjela segmentiranih neutrofila u leukocitima periferne krvi bila statistički značajno veća u odnosu na prvi dan ($p = 0,010$, odnosno $p = 0,001$), a u VI. skupini i u odnosu na sedmi dan ($p = 0,001$). Međutim, i u tim skupinama je osamnaestog dana srednja vrijednost udjela segmentiranih neutrofila u leukocitima periferne krvi bila slična kao i prvog dana. Niti jednog dana vađenja krvi nisu

utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela segmentiranih neutrofila u leukocitima periferne krvi između pojedinih skupina.

Tablica 7. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela limfocita u leukocitima periferne krvi (%) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi.

Skupina	Srednja vrijednost udjela limfocita u leukocitima periferne krvi (% ± SD*)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	65,60 ± 7,23	66,00 ± 11,11	66,80 ± 6,34 [a, b]	67,20 ± 6,30
II.	67,60 ± 10,24	66,40 ± 4,04	65,80 ± 5,17 [a]	66,40 ± 4,72
III.	61,40 ± 9,71	60,60 ± 6,35	62,00 ± 3,67	57,60 ± 12,74
IV.	67,00 ± 2,45	70,00 ± 3,54	62,40 ± 8,50 [a]	61,60 ± 11,08
V.	63,80 ± 7,50	65,00 ± 8,43	54,40 ± 3,85	65,80 ± 7,66
VI.	65,20 ± 6,22	69,40 ± 6,03	58,40 ± 6,23 [c, d]	64,40 ± 3,21

* standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno veće ($p < 0,05$) u odnosu na V. skupinu
[b] statistički značajno veće ($p < 0,05$) u odnosu na VI. skupinu
[c] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 1. dan pokusa u istoj skupini
[d] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 7. dan pokusa u istoj skupini

U I., II. i III. skupini tijekom pokusa nisu utvrđene veće promjene srednje vrijednosti udjela limfocita u leukocitima periferne krvi (Tablica 7.), kao niti u IV., V. i VI. skupini između prvog i sedmog dana. Međutim, u IV., V. i VI. skupini je između sedmog i jedanaestog dana utvrđen veći pad srednje vrijednosti udjela limfocita u leukocitima periferne krvi, koji je samo u VI. skupini bio statistički značajan ($p = 0,024$), kao i između prvog i jedanaestog dana ($p = 0,033$). Jedanaestog dana je srednja vrijednost udjela limfocita u leukocitima periferne krvi u VI. skupini također bila statistički značajno manja u odnosu na I. skupinu ($p = 0,033$), a u V. skupini statistički značajno manja u odnosu na I. skupinu ($p = 0,003$), II. skupinu ($p = 0,005$) i IV. skupinu ($p = 0,041$). Dok je osamnaestog dana srednja vrijednost udjela limfocita u leukocitima periferne krvi u V. i VI. skupini ponovno bila slična kao i prvog dana, u IV. skupini je ona ostala na istoj razini kao i jedanaestog dana.

U prvih pet skupina nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela limfocita u leukocitima periferne krvi između pojedinih dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih skupina prvog, sedmog i osamnaestog dana.

Tablica 8. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela eozinofila u leukocitima periferne krvi (%) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi.

Skupina	Srednja vrijednost udjela eozinofila u leukocitima periferne krvi (% ± SD*)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	1,80 ± 1,92	1,20 ± 1,10	1,80 ± 1,48	1,60 ± 0,89
II.	2,20 ± 1,48	1,40 ± 0,89	1,60 ± 1,14	1,20 ± 0,84
III.	2,00 ± 1,41	0,80 ± 0,84	1,80 ± 1,92	2,20 ± 1,64
IV.	0,80 ± 0,84	2,00 ± 2,12	1,40 ± 1,34	1,80 ± 1,30
V.	1,80 ± 0,84	1,00 ± 1,22	2,00 ± 1,58	1,40 ± 1,14
VI.	2,40 ± 1,14	2,40 ± 2,70	1,60 ± 1,14	2,20 ± 1,10

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Dinamika srednje vrijednosti udjela eozinofila u leukocitima periferne krvi (Tablica 8.) razlikovala se između skupina tijekom pokusa. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela eozinofila u leukocitima periferne krvi između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Rezultati apsolutnog broja neutrofila i limfocita u perifernoj krvi izraženi su kao srednje vrijednosti i standardne devijacije srednje vrijednosti za pojedine skupine tijekom pokusa i prikazani su u Tablicama 9. i 10.

Za navedene rezultate prikazani su i rezultati statističke usporedbe.

Iako je dinamika srednje vrijednosti apsolutnog broja segmentiranih neutrofila u perifernoj krvi tijekom pokusa u pojedinim skupinama bila različita (Tablica 9.), niti u jednoj skupini nisu utvrđene statistički značajne razlike između pojedinih dana vađenja krvi. Statistički značajne razlike srednje vrijednosti apsolutnog broja segmentiranih neutrofila u perifernoj krvi također nisu utvrđene između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi.

Tablica 9. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti apsolutnog broja segmentiranih neutrofila u perifernoj krvi (x 10^9/L) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost apsolutnog broja segmentiranih neutrofila u perifernoj krvi (x 10^9/L ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	7,94 ± 1,58	7,20 ± 2,24	6,45 ± 2,13	5,86 ± 1,24
II.	5,59 ± 1,69	6,59 ± 2,13	6,24 ± 1,29	5,78 ± 1,16
III.	8,01 ± 2,98	6,92 ± 0,86	6,72 ± 1,49	6,81 ± 2,34
IV.	6,41 ± 1,85	4,95 ± 1,28	7,51 ± 1,25	7,50 ± 3,40
V.	7,52 ± 2,39	7,41 ± 2,18	8,54 ± 1,49	6,32 ± 1,88
VI.	6,49 ± 2,49	5,71 ± 2,00	8,52 ± 2,72	7,37 ± 1,72

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Tablica 10. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi (x 10^9/L) po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi (x 10^9/L ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	16,09 ± 2,01	14,73 ± 3,08	14,30 ± 2,81	12,92 ± 2,55
II.	13,36 ± 3,14	13,64 ± 3,09	12,77 ± 2,68	12,10 ± 2,86
III.	13,39 ± 2,23	11,01 ± 1,70	11,90 ± 2,30	9,94 ± 2,12
IV.	13,32 ± 3,46	13,04 ± 1,21	13,68 ± 2,58	12,15 ± 1,58
V.	14,48 ± 1,22	14,26 ± 1,57	10,78 ± 1,15 [a, b, c]	12,44 ± 0,62 [a]
VI.	14,35 ± 1,87	14,43 ± 1,84	12,15 ± 0,93	15,04 ± 2,99

* standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 1. dan pokusa u istoj skupini
[b] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 7. dan pokusa u istoj skupini
[c] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 18. dan pokusa u istoj skupini

U prvih pet skupina je između prvog i osamnaestog dana pokusa utvrđen pad srednje vrijednosti apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi (Tablica 10.). Samo u V. skupini je taj pad bio i statistički značajan ($p = 0,013$). U V. skupini je srednja vrijednost apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi također bila statistički značajno manja i jedanaestog dana, ali ne

samo u odnosu na prvi dan (p = 0,001), već i u odnosu na sedmi (p = 0,013) i osamnaesti (p = 0,018) dan. Jedino je u VI. skupini srednja vrijednosti apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi osamnaestog dana bila veća u odnosu na prvi dan. Međutim, niti jednog dana vađenja krvi nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi između pojedinih skupina.

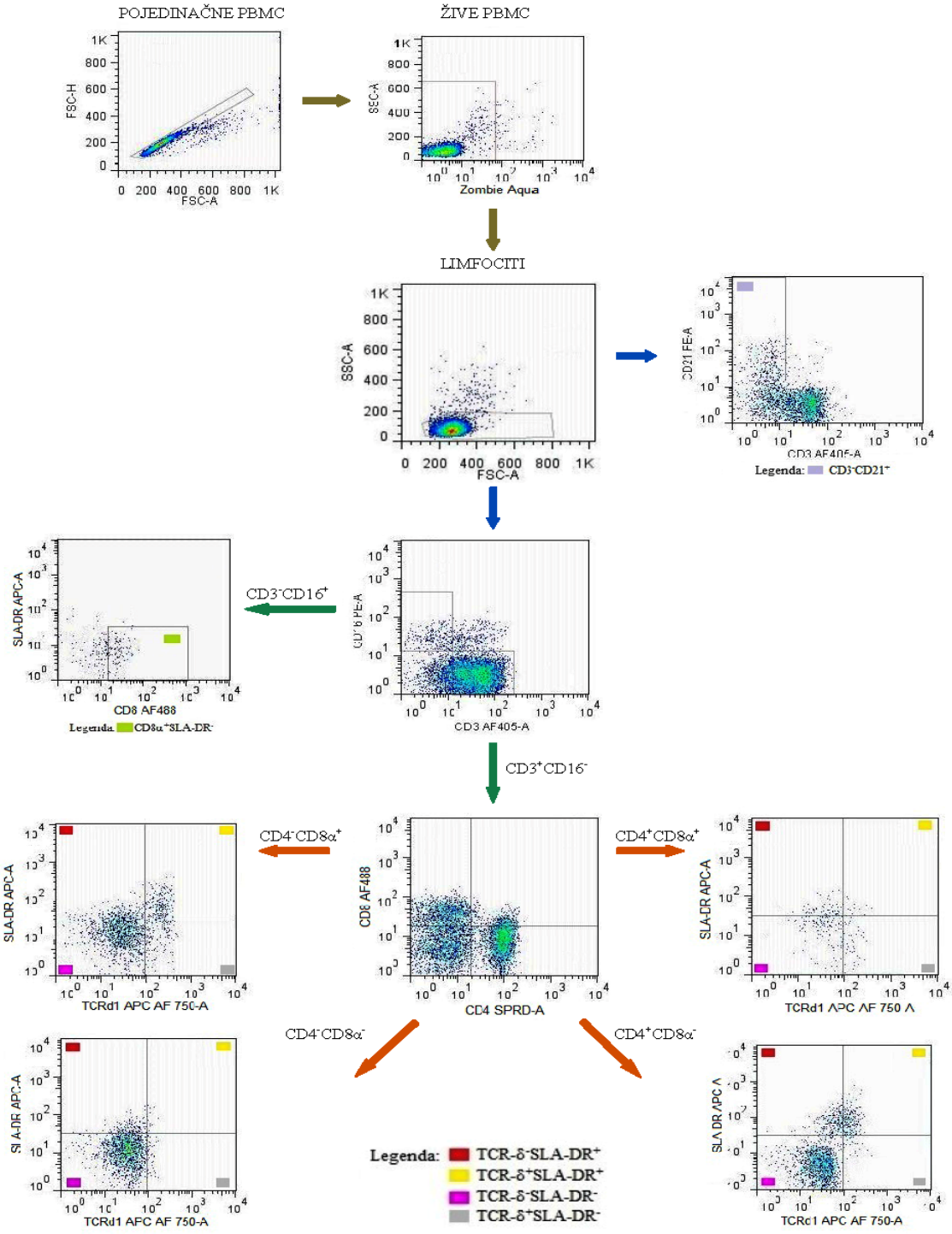
5.4. Fenotip T i B limfocita te NK stanica periferne krvi

Rezultati analize protočnim citometrom izraženi su kao srednje vrijednosti i standardne devijacije srednje vrijednosti udjela T limfocita, B limfocita i NK stanica u limfocitima periferne krvi te udjela pojedinih populacija i subpopulacija T limfocita u T limfocitima periferne krvi za pojedine skupine tijekom pokusa i prikazani su u Tablicama 11., 12., 13., 14., 15., 16., 17., 18., 19., 20., 21., 22., 23. i 24. Na Slici 8. prikazana je strategija analize fenotipa T limfocita, B limfocita i NK stanica.

Za sve navedene rezultate prikazani su i rezultati statistički usporedbe.

Srednja vrijednost udjela T limfocita u limfocitima periferne krvi (Tablica 11.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 78,6%. Tijekom pokusa niti u jednoj skupini nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela T limfocita između pojedinih dana vađenja krvi iako je u svim skupinama osamnaestog dana srednja vrijednost udjela T limfocita bila veća u odnosu na prvi dan. Također, niti jednog dana vađenja krvi nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela T limfocita između pojedinih skupina.

Srednja vrijednost udjela B limfocita u limfocitima periferne krvi (Tablica 12.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 5,93%. Dinamika srednje vrijednosti udjela B limfocita je u svim skupinama bila slična tijekom cijelog pokusa, odnosno porast između prvog i sedmog dana, pad između sedmog i jedanaestog dana i ponovno porast između jedanaestog i osamnaestog dana. Samo je u IV. skupini utvrđen pad srednje vrijednosti udjela B limfocita između jedanaestog i osamnaestog dana. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela B limfocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.



Slika 8. Strategija analize fenotipa limfocita periferne krvi s obzirom na ekspresiju molekula CD3 (CD3 AF 405 - Alexa Fluor® 405), CD21 (CD21 PE), CD16 (CD16 PE), CD4 (CD4 SPRD), CD8α (CD8α AF488), TCR-δ (TCR-δ APC AF750) i SLA-DR (SLA II APC). Za analizu su obuhvaćene pojedinačne PBMC na temelju FSC-H (engl. *Forward Scatter-Hight)* i FSC-A (engl. *Forward Scatter-Area*) i žive PBMC (obilježene sa Zombie Aqua™) koje odgovaraju limfocitima na temelju SSC-A (engl. *Side Scatter*) i FSC-A.

Tablica 11. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela T limfocita ($CD3^+CD16^-$) u limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela T limfocita u limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	78,84 ± 4,80	78,04 ± 7,49	80,66 ± 4,75	83,08 ± 2,17
II.	79,24 ± 4,32	81,64 ± 3,63	81,54 ± 6,11	79,54 ± 7,99
III.	76,38 ± 5,89	78,10 ± 7,38	76,70 ± 7,15	80,06 ± 6,35
IV.	81,06 ± 4,14	83,92 ± 3,18	82,92 ± 2,80	84,46 ± 4,15
V.	77,34 ± 5,43	73,24 ± 7,14	75,28 ± 8,74	78,54 ± 5,99
VI.	78,74 ± 5,33	77,94 ± 7,27	79,92 ± 5,43	82,18 ± 2,41

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Tablica 12. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela B limfocita ($CD3^-CD21^+$) u limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela B limfocita u limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	5,66 ± 4,23	9,74 ± 4,57	5,10 ± 2,37	6,54 ± 1,22
II.	5,75 ± 2,92	7,82 ± 2,30	4,79 ± 3,15	4,57 ± 1,47
III.	6,29 ± 3,37	7,43 ± 1,21	4,59 ± 0,89	7,28 ± 3,44
IV.	5,24 ± 1,71	5,40 ± 2,39	6,13 ± 2,11	4,65 ± 1,76
V.	6,56 ± 3,65	10,53 ± 5,70	8,66 ± 5,63	10,01 ± 5,75
VI.	6,11 ± 3,02	9,87 ± 3,29	4,96 ± 1,84	6,13 ± 2,78

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Srednja vrijednost udjela NK stanica u limfocitima periferne krvi (Tablica 13.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 2,73%. U svim skupinama je utvrđen pad srednje vrijednosti udjela NK stanica između prvog i osamnaestog dana pokusa, iako je u I. i III. skupini utvrđen prolazni porast između sedmog i jedanaestog dana. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela NK stanica između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Tablica 13. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela NK stanica ($CD3^{-}CD16^{+}CD8\alpha^{+}SLA\text{-}DR^{-}$) u limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela NK stanica u limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	2,61 ± 0,51	1,72 ± 0,59	2,01 ± 0,41	1,54 ± 0,26
II.	2,12 ± 1,02	1,34 ± 0,59	1,25 ± 0,42	0,82 ± 0,52
III.	3,37 ± 3,01	1,79 ± 0,79	2,67 ± 2,16	2,36 ± 1,09
IV.	2,81 ± 1,53	1,84 ± 1,74	1,16 ± 0,52	1,28 ± 0,95
V.	3,05 ± 1,34	2,92 ± 1,38	2,00 ± 0,60	1,42 ± 0,99
VI.	2,44 ± 1,18	1,74 ± 0,70	1,85 ± 0,73	2,05 ± 1,23

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Tablica 14. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela γδT limfocita ($CD3^{+}CD16^{-}TCR\text{-}\gamma\delta^{+}CD4^{-}$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	10,12 ± 2,43	14,05 ± 2,53	21,17 ± 7,23	14,02 ± 6,78
II.	13,97 ± 5,42	12,35 ± 5,11	21,01 ± 4,59	11,22 ± 4,38
III.	13,57 ± 4,09	20,28 ± 2,36	24,76 ± 4,71	18,41 ± 6,40
IV.	12,00 ± 1,82	17,07 ± 6,22	20,36 ± 8,16	16,89 ± 6,29
V.	13,21 ± 3,71	16,22 ± 3,70	19,38 ± 4,78	15,40 ± 3,85
VI.	14,38 ± 5,24	16,19 ± 6,26	18,38 ± 5,81	14,94 ± 4,91

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Srednja vrijednost udjela γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 14.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 12,88%. Dinamika srednje vrijednosti udjela γδT limfocita je u svim skupinama bila slična tijekom cijelog pokusa, odnosno porast između prvog i jedanaestog dana i pad između jedanaestog i osamnaestog dana. Također nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela γδT limfocita između pojedinih

skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Tablica 15. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela γδT limfocita koji eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^+CD4^-CD8\alpha^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela $CD8\alpha^+$ γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	7,93 ± 2,11	10,84 ± 2,33	16,33 ± 5,34	10,72 ± 5,35
II.	11,57 ± 5,60	9,97 ± 4,51	14,08 ± 4,04	8,63 ± 4,28
III.	9,43 ± 3,52	14,53 ± 3,44	18,22 ± 4,94	15,40 ± 6,03
IV.	9,22 ± 1,78	9,92 ± 3,47	14,14 ± 6,21	13,05 ± 5,16
V.	8,58 ± 2,79	12,23 ± 3,54	13,52 ± 4,90	12,28 ± 2,76
VI.	10,64 ± 4,91	12,60 ± 7,64	13,45 ± 5,03	11,70 ± 5,73

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Dinamika srednje vrijednosti udjela $CD8\alpha^+$ γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 15.) je u svim skupinama bila slična tijekom cijelog pokusa, odnosno porast između prvog i jedanaestog dana te pad između jedanaestog i osamnaestog dana. Također nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD8\alpha^+$ γδT limfocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Dinamika srednje vrijednosti udjela $CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 16.) razlikovala se između pojedinih skupina tijekom pokusa. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ γδT limfocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Tablica 16. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela γδT limfocita koji eksprimiraju molekule CD8α i SLA-DR ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^+CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela $CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	3,04 ± 1,84	3,95 ± 1,41	3,98 ± 1,02	4,48 ± 3,12
II.	4,02 ± 1,20	4,31 ± 1,77	3,40 ± 1,38	2,91 ± 1,41
III.	3,59 ± 1,73	3,17 ± 1,88	4,69 ± 2,26	3,83 ± 1,58
IV.	3,77 ± 0,68	3,47 ± 1,69	4,29 ± 1,67	3,87 ± 2,16
V.	3,38 ± 1,77	3,28 ± 1,92	3,47 ± 1,28	4,14 ± 2,62
VI.	4,19 ± 1,99	4,09 ± 3,35	2,04 ± 0,45	4,22 ± 2,68

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Srednja vrijednost udjela αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 17.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 82,81%. Dinamika srednje vrijednosti udjela αβT limfocita je u svim skupinama bila slična tijekom cijelog pokusa, odnosno pad između prvog i jedanaestog dana te porast između jedanaestog i osamnaestog dana. Također nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela αβT limfocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Tablica 17. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela αβT limfocita ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	86,87 ± 3,11	80,40 ± 2,65	74,54 ± 7,88	81,40 ± 8,80
II.	81,00 ± 6,39	80,63 ± 6,99	75,06 ± 6,12	84,58 ± 5,15
III.	82,02 ± 4,83	73,52 ± 2,74	68,45 ± 5,51	75,54 ± 8,73
IV.	83,48 ± 3,36	75,73 ± 4,85	77,17 ± 7,26	78,95 ± 6,33
V.	82,43 ± 5,02	78,18 ± 5,69	74,94 ± 5,49	79,21 ± 4,75
VI.	81,03 ± 5,96	78,75 ± 8,53	77,72 ± 6,41	81,10 ± 6,84

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Tablica 18. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela αβT limfocita koji eksprimiraju molekulu CD4 ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela $CD4^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	24,85 ± 6,38	25,24 ± 4,72	19,13 ± 5,14	23,50 ± 4,94
II.	24,78 ± 4,26	22,92 ± 3,22	15,07 ± 4,87	22,00 ± 5,77
III.	25,85 ± 6,91	24,78 ± 3,72	21,47 ± 4,38	21,88 ± 3,89
IV.	25,14 ± 4,55	24,46 ± 6,41	21,64 ± 6,89	18,57 ± 3,38
V.	25,70 ± 4,36	24,81 ± 5,31	20,23 ± 5,69	21,79 ± 5,83
VI.	24,52 ± 4,84	20,19 ± 4,34	19,18 ± 3,10	20,83 ± 5,16

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Srednja vrijednost udjela $CD4^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 18.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 25,14%. Između prvog i jedanaestog dana pokusa je u svim skupinama utvrđen pad srednje vrijednosti udjela $CD4^+$ αβT limfocita, a između jedanaestog i osamnaestog dana u većini skupina manji ili veći porast. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD4^+$ αβT limfocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Između prvog i jedanaestog dana pokusa u svim skupinama utvrđen je pad srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^-$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 19.), koji je samo u II. skupini bio i statistički značajan ($p = 0,007$). Između jedanaestog i osamnaestog dana u većini skupina utvrđen je manji ili veći porast srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^-$ αβT limfocita. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^-$ αβT limfocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi u I., III., IV., V. i VI. skupini.

Tablica 19. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela αβT limfocita koji eksprimiraju molekulu CD4, a ne eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^-$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^-$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	22,81 ± 6,73	16,08 ± 7,83	16,51 ± 5,04	22,25 ± 5,09
II.	22,49 ± 4,67	17,65 ± 4,75	12,40 ± 3,12 [a]	18,08 ± 3,90
III.	23,88 ± 6,72	22,30 ± 3,16	18,62 ± 3,50	19,30 ± 3,81
IV.	23,09 ± 4,69	22,20 ± 6,90	19,22 ± 7,06	16,78 ± 3,86
V.	23,29 ± 3,45	21,87 ± 4,29	17,82 ± 4,86	17,82 ± 4,86
VI.	22,34 ± 5,16	16,49 ± 5,53	17,32 ± 2,92	18,25 ± 4,96

* standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na 1. dan pokusa u istoj skupini

Tablica 20. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela αβT limfocita koji eksprimiraju molekule CD4 i SLA-DR, a ne eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi(% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	1,38 ± 0,41	1,88 ± 0,59	1,63 ± 1,47	0,75 ± 0,40
II.	1,39 ± 0,92	1,78 ± 1,63	0,88 ± 0,73	0,88 ± 0,75
III.	1,50 ± 1,08	1,57 ± 0,57	1,24 ± 0,65	0,62 ± 0,44
IV.	1,44 ± 0,67	1,42 ± 0,86	0,89 ± 0,65	0,42 ± 0,29
V.	1,48 ± 0,95	1,96 ± 1,68	1,15 ± 0,92	0,41 ± 0,09
VI.	1,42 ± 0,70	1,11 ± 0,73	0,72 ± 0,19	0,37 ± 0,46

* standardna devijacija srednje vrijednosti

Dinamika srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 20.) je između prvog i sedmog dana pokusa u pojedinim skupinama bila različita. Međutim, između sedmog i osamnaestog dana u svim skupinama je utvrđen pad srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita i u većini skupina je srednja vrijednost udjela navedene subpopulacije T limfocita već jedanaestog dana bila ispod početne vrijednosti. Nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita između pojedinih skupina niti jednog dana vađenja krvi, kao niti između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina.

Tablica 21. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela αβT limfocita koji eksprimiraju molekule CD4 i CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	**Srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)**			
	1. dan pokusa	**7. dan pokusa**	**11. dan pokusa**	**18. dan pokusa**
I.	2,04 ± 1,87	9,15 ± 7,41	2,62 ± 1,91	1,25 ± 0,20
II.	2,30 ± 0,73	6,81 ± 4,87	2,67 ± 2,38	3,91 ± 3,15
III.	1,97 ± 0,32	2,48 ± 0,73 [a]	2,84 ± 1,99	2,58 ± 0,61
IV.	2,05 ± 1,26	2,26 ± 2,25 [a]	2,42 ± 0,65	1,79 ± 0,61
V.	2,41 ± 1,21	3,03 ± 1,36 [a]	2,40 ± 1,18	2,07 ± 1,48
VI.	2,18 ± 0,92	2,61 ± 0,94 [a]	1,86 ± 0,44	2,59 ± 1,31

* standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na I. skupinu

Srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 21.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 2,16%. Iako je između prvog i sedmog dana pokusa u svim skupinama utvrđen porast srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita, taj porast je bio najizraženiji u I. i II. skupini. Štoviše, srednja vrijednost udjela navedene subpopulacije T limfocita je sedmog dana u I. skupini bila statistički značajno veća u odnosu na III. skupinu ($p = 0,011$), IV. skupinu ($p = 0,009$), V. skupinu ($p = 0,018$) i VI. skupinu ($p = 0,012$). Između sedmog i osamnaestog dana pokusa dinamika srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita bila je različita u pojedinim skupinama. Međutim, nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita

između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina, kao niti između pojedinih skupina prvog, jedanaestog i osamnaestog dana.

U većini skupinama je između prvog i sedmog dana pokusa utvrđen porast srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 22.). Srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita je sedmog dana u I. skupini bila statistički značajno veća u odnosu na IV. skupinu ($p = 0,012$), dok je istog dana srednja vrijednost udjela navedene subpopulacije T limfocita u II. skupini bila statistički značajno veća u odnosu na III. skupinu ($p = 0,039$) i IV. skupinu ($p = 0,007$). Između sedmog i osamnaestog dana u svim skupinama je utvrđen pad srednje vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita. U svim skupinama je taj pad kontinuiran, osim u III. i IV. skupini u kojima je između sedmog i jedanaestog dana utvrđen prolazni porast srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita. Nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina, kao niti između pojedinih skupina prvog, jedanaestog i osamnaestog dana.

Tablica 22. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela udjela αβT limfocita koji eksprimiraju molekule CD4, CD8α i SLA-DR ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-$ $CD4^+CD8\alpha^+$ $SLA\text{-}DR^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	**Srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD [*])**			
	1. dan pokusa	**7. dan pokusa**	**11. dan pokusa**	**18. dan pokusa**
I.	0,67 ± 0,91	0,87 ± 0,35	0,68 ± 0,36	0,27 ± 0,06
II.	0,48 ± 0,25	0,91 ± 0,42	0,41 ± 0,31	0,43 ± 0,50
III.	0,40 ± 0,19	0,48 ± 0,26 [a]	0,76 ± 0,76	0,39 ± 0,20
IV.	0,38 ± 0,16	0,33 ± 0,22 [a, b]	0,59 ± 0,37	0,22 ± 0,16
V.	0,61 ± 0,37	0,71 ± 0,36	0,63 ± 0,51	0,39 ± 0,31
VI.	0,50 ± 0,19	0,53 ± 0,20	0,33 ± 0,13	0,21 ± 0,19

[*] standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na II. skupinu
[b] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na I. skupinu

Tablica 23. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela αβT limfocita koji ne eksprimiraju molekulu CD4, a eksprimiraju molekulu CD8α ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^-CD8\alpha^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	Srednja vrijednost udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)			
	1. dan pokusa	7. dan pokusa	11. dan pokusa	18. dan pokusa
I.	13,67 ± 3,73	26,55 ± 14,65	11,07 ± 5,85	10,98 ± 3,43
II.	13,42 ± 3,25	21,92 ± 10,83	10,03 ± 5,96	9,34 ± 2,47
III.	13,02 ± 2,92	10,66 ± 1,45 [a, b]	10,65 ± 3,74	10,70 ± 1,85
IV.	12,84 ± 4,70	9,76 ± 6,41 [a, b]	9,60 ± 2,09	8,44 ± 2,35
V.	13,52 ± 3,17	14,18 ± 2,73 [a]	9,78 ± 0,35	9,72 ± 3,06
VI.	14,21 ± 2,90	14,80 ± 3,12 [a]	12,70 ± 5,29	12,29 ± 2,35

* standardna devijacija srednje vrijednosti
[a] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na I. skupinu
[b] statistički značajno manje ($p < 0,05$) u odnosu na II. skupinu

Srednja vrijednost udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 23.) za sve skupine svinja prvog dana pokusa bila je 13,45%. Osim što je dinamika srednje vrijednosti udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita između prvog i sedmog dana pokusa u pojedinim skupinama bila različita, također je bila i statistički značajna. Sedmog dana srednja vrijednosti udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita je u I. i II. skupini bila statistički značajno veća u odnosu na III. skupinu ($p = 0,005$, odnosno $p = 0,038$) i IV. skupinu ($p = 0,003$, odnosno $p = 0,026$), a u I. skupini i u odnosu na V. skupinu ($p = 0,023$) i VI. skupinu ($p = 0,031$). Jedanaestog dana srednja vrijednosti udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita bila je slična u svim skupinama i u svim skupinama je ostala na sličnoj razini i osamnaestog dana. Nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita između pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina, kao niti između pojedinih skupina prvog, jedanaestog i osamnaestog dana.

Između prvog i sedmog dana pokusa dinamika srednje vrijednosti udjela $CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi (Tablica 24.) je u pojedinim skupinama bila različita. Međutim, između sedmog i osamnaestog dana u svim skupinama utvrđen je pad srednje vrijednosti udjela navedene subpopulacije T limfocita. Nisu utvrđene statistički značajne razlike srednje vrijednosti udjela $CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita između

pojedinih dana vađenja krvi unutar istih skupina, kao niti između pojedinih skupina prvog, jedanaestog i osamnaestog dana.

Tablica 24. Srednja vrijednost i standardna devijacija srednje vrijednosti udjela αβT limfocita koji ne eksprimiraju molekulu CD4, a eksprimiraju molekule CD8α i SLA-DR ($CD3^+CD16^-$ TCR-$\gamma\delta^-CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$) u T limfocitima periferne krvi po skupinama u pokusu i danima vađenja krvi

Skupina	**Srednja vrijednost udjela $CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβ-T limfocita u T limfocitima periferne krvi (% ± SD *)**			
	1. dan pokusa	**7. dan pokusa**	**11. dan pokusa**	**18. dan pokusa**
I.	2,75 ± 0,99	4,45 ± 4,90	2,26 ± 1,19	1,60 ± 1,10
II.	2,59 ± 2,61	3,40 ± 1,53	1,27 ± 1,05	0,89 ± 0,47
III.	2,19 ± 0,69	1,65 ± 0,58	1,92 ± 1,01	0,99 ± 0,51
IV.	2,34 ± 1,37	1,44 ± 1,04	1,45 ± 0,71	0,74 ± 0,49
V.	2,40 ± 1,61	2,35 ± 1,72	1,54 ± 0,94	0,80 ± 0,50
VI.	2,46 ± 1,31	1,63 ± 0,75	1,17 ± 0,53	0,88 ± 0,65

* standardna devijacija srednje vrijednosti

6. RASPRAVA

U istraživanju učinka imunomodulatora mikrobnog podrijetla na staničnu imunost u svinja nakon cijepljenja atenuiranim cjepivom protiv BA praćeno je i opće zdravstveno stanje te pokazatelji u krvi važni za provjeru zdravstvenog stanja životinja tijekom pokusa.

Referentne vrijednosti kompletne i diferencijalne krvne slike svinja razlikuju se obzirom na izvore te dob i pasmine svinja. Stoga su rezultati kompletne i diferencijalne krvne slike za svinje križane pasmine u ovom pokusu uspoređeni s referentnim vrijednostima koji su sadržavali najpotpunije podatke (apsolutne i relativne) i koji se nisu odnosili samo na pojedine pasmine svinja.

Rezultati apsolutnog broja eritrocita u perifernoj krvi ne ukazuju na poremećaj zdravstvenog stanja svinja tijekom pokusa budući da je u svim skupinama srednja vrijednost njihovog apsolutnog broja bila unutar raspona fizioloških vrijednosti, koji je prema podatcima iz literature (THORN, 2010.; ANONIMNO, 2012b.) 5 - 8 $x10^{12}$/L.

Smanjena koncentracija hemoglobina u krvi i smanjeni hematokrit mogu biti posljedica gubitka krvi ili nedostatka željeza. Iako je u svim skupinama utvrđen prolazni pad srednjih vrijednosti hematokrita i koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi, niti u jednoj skupini tijekom cijelog pokusa navedene vrijednosti nisu bile ispod doljnjih fizioloških vrijednosti, koje su prema podatcima iz literature 32%, odnosno 100 g/L (THORN, 2010.; ANONIMNO, 2012b.). Stoga je navedeni pad hematokrita i koncentracije hemoglobina u krvi svinja u pokusu vrlo vjerojatno bio posljedica utjecaja stresa prilikom vađenja krvi.

U svim skupinama tijekom cijelog pokusa srednje vrijednosti prosječne mase hemoglobina u eritrocitu (MCH) bile su unutar raspona fizioloških vrijednosti. Suprotno tome, srednje vrijednosti prosječne koncentracije hemoglobina u eritrocitu (MCHC) su tijekom cijelog pokusa u svim skupinama bile ispod doljnje fiziološke vrijednosti, kao i srednje vrijednosti prosječnog volumena eritrocita (MCV) u većini skupina prvog i sedmog dana. Prema podatcima iz literature za svinje (THORN, 2010.; ANONIMNO, 2012b.) raspon fizioloških vrijednosti za MCHC je 300 - 340 g/L, za MCH 17 - 21 pg, a za MCV 50 - 68 fL. Smanjeni MCHC, MCV i MCH, zajedno sa smanjenim brojem eritrocita i hematokritom te smanjenom koncentracijom hemoglobina u krvi mogu biti posljedica anemije uzrokovane nedovoljnim unosom željeza nakon prasenja (LIPIŃSKI i sur., 2010.; GODYŃ i sur., 2016.). S obzirom da su rezultati većine skupina sa smanjenim MCV i MCH bili blizu fizioloških vrijednosti, te da su srednje vrijednosti apsolutnog broja eritrocita, koncentracije hemoglobina u perifernoj krvi, hematokrita te MCHC tijekom cijelog pokusa bile unutar referentnih vrijednosti, može se pretpostaviti da smanjeni MCV i MCH u nekih skupina i pojedinih dana pokusa nisu bili posljedica nedovoljnog unosa željeza nakon prasenja. U prilog tome su i

rezultati dobiveni u istraživanju VENTRELLA i sur. (2017.) prema kojima su neke svinje križanih pasmina u dobi od 30 dana, nakon što su unutar 72 sata nakon prasenja primile nadomjestak željeza, imale manji MCV (do 32,4 fL) i MCH (do 9,1 pg) nego svinje u našem pokusu.

Iako se referentne vrijednosti za neke hematološke parametre svinja razlikuju u literaturi, navedene razlike za većinu pokazatelja nisu toliko izražene kao što je to za apsolutni broj trombocita u krvi. Primjerice, fiziološki raspon apsolutnog broja trombocita u krvi svinja prema podatcima ANONIMNO (2012b.) je 200 - 500 x 10^9/L, odnosno 325 - 715 x 10^9/L prema podatcima THORN (2010.). Budući da vrijednosti hematoloških parametara svinja mogu varirati ovisno o dobi, pasmini, spolu, prehrani i načinu uzgoja (THORN, 2010.), rezultati apsolutnog broja trombocita u krvi svinja u ovom pokusu uspoređeni su s rasponom fizioloških vrijednosti oba navedena izvora. Iako je srednja vrijednost apsolutnog broja trombocita u krvi svinja u svim skupinama bila unutar referentnih vrijednosti tijekom cijelog pokusa, povećani apsolutni broj trombocita u krvi (> 715 x 10^9/L) imalo je ukupno 13 od 30 svinja iz različitih skupina (rezultati za pojedine svinje nisu prikazani). Povećani apsolutni broj trombocita u krvi (trombocitoza) može biti potaknuta fiziološkim ili patološkim mehanizmima. Fiziološka trombocitoza je posljedica otpuštanja rezervnih trombocita iz slezene u cirkulaciju i uzrokovana je adrenalinom. Poznata su dva tipa patološke trombocitoze, odnosno primarna ili esencijalna i sekundarna ili reaktivna trombocitoza. Primarna trombocitoza u ljudi povezana je s kroničnim mijeloproliferativnim bolestima i karakterizirana je povećanim apsolutnim brojem trombocita u krvi kroz duže razdoblje. U životinja je primarna trombocitoza istraživana samo u pasa i mačaka, i nije sa sigurnošću dokazana. U životinja je najčešće opisana sekundarna trombocitoza koju uzrokuju poremećaji imunosnog sustava, kao što je sinteza citokina u slučaju upale, infekcije i tumora, te kronična krvarenja i nedostatak željeza (THORN, 2010.; JOHNS, 2014.; CONSTABLE i sur., 2017.). Mogućnost primarne trombocitoze te sekundarne trombocitoze uzrokovane tumorima mogu se isključiti u našem pokusu s obzirom na dob životinja i veliki broj životinja s povećanim apsolutnim brojem trombocita u krvi, koji je utvrđen samo jedan dan tijekom pokusa. Utvrđena trombocitoza vjerojatno ne ukazuje ni na nedostatak željeza jer je ta mogućnost isključena ranije. Većina svinja (deset od jedanaest) koje su nakon početka pokusa (sedmi ili jedanaesti dan) imale povećani apsolutni broj trombocita u krvi, pripadale su skupinama kojima su primijenjeni cjepivo i/ili imunomodulatori. S obzirom da je ranije spomenuto kako je trombocitopoeza u slučaju sekundarne trombocitoze najčešće uzrokovana citokinima i da su svinjama iz prvih pet skupina primijenjeni mikroorganizmi koji mogu potaknuti imunosni

sustav i sintezu citokina, razlog povećanog apsolutnog broja trombocita u krvi svinja u pokusu vjerojatno je primjena cjepiva i/ili imunomodulatora. Također je moguće da su povećanom apsolutnom broju trombocita u krvi svinja u pokusu pridonijeli gubitak krvi (vađenje krvi) i stres zbog obuzdavanje životinja (otpuštanje rezervnih trombocita iz slezene u cirkulaciju izazvano adrenlinom).

U svim skupinama srednja vrijednost apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi svinja bila je unutar fizioloških vrijednosti tijekom većine trajanja pokusa, uključujući i skupine u kojih je osamnaestog i/ili jedanaestog dana utvrđen statistički značajan pad u odnosu na prvi dan. Prema podatcima iz literature raspon fizioloških vrijednosti apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi svinja je 11 - 22 x 10^9/L (THORN, 2010.; ANONIMNO, 2012b.). Međutim, prvog dana pokusa srednja vrijednost apsolutnog broja leukocita u perifernoj krvi svinja u četiri od šest skupina bila je veća ili jednaka gornjoj fiziološkoj vrijednosti, kao i u negativnoj kontrolnoj skupini na kraju pokusa. Leukocitozu mogu uzrokovati upale, infekcije, alergije ili bolesti hematopoetskog sustava. Međutim, može se pretpostaviti da povećani apsolutni broj leukocita u većini skupina prvog dana pokusa te u negativnoj kontrolnoj skupini na kraju pokusa nije bio posljedica navedenih bolesti ili poremećaja, s obzirom da je srednja vrijednost apsolutnog broja najzastupljenijih populacija leukocita (segmentiranih neutrofila i limfocita) u perifernoj krvi svinja u svim skupinama tijekom cijelog pokusa bila unutar raspona fizioloških vrijednosti, 2 - 15 x 10^9/L, odnosno 3,8 - 16,5 x 10^9/L, prema dostupnim literaturnim podatcima. Tome ide u prilog i činjenica da kliničkim pregledom nisu utvrđena odstupanja od fiziološkog stanja svinja tijekom cijelog pokusa. Iako apsolutne vrijednosti monocita, eozinofila i bazofila u leukocitima periferne krvi svinja u ovom pokusu nisu određene, prvog dana i tijekom cijelog pokusa udjeli bazofila i monocita u svih svinja te srednja vrijednost udjela eozinofila u svih skupina bili su blizu doljnjih fizioloških vrijednosti, koje prema podatcima iz literature iznose 2%, 0,5%, odnosno 0% (THORN, 2010.; ANONIMNO, 2012b.). Stoga vjerojatno ni njihove apsolutne vrijednosti nisu bile povećane. Iako je jedanaestog dana pokusa u skupini kojoj je primijenjeno samo cjepivo utvrđen statistički značajan pad apsolutnog broja limfocita u perifernoj krvi u odnosu na prvi i sedmi dan, u istoj skupini je osamnaestog dana utvrđen porast, iako još uvijek ispod početne vrijednosti. Međutim, srednja vrijednost apsolutnog broja limfocita u skupini kojoj je primijenjeno samo cjepivo tijekom cijelog pokusa bila je unutar fizioloških vrijednosti, kako je već navedeno. Također, u dostupnoj literaturi nema podataka o imunosupresivnom djelovanju SHV-1 u svinja, uključujući i za soj Bartha.

Srednja vrijednost udjela segmentiranih neutrofila u leukocitima periferne krvi je u svim skupinama tijekom cijelog pokusa bila unutar raspona fizioloških vrijednosti, koji je prema podatcima iz literature 28 - 47% (THORN, 2010.; ANONIMNO, 2012b.), uključujući i skupine u kojih je jedanaestog dana utvrđen statistički značajan porast u odnosu na prvi dan. Dobiveni rezultati apsolutnog broja leukocita, segmentiranih neutrofila i limfocita u perifernoj krvi, kao i udjela segmentiranih neutrofila i limfocita u leukocitima uspoređeni su s referentnim vrijednostima koje su navedene za svinje neovisno o njihovoj dobi. U skladu s tim podatcima srednja vrijednost udjela limfocita u većini skupina prvog dana pokusa (pet od šest skupina) i na kraju pokusa (četiri od šest skupina) bila je iznad gornje fiziološke vrijednosti, koja je 62% prema podatcima THORN (2010.) te ANONIMNO (2012b.). Međutim, neki autori (CARR, 2013.) ukazuju da prasad i tovljenici mogu imati veći apsolutni broj leukocita i limfocita u perifernoj krvi od odraslih svinja te da tovljenici mogu imati veći apsolutni broj leukocita (32,9 x 10^9/L) i limfocita (18,5 x 10^9/L) u perifernoj krvi u odnosu na ranije spomenute najveće referentne vrijednosti. No ni navedene vrijednosti ne objašnjavaju velike udjele limfocita u velikog broja svinja tijekom ovog pokusa. Međutim, slične vrijednosti udjela limfocita imala je većina svinja u svim skupinama tijekom cijelog pokusa i to je u skladu s rezultatima istraživanja SIPOS i sur. (2005.) koji su pokazali da udio limfocita u leukocitima periferne krvi svinja u dobi između 3,5 i 4 mjeseca života može biti veći i od 70%.

Za pokus su izabrane svinje koje prethodno nisu bile cijepljene protiv BA i koje nisu podrijetlom od krmača cijepljenih protiv BA. To je potvrđeno serološkom pretragom budući da nijedna svinja prvog dana pokusa nije imala serumska protutijela za gB i gE SHV-1. U pokusu su serumska protutijela za gB SHV-1 dokazana samo u cijepljenih svinja od jedanaestog dana pokusa, odnosno od sedmog dana nakon cijepljenja. U skladu s antigenskim svojstvima cjepnog virusa (nedostatak gE), u svinja iz cijepljenih skupina nije došlo do sinteze protutijela za gE SHV-1. Svinje iz necijepljenih skupina ostale su seronegativne za gB i gE SHV-1 do kraja pokusa što ukazuje da barem tijekom prvih jedanaest dana nije došlo do prirodne infekcije svinja sa SHV-1.

U svrhu ovog istraživanja učinaka cjepiva i/ili imunomodulatora na staničnu imunost svinja uspoređeni su udjeli funkcionalno najvažnijih populacija i subpopulacija limfocita periferne krvi između pojedinih pokusnih skupina, ali i unutar istih skupina tijekom trajanja pokusa. Međutim, srednje vrijednosti udjela nekih od navedenih stanica za sve skupine prvog dana pokusa (prije primjene cjepiva i/ili imunomodulatora) uspoređene su i s rezultatima

ranijih istraživanja za svinje slične dobi, budući da fiziološke vrijednosti za navedene stanice nisu određene kao za diferencijalnu i kompletnu krvnu sliku svinja.

U ovom pokusu je uzeta u obzir samo populacija T limfocita koja pripada stanicama stečene imunosti jer je u perifernoj krvi svinja također dokazana populacija $CD3^+$ limfocita s funkcionalnim obilježjima T limfocita i NK stanica (MAIR i sur., 2016.). S obzirom da te stanice većinom eksprimiraju molekulu CD16, „čisti“ T limfociti u našem istraživanju su fenotipski definirani kao $CD3^+CD16^-$ limfociti. Srednja vrijednost udjela T limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja za sve skupine prvog dana pokusa bila je u skladu s podatcima STEPANOVA i sur. (2007.) za svinje držane u uobičajenim farmskim uvjetima, u dobi jedan i šest mjeseci (62,8%, odnosno 96,9%). Iako su u navedenom istraživanju T limfociti fenotipski definirani kao ukupni $CD3^+$ limfociti, a u našem istraživanju kao $CD3^+CD16^-$ limfociti, u oba slučaja su njihovi udjeli u ukupnim limfocitima bili slični te su stoga rezultati navedenih autora za pojedine populacije i subpopulacije T limfocita poslužili i za kasniju usporedbu. Također, u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.) primijenjen je i drugačiji klon monoklonskog protutijela za molekulu CD3 (8E6) nego u našem istraživanju (klon PPT3), ali oba klona su mišja monoklonska protutijela izotipa IgG1 koja prepoznaju epitop na ε molekuli CD3 svinja (YANG i sur., 1996.; PESCOVITZ i sur., 1998.). Budući da biljeg B limfocita svinja nije poznat, oni su u našem istraživanju fenotipski definirani kao limfociti koji ne eksprimiraju biljeg T limfocita i eksprimiraju molekulu CD21 ($CD3^-CD21^+$). Iako molekula CD21 nije specifična samo za B limfocite može se s velikom vjerojatnošću pretpostaviti da su PBMC svinja u limfocitnoj „ogradi” koje eksprimiraju molekulu CD21 B limfociti jer tu molekulu u svinja još eksprimiraju folikularne dendritične stanice koje su prisutne u limfnim čvorovima (PIRIOU-GUZYLACK i SALMON, 2008.; DAY i SCHULTZ, 2013a.). U perifernoj krvi svinja također nisu utvrđene dendritične stanice koje eksprimiraju CD21 (SUMMERFIELD i sur., 2003.). Prvog dana pokusa srednja vrijednost udjela B limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja za sve skupine bila je slična kao i za svinje križane pasmine slične dobi u istraživanju TERZIĆ i sur. (2002.), odnosno 6,9%. S obzirom da biljeg NK stanica svinja nije poznat, kao ni za B limfocite, NK stanice u našem istraživanju su fenotipski definirane na temelju kombinacije molekula CD3, CD8α i CD16 i SLA-DR, kao $CD3^-CD16^+CD8\alpha^+$SLA-DR^- stanice. Stanice NK se od T limfocita mogu razlikovati po tome što ne eksprimiraju molekulu CD3, od monocita, makrofaga i dendritičnih stanica periferne krvi po tome što eksprimiraju molekulu CD8, a od B limfocita po tome što eksprimiraju molekule CD16 i CD8 (PIRIOU-GUZYLACK i SALMON, 2008.; GERNER i sur., 2009.). Iako NK stanice svinja mogu eksprimirati molekulu SLA-DR, kao i T limfociti,

B limfociti, monociti, makrofagi i dendritične stanice (PIRIOU-GUZYLACK i SALMON, 2008.), istraživanje TALKER i sur. (2013.) je pokazalo da NK stanica koje eksprimiraju molekulu SLA-DR u perifernoj krvi svinja, u jednakoj dobi kao u našem istraživanju, nema. Istraživanje MAIR i sur. (2012.) pokazalo je različite udjele NK stanica u ukupnim limfocitima periferne krvi za nešto starije svinje (1 - 24%). Srednja vrijednost udjela NK stanica u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja za sve skupine prvog dana našeg pokusa bila je unutar rezultata u navedenom istraživanju, iako bliže doljnjoj granici.

Novija *in vitro* istraživanja proliferacije PBMC-a nakon imunizacije svinja sa SHV-1 su malobrojna, a broj istraživanja *in vivo* je još manji. Vjerojatno je to posljedica sve manjeg interesa za ovakva istraživanja s obzirom da je BA u većini ekonomski razvijenih zemalja iskorijenjena u domaćih svinja. Dosadašnja istraživanja pokazala su statistički značajno veću *in vitro* proliferaciju PBMC-a (stimulacija sa SHV-1) podrijetlom od svinja potpuno zaštićenih od infekcije virulentnim sojem SHV-1 nego od slabije zaštićenih svinja, nakon što su bile jednokratno (KIMMAN i sur., 1995.) ili dvokratno cijepljene (VAN ROOIJ i sur., 2004.) protiv BA. Međutim, u navedenim istraživanjima udijeli T i B limfocita te NK stanica u proliferiranim PBMC-ima nisu analizirani. U *in vivo* istraživanju DE BRUIN i sur. (1998.) analiziran je udio T limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja cijepljenih s atenuiranim genski modificiranim SHV-1 (gE^-), ali u dostupnoj literaturi nema podataka o *in vivo* učinku cijepljenja ili infekcije svinja sa SHV-1 na udio B limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi. U našem istraživanju jednokratna primjena cjepiva sa živim SHV-1 nije uzrokovala značajne promjene relativnih vrijednosti T i B limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja, kao što nije uzrokovala značajan učinak na relativnu vrijednost T limfocita i u istraživanju DE BRUIN i sur. (1998.). Značaj NK stanica u zaštiti svinja od infekcije sa SHV-1 nije poznat. DE BRUIN i sur. (1997.; 2000a.) su pokazali da NK stanice izdvojene iz periferne krvi svinja necijepljenih, odnosno cijepljenih protiv BA mogu lizirati stanice inficirane sa SHV-1. Jednokratna primjena cjepiva u našem istraživanju nije uzrokovala značajnu promjenu zastupljenosti NK stanica u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja. Međutim, DE BRUIN i sur. (2000a.) su pokazali da je udio NK stanica u limfocitima izdvojenim iz svinja imuniziranih sa SHV-1, bez obzira na uvjete nespecifične (IL-2), odnosno specifične stimulacije (SHV-1) bio manji nego nakon nespecifične stimulacije limfocita izdvojenih iz neimuniziranih svinja.

Poznato je da bakterije iz roda *Propionibacterium* imaju imunostimulacijsko djelovanje (PULVERER i sur., 1985.; ROSZKOWSKI i sur., 1990.) te se samostalno ili u kombinaciji s detoksificiranim LPS-ima bakterije *E. coli* mogu koristiti u prevenciji ili kao

pomoćno sredstvo u liječenju bakterijskih infekcija životinja (BECKER i sur.,1989.; DINSMORE i sur., 1995.; FERRO i sur., 2000a.; 2000b.; DAVIS i sur., 2003.). Također je poznato da inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* ima imunostimulacijsko djelovanje u ljudi, miševa i domaćih životinja (WEBER i sur., 2013.) i da je pokazao povoljno djelovanje u kliničkim pokusima na svinjama (KYRIAKIS i sur., 1998.; BIUK-RUDAN i sur., 2004.), te se stoga primjenjuje domaćim životinjama u terapijske i preventivne svrhe (WEBER i sur., 2013.; DAY i SCHULTZ, 2013f.). BIUK-RUDAN i sur. (2004.) također su uspoređivali učinak zasebne primjene inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* i cjepiva s atenuiranim SHV-1 na T i B limfocite periferne krvi. U tu svrhu praćena je *in vitro* proliferacija na temelju odgovarajuće nespecifične stimulacije (fitoaglutinin za T limfocite i lecitin iz biljke *Phytolacca americana* za B limfocite). U navedenom istraživanju proliferacija T i B limfocita nakon trokratne primjene inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* bila je statistički značajno veća nego nakon dvokratne primjene atenuiranog SHV-1. No nakon infekcije s virulentnim SHV-1, *in vitro* proliferacija T i B limfocita podrijetlom od svinja kojima je primijenjen inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis* bila je manja nego podrijetlom od cijepljenih svinja. Međutim, do sada nije istraživan samostalan učinak inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis*, kao ni samostalan ili kombiniran učinak bakterija iz roda *Propionibacterium* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli*, na udjele T i B limfocita ili NK stanica u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja. U našem istraživanju dvokratna primjena kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli*, odnosno inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis*, nije uzrokovala značajne promjene udjela T i B limfocita te NK stanica u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja, kao ni jednokratna primjena cjepiva.

Do sada u svinja nije istraživan ni učinak zajedničke primjene SHV-1 s inaktiviranim virusom *Parapoxvirus ovis* ili kombinacijom inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* na zastupljenost T i B limfocita te NK stanica u perifernoj krvi. PAPPATERRA MENDOZA i sur. (2000.) su istraživali učinak zajedničke primjene SHV-1 s kombinacijom inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* na *in vitro* proliferaciju PBMC-a svinja nakon specifične restimulacije, ali pri tome nije analizirana zastupljenost pojedinih populacija limfocita. U našem istraživanju jednokratna primjena cjepiva u kombinaciji s dvokratnom primjenom inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* ili dvokratnom primjenom kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* nije uzrokovala značajne promjene udjela T i B limfocita te NK stanica u ukupnim limfocitima periferne krvi svinja. Jedanaestog dana pokusa u svim skupinama kojima je primijenjeno cjepivo došlo je do prolaznog pada srednje

vrijednosti udjela B limfocita što se podudara s pojavnošću serumskih protutijela za gB SHV-1. Iako statistički neznačajno, smanjenje udjela B limfocita vjerojatno je posljedica njihove aktivacije i diferencijacije u plazmablaste koji ne eksprimiraju molekulu CD21 (ŠINKORA i BUTLER, 2009.). Međutim, navedeno smanjenje udjela B limfocita utvrđeno je i u negativnoj kontrolnoj skupini. Iako je u svinja kojima je cjepivo primijenjeno zajedno s pojedinim imunomodulatorom utvrđen prolazni porast srednje vrijednosti udjela NK stanica između sedmog i jedanaestog dana, razlike nisu bile značajne u odnosu na ostale skupine, i u svim skupinama je srednja vrijednost udjela NK stanica sedmog, jedanaestog i osamnaestog dana bila manja u odnosu na prvi dan. Iako je naš pokus trajao samo osamnaest dana, rezultati nisu u suprotnosti s istraživanjima DENYER i sur. (2006.) i TALKER i sur. (2013.) koja ukazuju na pad udjela NK stanica u limfocitima periferne krvi svinja s porastom dobi.

Općenito, udjele pojedinih populacija i subpopulacija T limfocita iz različitih literaturnih navoda teško je uspoređivati zbog korištenja svinja različitih pasmina i dobi. Međutim, većina istraživanja je pokazala da se udio γδT limfocita u limfocitima periferne krvi svinja povećava nakon prasenja te između četvrtog i dvanaestog mjeseca života doseže najveće vrijednosti, nakon čega opada (YANG i PARKHOUSE, 1996.; GERNER i sur., 2009.; TALKER i sur., 2013.; SEDLAK i sur., 2014a.). Srednja vrijednost udjela γδT limfocita ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^+CD4^-$) u T limfocitima periferne krvi za sve skupine prvog dana pokusa bila je manja nego u mlađih i starijih svinja u istraživanjima YANG i PARKHOUSE (1996.) i STEPANOVA i sur. (2007.). U navedenim istraživanjima srednja vrijednost udjela γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja u dobi četiri tjedna i šest mjeseci bila je 29,6% i 69,2% (STEPANOVA i sur., 2007.), odnosno 66,6% i 73,6% (YANG i PARKHOUSE, 1996.). Nepodudarnost rezultata našeg i prethodno navedenih istraživanja vjerojatno je posljedica korištenja zamrznutih, odnosno svježe izdvojenih PBMC-a. Dodatni razlog nepodudarnosti rezultata našeg i istraživanja STEPANOVA i sur. (2007.), osim različite dobi, može biti i taj je što je srednja vrijednost udjela γδT limfocita prvog dana našeg pokusa određena na temelju većeg broja svinja (trideset), a u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.) na temelju četiri svinje. Kao i STEPANOVA i sur. (2007.), YANG i PARKHOUSE (1996.) su udjele subpopulacija T limfocita analizirali u $CD3^+$ limfocitima, dok su u našem istraživanju udjeli subpopulacija T limfocita analizirani u populaciji „čistih„ T limfocita, iz koje su isključeni $CD3^+CD16^+$ limfociti. Razlike naših i rezultata YANG i PARKHOUSE (1996.) mogu biti posljedica i drugačijeg pristupa identifikaciji. U našem istraživanju fenotip γδT limfocita određen je korištenjem monoklonskog protutijela za δ lanac TCR, za razliku od monoklonskog protutijela specifičnog za izoformu molekule CD3 koju eksprimiraju samo γδT

limfociti. Između prvog i jedanaestog dana našeg pokusa utvrđen je porast srednje vrijednosti udjela γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja u svim skupinama Budući da porast udjela γδT limfocita nije bio statistički značajan, vjerojatni razlog je u činjenici da udio γδT limfocita svinja raste tijekom prve godine života (YANG i PARKHOUSE, 1996., GERNER i sur., 2009.; TALKER i sur., 2013.; SEDLAK i sur., 2014a.). Iako je u svim skupinama između jedanaestog i osamnaestog dana utvrđen pad srednje vrijednosti udjela γδT limfocita, u većini skupina (pet skupina) je osamnaestog dana srednja vrijednost udjela navedene populacije bila veća u odnosu na prvi dan, što je također u skladu s rezultatima istraživanja drugih autora.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da γδT limfociti svinja funkcionalno pripadaju stanicama urođene i stečene imunosti, odnosno da imaju sposobnost prezentacije antigena (TAKAMATSU i sur., 2002.), pokazuju citotoksičnost sličnu NK stanicama (YANG i PARKHOUSE, 1997.; DE BRUIN i sur., 1997.; 2000a.; OLIN i sur., 2005.), eksprimiraju TCR (YANG i PARKHOUSE, 1997.; DE BRUIN i sur., 1997.; 2000a.) te da imaju sposobnost diferencijacije u dugoživuće memorijske T limfocite (LEE i sur., 2004.). Međutim, fenotipski je teško razlikovati γδT limfocite s pojedinim imunosnim funkcijama budući da su obje subpopulacije $CD8^+$ γδT limfocita s obzirom na ekspresiju molekule CD2 ($CD2^+CD8^+$ i $CD2^-CD8^+$) pokazale istu funkciju. Tako je za obje navedene subpopulacije γδT limfocita dokazano da imaju funkciju APC-a, da na svojoj površini eksprimiraju molekule SLA II, CD80/86 i CD40, neophodne za uspješnu prezentaciju antigena i aktivaciju (TAKAMATSU i sur., 2002.), te da mogu *in vitro* sintetizirati iste citokine (SEDLAK i sur., 2014a). Stoga ni u našem istraživanju nije bilo moguće povezati pojedine imunosne funkcije γδT limfocita s određenim fenotipom, iako ekspresija molekule CD2 nije analizirana. Također postoje i suprotna mišljenja oko diferencijacije i sazrijevanja γδT limfocita svinja, posebice oko ekspresije molekule CD2. Neki autori smatraju da se $CD2^-CD8\alpha^-$ γδT limfociti većinom sastoje od neaktiviranih (djevičanskih) stanica, $CD2^+CD8\alpha^-$ γδT limfociti od izvršnih/memorijskih stanica, a $CD2^+CD8\alpha^+$ γδT limfociti od terminalno diferenciranih stanica (ŠTĚPÁNOVÁ i ŠINKORA, 2012.; SEDLAK i sur., 2014a.). SEDLAK i sur. (2014b.) su pokazali da $CD2^-$ γδT limfociti svinja nakon *in vitro* stimulacije mogu eksprimirati molekulu CD2. Međutim, to nije u skladu s rezultatima STEPANOVA i SINKORA (2013.) koji su pokazali da *in vitro* stimulirani $CD2^-CD8\alpha^-$ γδT limfociti slabo proliferiraju i ostaju negativni za jednu ili obje molekule. Suprotno tome, *in vitro* stimulirani $CD2^+$ γδT limfociti su značajno proliferirali i eksprimirali molekulu CD8. Stoga su zaključili da su $CD2^+$ i $CD2^-$ γδT limfociti dvije zasebne loze stanica. TALKER i sur. (2013.) su

također pokazali nepromijenjeni odnos između $CD2^+$ i $CD2^-$ γδT limfocita u perifernoj krvi svinja od prasenja do 25. tjedna života. S obzirom da je u većini dosadašnjih istraživanja utvrđeno da $CD8^+$ γδT limfociti u perifernoj krvi svinja uvijek eksprimiraju i molekulu CD2 (YANG i PARKHOUSE, 1996.; TALKER i sur., 2013.; SEDLAK i sur., 2014a.) te da su funkcije γδT limfocita svinja povezane s ekspresijom molekule CD8α, u našem istraživanju nije analizirana ekspresija molekule CD2.

LEE i sur. (2004.) i TAKAMATSU i sur. (2006.). ukazuju na važnu ulogu γδT limfocita u zaštiti svinja od infekcije bakterijom *Mycobacterium bovis*, odnosno virusom slinavke i šapa. Međutim, važnost γδT limfocita za zaštitu svinja od infekcije sa SHV-1 još nije jasno određena. DE BRUIN i sur. (1997.; 2000a.) su pokazali da $CD8\alpha^+$ γδT limfociti periferne krvi necijepljenih i cijepljenih/inficiranih svinja mogu *in vitro* lizirati stanice inficirane sa SHV-1. Nakon specifične *in vitro* stimulacije PBMC-a, udio $CD8^+$ γδT limfocita u ukupnim limfocitima bio je statistički značajno manji kada su svinje bile višekratno inficirane sa SHV-1 nakon cijepljenja protiv BA nego kada su svinje bile jednokratno inficirane nakon cijepljenja (DE BRUIN i sur, 2000a.). U istom istraživanju je, nakon *in vitro* stimulacije PBMC-a s IL-2, udio $CD8^+$ γδT limfocita svinja imuniziranih sa SHV-1 bio manji nego u slučaju neimuniziranih svinja. Specifična *in vitro* restimulacija PBMC-a svinja imuniziranih sa SHV-1 također nije povećala udio $CD8^+$ γδT limfocita u odnosu na nespecifičnu stimulaciju. Iako u istraživanju VAN ROOIJ i sur. (2004.) rezultati udjela $CD6^-$ $CD8^+$ γδT limfocita nisu prikazani, prema komentarima autora treći dan nakon infekcije svinja virulentnim sojem SHV-1 nije utvrđena statistički značajna razlika udjela navedene subpopulacije T limfocita u proliferiranim limfocitima periferne krvi (specifična *in vitro* restimulacija), između životinja koje su bile zaštićene od infekcije i životinja koje su imale vrućicu i izlučivale virus u orofaringealnom ekskretu. Sve svinje su prije infekcije dvokratno cijepljene protiv BA. U našem istraživanju primjena atenuiranog SHV-1 ili u kombinaciji s pojedinim imunomodulatorom također nije uzrokovala značajne promjene udjela $CD8\alpha^+$ γδT limfocita ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^+CD4^-CD8\alpha^+$), ali u T limfocitima periferne krvi svinja i bez *in vitro* manipulacije.

Iako je u ranije navedenim istraživanjima odnosa imunosnih funkcija i fenotipa γδT limfocita svinja, većina γδT limfocita eksprimirala molekulu CD8, neka istraživanja ukazuju na različito podrijetlo ekspresije molekule CD8 na γδT limfocitima. ŠINKORA i sur. (2005.) su pretpostavili da se $CD2^+CD8\alpha^+$ γδT limfociti, koji su ekspresiju molekule CD8α stekli nakon aktivacije na periferiji, mogu razlikovati od $CD2^+CD8\alpha^+$ γδT limfocita podrijetlom iz timusa po ekspresiji molekula SLA II. Primjena cjepiva i/ili imunomodulatora u našem

istraživanju nije značajno promijenila udio $CD8\alpha^+$SLA-DR^+ γδT limfocita ($CD3^+CD16^-$TCR-$\gamma\delta^+CD4^-CD8\alpha^+$SLA-$DR^+$) u T limfocitima periferne krvi svinja. Međutim, s obzirom da je u istim skupinama u kojima je tijekom pokusa utvrđen najveći porast srednje vrijednosti udjela $CD8\alpha^+$ γδT limfocita (cjepivo + pojedini imunomodulator), utvrđen i najveći porast srednje vrijednosti udjela $CD8\alpha^+$SLA-DR^+ γδT limfocita, rezultati ovog pokusa nisu u suprotnosti s pretpostavkom ŠINKORA i sur. (2005.) da je nakon kontakta s antigenom ekspresija molekule CD8α na γδT limfocitima praćena i ekspresijom molekula SLA II. TALKER i sur. (2013.) su utvrdili da nema razlike u ekspresiji molekule SLA-DR (SLA II) na populaciji γδT limfocita periferne krvi svinja ovisno o dobi. U većini ranije navedenih istraživanja odnosa fenotipa i funkcije γδT limfocita svinja ekspresija molekula SLA II nije analizirana pa njihov značaj za imunosne funkcije γδT limfocita nije potpuno jasan, osim što su SLA II^+ γδT limfociti mogli prezentirati antigen pomoćničkim T limfocitima. Iako su ŠINKORA i sur. (2005.) pretpostavili da molekule CD8α i SLA II ostaju trajno eksprimirane na γδT limfocitima nakon aktivacije, STEPANOVA i SINKORA (2013.) su pokazali da γδT limfociti svinja *in vitro* mogu gubiti i stjecati ekspresiju molekule CD8α. Rezultate našeg istraživanja teško je uspoređivati s rezultatima navedenih istraživanja zbog različitih pristupa analizi fenotipa i analize zastupljenosti limfocitnih populacija bez *in vitro* manipulacije. Iako su srednje vrijednosti udjela $CD8\alpha^+$ γδT limfocita i $CD8\alpha^+$SLA-DR^+ γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi osamnaestog dana pokusa u većini skupina bile veće u odnosu na prvi dan, nisu u svim skupinama bile veće u odnosu na sedmi ili jedanaesti dan. Međutim, teško se može pretpostaviti da je gubitak ekspresije molekula CD8α i SLA-DR razlog pada udjela navedenih subpopulacija T limfocita, budući da je između jedanaestog i osamnaestog dana utvrđen i pad udjela ukupnih γδT limfocita (iako su srednje vrijednosti udjela te populacije T limfocita u većini skupina osamnaestog dana također bile veće u odnosu na prvi dan). Razlog pada udjela γδT limfocita i navedenih subpopulacija u perifernoj krvi svinja može biti posljedica migracije iz sustavne cirkulacije u periferne organe kao što su koža i crijeva te u limfatična tkiva (SHEKHAR i sur., 2012.).

Budući da se T limfociti periferne krvi sastoje od dvije populacije, odnosno αβT limfocita i γδT limfocita (ŠINKORA i BUTLER, 2009.; GERNER i sur., 2015.), i da je prvog dana našeg pokusa srednja vrijednost udjela γδT limfocita za sve skupina bila manja nego u svinja slične dobi u drugim istraživanjima, srednja vrijednost udjela αβT limfocita ($CD3^+CD16^-$TCR-$\gamma\delta^-$) za sve skupine prvog dana našeg pokusa očekivano je bila veća nego u drugim istraživanjima. Iako u većini dosadašnjih istraživanja rezultati udjela ukupne populacije αβT limfocita periferne krvi nisu prikazani, već samo rezultati pojedinih

subpopulacija αβT limfocita, na temelju nekih istraživanja moguće je pratiti udio ove populacije. Prema YANG i PARKHOUSE (1996.) srednja vrijednost udjela αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja u dobi četiri tjedna bila je 33,4%, a u dobi četiri mjeseca 26,4%. Prvog dana našeg pokusa srednja vrijednost udjela αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi za sve skupine bila je izrazito veća nego u istraživanju YANG i PARKHOUSE (1996.). Međutim, slično našim rezultatima, STEPANOVA i sur. (2007.) su utvrdili veći udio αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi u vrlo mladih svinja. Iako je u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.) fenotip T limfocita analiziran u perifernoj krvi od samo četiri svinje i srednja vrijednost udjela αβT limfocita nije prikazana izravno, rezultati ukazuju da je srednja vrijednost udjela te populacije u T limfocitima periferne krvi svinja u dobi četiri tjedna iznosila približno 70%. No rezultati navedenog istraživanja ukazuju i da je srednja vrijednost udjela αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja u dobi šest mjeseci (približno 30%) bila izrazito manja nego u svinja prvog dana našeg pokusa. Međutim, u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.) fenotip T limfocita svinja nije analiziran između četvrtog tjedna i šestog mjeseca života pa nije jasno da li je pad αβT limfocita nastupio već do trećeg mjeseca života, odnosno do dobi svinja u našem istraživanju. U većini skupina tijekom pokusa dinamika srednje vrijednosti udjela populacije αβT limfocita u T limfocitima periferne bila je očekivano suprotna dinamici srednje vrijednosti udjela γδT limfocita. Međutim, kao i u slučaju γδT limfocita, nije utvrđen značajan učinak cjepiva i/ili imunomodulatora na udio αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja. Iako u većini istraživanja rezultati udjela $CD4^-$ $CD8\alpha^-$ αβT limfocita u αβT limfocitima periferne krvi svinja nisu prikazani, YANG i PARKHOUSE (1996.) te GERNER i sur. (2009.) su pokazali da navedene subpopulacije T limfocita u perifernoj krvi svinja nema, odnosno da je njen udio vrlo mali. Suprotno istraživanjima navedenih autora, prvog dana pokusa srednja vrijednost udjela $CD4^-CD8\alpha^-$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi za sve skupine iznosila je 48,53%, iako rezultati nisu prikazani izravno. U istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.) srednja vrijednost udjela $CD4^-$ $CD8\alpha^-$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi također nije prikazana izravno, no slično našima, i njihovi rezultati ukazuju na veliku zastupljenost navedene subpopulacije T limfocita u perifernoj krvi prasadi u dobi četiri tjedna (približno 40%). Međutim, funkcija $CD4^-CD8\alpha^-$ αβT limfocita svinja nije poznata (GERNER i sur., 2015.).

Prema ranijim istraživanjima pomoćnički T limfociti svinja usmjereni na antigen prikazan u sklopu SLA II pripadaju $CD4^+$ αβ limfocitima (CHARERNTANTANAKUL i ROTH, 2006.; GERNER i sur., 2009.). Prvog dana našeg pokusa srednja vrijednost udjela $CD4^+$ αβT limfocita ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+$) u T limfocitima periferne krvi za sve skupine

bila je slična kao u mlađih svinja (23%) u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.). Iako je u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.) korišten drugačiji klon monoklonskog protutijela za molekulu CD4 (10.2H2) nego u našem istraživanju (klon 74-12-4), PESCOVITZ i sur. (1994b.) su pokazali da klon 10.2H2 i klon 74-12-4 reagiraju s istim ili vrlo sličnim epitopom na limfocitima svinja. Primjena cjepiva i/ili imunomodulatora u našem istraživanju nije uzrokovala značajne promjene udjela subpopulacije $CD4^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja.

Rezultati većine dosadašnjih istraživanja odnosa fenotipa i funkcije ukazuju da aktivirani i memorijski pomoćnički T limfociti svinja pripadaju $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocitima (SUMMERFIELD i sur., 1996.; OBER i sur., 1998.; SAALMÜLLER i sur., 2002.; REVILLA i sur., 2005a.). Prvog dana našeg pokusa srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi za sve skupine svinja bila je manja nego za svinje slične dobi (13,8%) u istraživanju YANG i PARKHOUSE, (1996.), ali i veća nego u mlađih svinja (0,5%) u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.). U istraživanju potonjih autora srednja vrijednost udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi nije bila značajno veća od one koja je utvrđena prvog dana našeg pokusa, ni u svinja u dobi šest mjeseci. Osim ranije navedene razlike u pripremi uzoraka PBMC-a, dodatni razlog različitih rezultata može biti i taj što su YANG i PARKHOUSE (1996.) koristili drugačiji klon monoklonskog protutijela za molekulu CD8 (11/295/33), od onoga koji je korišten u našem istraživanju (klon 76-2-11).

Većina ranijih istraživanja je potvrdila da se T limfociti svinja koji prepoznaju antigen prikazan u sklopu SLA I (klasični citotoksični T limfociti) fenotipski mogu definirati kao $CD4^-$ αβT limfociti koji eksprimiraju veliku gustoću molekule CD8α (GERNER i sur., 2015.). Iako za $CD4^-$ αβT limfocite svinja koji eksprimiraju malu gustoću molekule CD8α nije dokazano citotoksično djelovanje, u našem istraživanju je analiziran samo fenotip ukupnih $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^-CD8\alpha^+$). Srednja vrijednost udjela subpopulacije $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi za sve skupine svinja prvog dana našeg pokusa bila je ista kao za svinje slične dobi (13,2%, $CD4^-CD8^{+high}$ + $CD4^-CD8^{+low}$) u istraživanju YANG i PARKHOUSE, (1996.) te veća nego u mlađih (7%), ali i starijih (7,9%) svinja u istraživanju STEPANOVA i sur. (2007.).

Dosadašnja istraživanja ukazuju da neki αβT limfociti periferne krvi imaju izraženiju ulogu u zaštiti svinja od infekcije sa SHV-1 nego γδT limfociti. DE BRUIN i sur. (2000a.) su pokazali veći udio $CD4^+CD8^+$ T limfocita u limfocitima periferne krvi svinja nakon višekratnog izlaganja SHV-1, nego nakon manjeg broja izlaganja istom virusu. U istraživanju

VAN ROOIJ i sur. (2004.), provedenom na svinjama cijepljenim i inficiranim sa SHV-1, udio $CD4^+CD8^+$ T limfocita u proliferiranim limfocitima periferne krvi najbolje zaštićenih svinja bio je najveći. Međutim, u tom istraživanju nije u potpunosti utvrđena pozitivna korelacija između udjela navedene subpopulacije T limfocita i zaštite svinja od infekcije jer je zastupljenost $CD4^+CD8^+$ T limfocita u proliferiranim limfocitima svinja iz jedne od nezaštićenih skupina također bila velika. Budući da je navedenim skupinama svinja primijenjeno cjepivo s adjuvansom, iako s različitim oblikom antigena, autori su zaključili da su veliki udjeli subpopulacije kojoj fenotipski pripadaju memorijski pomoćnički T limfociti posljedica učinka adjuvansa, bez obzira da li je bio u kombinaciji s atenuiranim ili inaktiviranim SHV-1. Naše istraživanje je pokazalo da jednokratna primjena atenuiranog SHV-1 bez adjuvansa ne uzrokuje značajnu promjenu udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi. Za razliku od našeg, u navedenim istraživanjima je fenotip T limfocita periferne krvi analiziran nakon većeg broja izlaganja svinja SHV-1, odnosno jednokratno cijepljenje + jednokratna infekcija i jednokratno cijepljenje + trokratna infekcija (DE BRUIN i sur., 2000b.) ili dvokratno cijepljenje + jednokratna infekcija (VAN ROOIJ i sur., 2004.) i što je fenotip T limfocita periferne krvi cijepljenih i/ili inficiranih svinja analiziran nakon specifične *in vitro* restimulacije. U istraživanju DE BRUIN i sur. (1998.) također nije utvrđen učinak jednokratnog cijepljena svinja sa SHV-1 na udio $CD4^+C8\alpha^+$ T limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi, iako u tom istraživanju nije jasno koliko dugo nakon cijepljenja je fenotip T limfocita analiziran. Međutim, slično kao u istraživanju VAN ROOIJ i sur. (2004.), u našem istraživanju je sedmog dana pokusa utvrđen adjuvantni učinak kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* s atenuiranim SHV-1 na udio $CD4^+C8\alpha^+$αβT limfocita, ali u T limfocitima periferne krvi svinja i bez *in vitro* manipulacije.

Iako su *in vitro* istraživanja pokazala porast udjela αβT limfocita kojima fenotipski pripadaju aktivirani i memorijski pomoćnički T limfociti ($CD4^+CD8\alpha^+$) podrijetlom iz periferne krvi svinja višekratno izloženih SHV-1, čini se da je u zaštiti svinja od infekcije značajnija funkcionalna sposobnost tih limfocita od njihove zastupljenosti. Naime, dosadašnja istraživanja su pokazala da klasični citotoksični T limfociti imaju značajniju ulogu od antivirusnih serumskih protutijela u zaštiti svinja od infekcije virulentnim sojevima SHV-1. Za razliku od $CD4^+CD8^+$ T limfocita, VAN ROOIJ i sur. (2004.) su utvrdili pozitivnu korelaciju između subpopulacije kojoj fenotipski pripadaju klasični citotoksični T limfociti ($CD4^-CD8^+$) i zaštite svinja od infekcije svinja s virulentnim SHV-1. Udio $CD4^-CD8^+$ T limfocita u *in vitro* proliferiranim limfocitima periferne krvi potpuno zaštićenih svinja bio je

statistički značajno veći nego u proliferiranim limfocitima najslabije zaštićenih svinja. *In vitro* proliferirani limfociti periferne krvi svinja koje nisu bile potpuno zaštićene, ali u kojih su vrućica i izlučivanje virusa u orofaringelanom sekretu trajali statistički značajno kraće u odnosu na najslabije zaštićene svinje, također su sadržavali veći udio $CD4^-CD8^+$ T limfocita nego proliferirani limfociti najslabije zaštićenih svinja. Suprotno tome, u potpuno zaštićenih svinja nije utvrđen porast serumskih protutijela koja neutraliziraju virus i serumskih protutijela izotipa IgG1 i IgG2 specifičnih za SHV-1 između trećeg i sedmog dana nakon infekcije, kao što je utvrđen u nezaštićenih svinja. ZUCKERMANN i sur. (1998.) također nisu utvrdili pozitivnu korelaciju između titra protutijela i zaštite od infekcije jer su svinje koje su dvokratno i/m cijepljene s atenuiranim SHV-1 imale niži titar serumskih protutijela koja neutraliziraju virus nego svinje dvokratno cijepljene inaktiviranim SHV-1 ili inaktiviranim SHV-1 s adjuvansom (IL-12), iako su bile bolje zaštićene nakon i/n infekcije virulentnin sojem SHV-1 (veći prirast). Naše istraživanje je pokazalo da jednokratna primjena atenuiranog SHV-1 bez adjuvansa ne uzrokuje značajnu promjenu udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi, odnosno subpopulacije kojoj pripadaju klasični citotoksični T limfociti. Dodatna razlika između našeg i istraživanja VAN ROOIJ i sur. (2004.) je i ta što su navedeni autori analizirali subpopulaciju kojoj fenotipski pouzdanije pripadaju klasični citotoksični T limfociti ($CD4^-CD8\alpha^{+bright}$). Međutim, sedmog dana našeg pokusa kombinacija inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* s atenuiranim SHV-1 nije uzrokovala adjuvantni učinak samo na udio subpopulacije $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita, već i na udio $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita, što je prema VAN ROOIJ i sur. (2004.) pokazatelj višeg stupnja zaštitne imunosti. Suprotno našem istraživanju, PAPPATERRA MENDOZA i sur. (2000.) nisu utvrdili sinergijski učinak zajedničke i/m primjene cjepiva s atenuiranim SHV-1 i kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E.coli* na limfocite periferne krvi svinja. Međutim, nalaze našeg i istraživanja PAPPATERRA MENDOZA i sur. (2000.) teško je uspoređivati zbog nekoliko razlika. U našem istraživanju je kombinacija inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* osim istog dana kada i cjepivo, primijenjena i tri dana ranije, limfociti periferne krvi nisu analizirani nakon *in vitro* stimulacije te je analiziran fenotip pojedinih populacija limfocita i subpopulacija T limfocita. S druge strane, iako je u oba istraživanja primijenjen isti cjepni soj SHV-1 (Bartha K-61), u našem istraživanju nije praćen specifičan odgovor limfocita na virus, dok je u istraživanju PAPPATERRA MENDOZA i sur. (2000.) analizirana proliferacija limfocita stimuliranih sa SHV-1.

Iako istraživanje FACHINGER i sur. (2000a.) ukazuje na povećanu ekspresiju molekule CD8α na $CD4^+CD8\alpha^-$ T limfocitima iz periferne krvi svinja, *in vitro* stimuliranih s virusom *Parapoxvirus ovis,* naše istraživanje nije potvrdilo isti nalaz bez *in vitro* manipulacije. U našem istraživanju dvokratna primjena inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* nije uzrokovala značajan porast udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocita, kao niti porast udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja. Dvokratna primjena kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* u našem istraživanju također nije uzrokovala značajne promjene udjela navedenih subpopulacija u T limfocitima periferne krvi svinja. Iako je primjena navedenog imunomodulatora sedmog dana uzrokovala statistički značajan porast udjela $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi u odnosu na neke druge skupine, taj porast nije bio statistički značajan u odnosu na negativu kontrolnu skupinu. Međutim, primjena navedenog imunomodulatora je sedmog dana uzrokovala veći porast srednje vrijednosti udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ i $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi od jednokratne primjene cjepiva i dvokratne primjene inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis*. To također ide u prilog adjuvantnom učinku kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E.coli* s cjepivom na udjele subpopulacija kojima fenotipski pripadaju aktivirani i memorijski pomoćnički, odnosno klasični citotoksični T limfociti, s obzirom da je navedeni učinak također utvrđen sedmog dana.

Za razliku od zajedničke primjene cjepiva s drugim istraživanim imunomodulatorom, zajednička primjena cjepiva s inaktiviranim virusom *Parapoxvirus ovis* nije uzrokovala značajne promjene udjela $CD4^+CD8\alpha^+$ i $CD4^-CD8\alpha^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja niti jednog dana pokusa. Iako je istraživanje TERZIĆ i sur. (2004.) pokazalo sinergijski učinak i/m primjene inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* i drugog virusnog cjepiva (gE2 virusa klasične svinjske kuge) na udjele leukocita periferne krvi koji eksprimiraju molekulu CD4 ili molekulu CD8α, rezultate dobivene u tom i našem istraživanju teško je uspoređivati obzirom da su TERZIĆ i sur. (2004.) analizirali zasebnu ekspresiju pojedinog diferencijacijskog antigena leukocita. Poznato je da molekulu CD4 osim pomoćničkih T limfocita mogu eksprimirati i plazmacitoidne dendritične stanice u perifernoj krvi svinja, dok molekulu CD8α osim klasičnih citotoksičnih T limfocita mogu eksprimirati i pomoćnički T limfociti, γδT limfociti i NK stanice (PIRIOU-GUZYLACK i SALMON, 2008.; ŠINKORA i BUTLER, 2009.; SUMMERFIELD i MCCULLOUGH, 2009.).

Budući da većina istraživanja ukazuje da je ekspresija molekule CD8a na aktiviranim i memorijskim pomoćničkim T limfocitima praćena i ekspresijom molekula SLA II

(SAALMÜLLER i sur., 2002.; REVILLA i sur., 2005a.; GERNER i sur., 2006.), u našem istraživanju također je praćena ekspresija molekule SLA-DR na $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocitima ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$). Primjena cjepiva i/ili imunomodulatora u našem istraživanju nije uzrokovala značajne promjene udjela $CD4^+CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja. Iako je sedmog dana primjena kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* te zajednička primjena navedenog imunomodulatora s cjepivom uzrokovala statistički značajan porast udjela navedene subpopulacije T limfocita u odnosu na neke druge skupine, taj porast nije bio statistički značajan u odnosu na negativu kontrolnu skupinu. VAN ROOIJ i sur. (2004.) su istraživali utjecaj $CD4^+C8^+$T limfocita na zaštitu svinja od infekcije sa SHV-1. Međutim, na navedenoj subpopulaciji T limfocita nije analizirana ekspresija dodatnih aktivacijskih biljega (poput SLA-DR), osim molekule CD6 koju eksprimira većina αβT limfocita periferne krvi svinja (SAALMÜLLER i sur., 1994c.; PAULY i sur., 1996.), pa značaj subpopulacije kojoj pouzdanije pripadaju aktivirani i memorijski pomoćnički T limfociti za zaštitu svinja od infekcije sa SHV-1 nije potpuno jasan. Iako je naš pokus trajao samo osamnaest dana, rezultati za $CD4^+CD8^+$ αβT limfocite nisu u skladu s rezultatima ranijih istraživanja koja su pokazala da se udio navedene subpopulacije T limfocita u ukupnim limfocitima periferne krvi povećava tijekom prve godine života, vjerojatno zbog povećanja kontakata s različitim antigenima iz okoliša (PESCOVITZ i sur., 1994a.; YANG i PARKHOUSE, 1996.; ZUCKERMANN i HUSMANN, 1996.). Za razliku od navedenih istraživanja, u našem istraživanju je udio $CD4^+CD8^+$ αβT limfocita praćen u T limfocitima periferne krvi i u kratkim vremenskim razmacima, te su rezultati stoga podložniji većim oscilacijama nego u slučaju kada se prate s razmacima nekoliko tjedana ili mjeseci.

Iako većina autora smatra da $CD4^+CD8\alpha^-$ αβT limfocitima pripadaju neaktivirani pomoćnički T limfociti, istraživanje ZUCKERMANN i HUSMANN (1996.) je pokazalo da i navedena subpopulacija T limfocita proliferira nakon *in vitro* stimulacije PBMC-a sa SHV-1, odnosno s istim antigenom s kojim su svinje cijepljene. Stoga su i u našem istraživanju praćeni $CD4^+CD8\alpha^-$ αβT limfociti ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^-$). Primjena cjepiva i/ili imunomodulatora nije uzrokovala značajne promjene udjela navedene subpopulacije T limfocita u perifernoj krvi svinja. S obzirom da su se molekule SLA II pokazale kao aktivacijski biljeg za pomoćničke T limfocite, u našem istraživanju je ekspresija molekule SLA-DR analizirana i na $CD4^+CD8\alpha^-$ αβT limfocitima ($CD3^+CD16^-TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$). Iako su TALKER i sur. (2013.) utvrdili ekspresiju molekule SLA-DR samo na $CD4^+CD8\alpha^+$ αβT limfocitima u perifernoj krvi svinja tijekom prvih šest mjeseci života, u

našem istraživanju su $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfociti utvrđeni već prvog dana pokusa. Međutim, srednja vrijednost udjela navedene subpopulacije u T limfocitima periferne krvi bila je vrlo mala u svim skupinama. Primjena cjepiva i/ili imunomodulatora u našem istraživanju nije uzrokovala značajne promjene udjela $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi svinja. Iako je primjena kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* jedanaestog dana uzrokovala statistički značajan pad udjela $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita u odnosu na prvi dan, taj pad nije bio statistički značajan u odnosu na ostale skupine, uključujući i negativu kontrolnu skupinu.

Dosadašnja istraživanja su pokazala da klasični citotoksični T limfociti iz periferne krvi svinja također mogu eksprimirati molekulu SLA-DR, odnosno aktivacijski biljeg pomoćničkih T limfocita. Međutim, svrha ekspresije molekule SLA-DR na klasičnim citotoksičnim T limfocitima i na aktiviranim i memorijskim pomoćničkim T limfocitima nije jasna (GERNER i sur., 2009.). Primjena cjepiva i/ili imunomodulatora u našem istraživanju nije uzrokovala značajne promjene udjela $CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita ($CD3^+CD16^-$ $TCR\text{-}\gamma\delta^-CD4^-CD8\alpha^+SLA\text{-}DR^+$) u T limfocitima periferne krvi svinja. Međutim, uloga ove subpopulacije T limfocita, kao i uloga $CD4^+CD8\alpha^-$ i $CD4^+CD8\alpha^-SLA\text{-}DR^+$ αβT limfocita, u zaštiti svinja od infekcije sa SHV-1 nije poznata, budući da prema dostupnoj literaturi nije istraživana.

Iako je ovo istraživanje pokazalo rani sinergijski učinak zajedničke primjene cjepiva s ateniuranim SHV-1 i kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* na stanice periferne krvi svinja kojima fenotipski pripadaju aktivirani i memorijski pomoćnički te klasični citotoksični T limfociti, specifičnost navedenih subpopulacija T limfocita za virus nije ispitana. Stoga su potrebna dodatna istraživanja koja će potvrditi adjuvantni učinak navedenog imunomodulatora s cjepivima protiv BA na virus specifičnu imunost i zaštitu svinja nakon infekcije virulentnim sojevima SHV-1.

7. ZAKLJUČCI

1. Dvokratna primjena imunomodulatora (kombinacija inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* ili inaktivirani virus *Parapoxvirus ovis*) nije pokazala značajan učinak na udjele T i B limfocita te NK stanica u limfocitima periferne krvi.

2. Primjena cjepiva (atenuirani SHV-1, soj Bartha) jednokratno s ili bez imunomodulatora nije pokazala značajan učinak na udjele T i B limfocita te NK stanica u limfocitima periferne krvi.

3. Jednokratna primjena cjepiva, dvokratna primjena oba imunomodulatora i zajednička primjena inaktiviranog virusa *Parapoxvirus ovis* s cjepivom nije pokazala značajan učinak na udjele subpopulacija αβT i γδT limfocita u T limfocitima periferne krvi.

4. Zajednička primjena kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* s cjepivom je sedmi dan pokusa potaknula značajan porast udjela $CD4^{+}CD8\alpha^{+}$ i $CD4^{-}CD8\alpha^{+}$ αβT limfocita u T limfocitima periferne krvi, dok na udjele ostalih subpopulacija αβT limfocita, kao i na udjele subpopulacija γδT limfocita, nije djelovala sinergijski.

5. Kombinacija inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* je s atenuiranim SHV-1 pokazala adjuvantni učinak na subpopulacije αβT limfocita kojima prema dosadašnjim istraživanjima pripadaju aktivirani i memorijski pomoćnički T limfociti te klasični citotoksični T limfociti, od kojih su se zadnji pokazali važnim za ranu zaštitu svinja od infekcije sa SHV-1.

6. Ovo istraživanje ukazuje na opravdanost primjene kombinacije inaktivirane bakterije *P. granulosum* i detoksificiranih LPS-a bakterije *E. coli* s cjepivom koje sadržava atenuirani SHV-1 zbog adjuvantnoga djelovanja ovog imunomodulatora.

8. POPIS LITERATURE

ALLUWAIMI, A. M. (2004): The cytokines of bovine mammary gland: prospects for diagnosis and therapy. Res. Vet. Sci. 77, 211-222.

ANONIMNO (2012a): OIE Terrestrial Manual 2012. Chapter 2. 1. 2. - Aujeszky's disease (infection with Aujeszky's disease virus), World Organisation for Animal Health (OIE); dostupno na: http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng /Health standards/tahm/2.01.02 AUJESZKYS DIS.pdf; posjećeno 10.12.2017.

ANONIMNO (2012b): Dodatak B. U: Veterinarski priručnik. (Herak-Perković, V., Ž. Grabarević, J. Kos, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 2737-2743.

ANONIMNO (2017a): European Pharmacpoeia. Aujeszky's disease vaccine (live) for pigs for parenteral administration. 9th ed., European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, str. 1005-1007.

ANONIMNO (2017b): European Pharmacpoeia. Aujeszky's disease vaccine (inactivated) for pigs. 9th ed., European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM), Strasbourg, pp. 1003-1005.

AWATE, S., L. A. BABIUK, G. MUTWIRI (2013): Mechanisms of action of adjuvants. Front. Immunol. 4: 114.

BANKS, M., L. S. TORRACA, A. G. GREENWOOD, D. C. TAYLOR (1999): Aujeszky's disease in captive bears. Vet. Rec. 145, 362-365.

BECKER, A. M., T. A. JANIK, E. K. SMITH, C. A. SOUSA B. A. PETERS (1989): *Propionibacterium acnes* Immunotherapy in Chronic Recurrent Canine Pyoderma. An Adjunct to Antibiotic Therapy. J. Vet. Internal. Med. 3, 26-30.

BIASSONI, R., A. PESSINO, C. BOTTINO, D. PENDE, L. MORETTA, A. MORETTA (1999): The murine homologue of the human NKp46, a triggering receptor involved in the induction of natural cytotoxicity. Eur. J. Immunol. 29, 1014–1020.

BITSCH, V., B. MUNCH (1971): On pseudorabies in carnivores in Denmark. I. The red fox (*Vulpes vulpes*). Acta Vet. Scand. 12, 274-284.

BIUK-RUDAN, N., L. ŠVER, I. VALPOTIĆ, I. VRBANAC, J. MADIĆ, Ž. ŽUPANČIĆ, N VIJTIJUK, Ž. PAVIČIĆ (2004): Effect of Baypamun Treatment on Aujeszky's Disease Virus (ADV) Transmission in Pigs. Acta Vet. Brno 73, 59-68.

BOADELLA, M., C. GORTÁZAR, J. VICENTE, F. RUIZ-FONS (2012): Wild boar: an increasing concern for Aujeszky's disease control in pigs? BMC Vet. Res. 8: 7.

BOHANNON, J. K., A. HERNANDEZ, P. ENKHBAATAR, W. L. ADAMS, E. R. SHERWOOD (2013): The Immunobiology of TLR4 agonists: From Endotoxin Tolerance to Immunoadjuvants. Shock 40, 451-462.

BOUMA, A., M. C. DE JONG, T. G. KIMMAN, (1997): The influence of maternal immunity on the transmission of pseudorabies virus and on the effectiveness of vaccination. Vaccine 15, 287-294.

BOUMA, A. (2005): Determination of the effectiveness of Pseudorabies marker vaccines in experiments and field trials. Biologicals 33, 241-245.

BOŽIĆ, F., V. BILIĆ, I. VALPOTIĆ (2003): Levamisole mucosal adjuvant activity for a live attenuated *Escherichia coli* oral vaccine in weaned pigs. J. Vet. Pharmacol. Therap. 26, 225-231.

BOŽIĆ, F., F. BANOVIĆ, J. ŠURAN, A. PREVENDAR-CRNIĆ (2011): Adjuvant activity of levamisole for experimental F18ac^{+} *Escherichia coli* oral vaccine against porcine post-weaning colibacillosis. Vet. arhiv 81, 199-209.

BROCKMEIER, S. L., K. M. LAGER, W. L. MENGELING (1997): Vaccination with recombinant vaccinia virus vaccines expressing glycoprotein genes of pseudorabies virus in the presence of maternal immunity. Vet. Microbiol. 58, 93-103.

BROWN, T. T., K. O. SHIN, F. J. FULLER (1995): Detection of pseudorabies viral DNA in tonsillar epithelial cells of latently infected pigs. Am. J. Vet. Res. 56, 587-594.

CAPUA, I., R. FICO, M. BANKS, M. TAMBA, G. CALZETTA (1997): Isolation and characterisation of an Aujeszky's disease virus naturally infecting a wild boar (*Sus scrofa*). Vet. Microbiol. 55, 141-146.

CARR, J. (2013): General. U: The basic stockmanship guide: Pigs, Hogs and Swine. (Carr, J., ur.), Editorial Servet, Zaragoza, str. 1-29.

CHARERNTANTANAKUL, W., J. A. ROTH (2006): Biology of porcine T lymphocytes. Anim. Health Res. Rev. 7, 81–96.

CHRISTOPHER, C. L., L. CHASE, J. K. LUNNEY (2012): Immune System. U: Diseases of Swine. (Zimmerman, J. J., L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, ur.), Wiley-Blackwell, Ames, str. 227-250.

CLIFFORD, C. A., A. J. MACKIN, C. J. HENRY (2000): Treatment of Canine Hemangiosarcoma: 2000 and Beyond. J. Vet. Intern. Med. 14, 479–485.

COFFMAN, R. L., A. SHER, R. A. SEDER (2010): Vaccine Adjuvants: Putting Innate Immunity to Work. Immunity 33, 492–503.

CONNELLEY, T., A. K. STORSET, A. PEMBERTON, N. MACHUGH, J. BROWN, H. LUND, I. W. MORRISON (2011): NKp46 defines ovine cells that have characteristics corresponding to NK cells. Vet. Res. 42: 37.

CONSTABLE, P. D., K. W. HINCHCLIFF, S. H. DONE, W. GRÜNBERG (2017): Diseases of the Hemolymphatic and Immune system. U: Veterinary Medicine. A Textbook of the Disesases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats. (Constable, P. D., K. W. Hinchcliff, S. H. Done, W. Grünberg, ur.), Elsevier, St. Louis, str. 716-844.

DALEY, M. J., P. A. COYLE, T. J. WILLIAMS, G. FURDA, R. DOUGHERTY, P. W. HAYES (1991): *Staphylococcus aureus* Mastitis: Pathogenesis and Treatment with Bovine Interleukin-1 β and Interleukin-2. J. Dairy Sci. 74, 4413-4424.

DAVIS W. C., F. A. ZUCKERMANN, M. J. HAMILTON, J. I. R. BARBOSA, A. SAALMÜLLER, R. M. BINNS, S. T. LICENCE (1998): Analysis of monoclonal antibodies that recognize *γδ* T/null cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 305–316.

DAVIS, E. G., B. R. RUSH, F. BLECHA (2003): Increases in Cytokine and Antimicrobial Peptide Gene Expression in Horses by Immunomodulation with *Propionibacterium acnes*. Vet. Ther. 4, 5-11.

DAVIS, M. E., C. V. MAXWELL, G. F. ERF, D. C. BROWN, T. J. WISTUBA (2004): Dietary supplementation with phosphorylated mannans improves growth response and modulates immune function of weanling pigs. J. Anim. Sci. 82, 1882-1891.

DAVISON, A. J. (2010): Herpesvirus systematics. Vet. Microbiol. 143, 52-69.

DAY, M. J., R. D. SCHULTZ (2013a): Prikazivanje antigena i citokini. U: Veterinarska imunologija. Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 72-82.

DAY, M. J., R. D. SCHULTZ (2013b): Imunoreakcija na infekcijske uzročnike. U: Veterinarska imunologija. Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 131-140.

DAY, M. J., R. D. SCHULTZ (2013c): Komplement. U: Veterinarska imunologija. Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 30-38.

DAY, M. J., R. D. SCHULTZ (2013d): Biologija T-limfocita. U: Veterinarska imunologija. Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 83-96.

DAY, M. J., R. D. SCHULTZ (2013e): Biologija B-limfocita. U: Veterinarska imunologija, Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 97-106.

DAY, M. J., R. D. SCHULTZ (2013f): Imunoterapija. U: Veterinarska imunologija. Načela i primjena (hrvatsko izdanje). (Šeol Martinec, B., V. Herak Perković, ur.), Medicinska naklada, Zagreb, str. 203-214.

DE BRUIN, M. G. M., E. M. A. VAN ROOIJ, J. J. M. VOERMANS, Y. E. DE VISSER, A. T. J. BIANCHI, T. G. KIMMAN (1997): Establishment and characterization of porcine cytolytic cell lines and clones. Vet. Immunol. Immunopathol. 59, 337–347.

DE BRUIN, M. G. M., Y. E. DE VISSER, T. G. KIMMAN, A. T. J. BIANCHI (1998): Time course of the porcine cellular and humoral immune responses in vivo against pseudorabies virus after inoculation and challenge: significance of in vitro antigenic restimulation. Vet. Immunol. Immunopathol. 65, 75-87.

DE BRUIN, T. G. M., E. M. A. VAN ROOIJ, Y. E. DE VISSER, J. J. M. VOERMANS, J. N. SAMSOM, T. G. KIMMAN, A. T. J. BIANCHI (2000a.): Discrimination of different subsets of cytolytic cells in pseudorabies virus-immune and naive pigs. J. Gen. Virol. 81, 1529–1537.

DE BRUIN, T. G. M., E. M. A. VAN ROOIJ, Y. E. DE VISSER, A. T. J. BIANCHI (2000b): Cytolytic Function for Pseudorabies Virus-Stimulated Porcine $CD4^{+}CD8^{dull+}$ Lymphocytes. Viral Immunol. 13, 511-520.

DE LEEUW, P. W., J. T. VAN OIRSCHOT (1985): Vaccines against Aujeszky's disease: Evaluation of their efficacy under standardized laboratory conditions. Vet. Q. 7, 191-197.

DE MARI, K., L. MAYNARD, H. M. EUN, B. LEBREUX (2003): Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. Vet. Rec. 152, 105-108.

DE MARI, K., L. MAYNARD, A. SANQUER, B. LEBREUX, H. M. EUN (2004): Therapeutic Effects of Recombinant Feline Interferon-ω on Feline Leukemia Virus (FeLV)-

Infected and FeLV/Feline Immunodeficiency Virus (FIV)-Coinfected Symptomatic Cats. J. Vet. Intern. Med. 18, 477-482.

DE MARIA, A., R. BIASSONI, M. FOGLI, M. RIZZI, C. CANTONI, P. COSTA, R. CONTE, D. MAVILIO, B. ENSOLI, A. CAFARO, A. MORETTA, L. MORETTA (2001): Identification, molecular cloning and functional characterization of NKp46 and NKp30 natural cytotoxicity receptors in *Macaca fascicularis* NK cells. Eur. J. Immunol. 31, 3546–3556.

DENG, J., Y. LI, J. ZHANG, Q. YANG (2013): Co-administration of *Bacillus subtilis* RJGP16 and *Lactobacillus salivarius* B1 strongly enhances the intestinal mucosal immunity of piglets. Res. Vet. Sci. 94, 62-68.

DENYER, M. S., T. E. WILEMAN, C. M. STIRLING, B. ZUBER, H. H. TAKAMATSU (2006): Perforin expression can define CD8 positive lymphocyte subsets in pigs allowing phenotypic and functional analysis of Natural Killer, Cytotoxic T, Natural Killer T and MHC un-restricted cytotoxic T-cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 110, 279–292.

DHAMA, K., M. MAHENDRAN, R. S. CHAUHAN, S. TOMAR (2008): Cytokines - their functional roles and prospective applications in veterinary practice: A review. J. Immunol. Immunopathol. 10, 79-89.

DHAMA, K., M. SAMINATHAN, S. S. JACOB, M. SINGH, K. KARTHIK, AMARPAL, R. TIWARI, L. T. SUNKARA, Y. S. MALIK, R. K. SINGH (2015): Effect of Immunomodulation and Immunomodulatory Agents on Health with Some Bioactive Principles, Modes of Action and Potent Biomedical Applications. Int. J. Pharm. 11, 253-290.

DINSMORE, R. P., M. B. CATTELL, R. D. STEVENS, C. S. GABEL, M. D. SALMAN, J. K. COLLINS (1995): Efficacy of a *Propionibacterium acnes* Immunostimulant for Treatment of Chronic *Staphylococcus aureus* Mastitis. J. Dairy Sci. 78, 1932-1936.

DORY, D., A. M. TORCHÉ, V. BÉVEN, P. BLANCHARD, C. LOIZEL, R. CARIOLET, A. JESTIN (2005): Effective protection of pigs against lethal Pseudorabies virus infection after a

single injection of low-dose Sindbis-derived plasmids encoding PrV gB, gC and gD glycoproteins. Vaccine 23, 3483-3491.

DORY, D., T. FISCHER, V. BÉVEN, R. CARIOLET, H. J. RZIHA, A. JESTIN (2006): Prime-boost immunization using DNA vaccine and recombinant Orf virus protects pigs against Pseudorabies virus (Herpes suid 1). Vaccine 24, 6256-6263.

EICHER, S. D., C. A. MCKEE, J. A. CARROLL, E. A. PAJOR (2006): Supplemental vitamin C and yeast cell wall β-glucan as growth enhancers in newborn pigs and as immunomodulators after an endotoxin challenge after weaning. J. Anim. Sci. 84, 2352-2360.

ELBERS, A. R. W., A. STEGMAN (1996): Marked reduction of the prevalence of pseudorabies virus-infected pigs in pig dense regions of the Netherlands during the first year of anation-wide vaccination campaign. Vet. Q. 18, 65-67.

EZQUERRA, A., C. REVILLA, B. ALVAREZ, C. PÉREZ, F. ALONSO, J. DOMÍNGUEZ (2009): Porcine myelomonocytic markers and cell populations. Dev. Comp. Immunol. 33, 284-298.

FACHINGER, V., T. SCHLAPP, A. SAALMÜLLER (2000a): Evidence for a parapox ovis virus-associated superantigen. Eur. J. Immunol. 30, 2962-2971.

FACHINGER, V., T. SCHLAPP, W. STRUBE, N. SCHMEER, A. SAALMÜLLER (2000b): Poxvirus-Induced Immunostimulating Effects on Porcine Leukocytes. J. Virol. 74, 7943-7951.

FAIRBAIRN, L., R. KAPETANOVIC, D. P. SESTER, D. A. HUME (2011): The mononuclear phagocyte system of the pig as a model for understanding human innate immunity and disease. J. Leukoc. Biol. 89, 855-871.

FALDYNA, M., P. SAMANKOVA, L. LEVA, J. CERNY, J. OUJEZDSKA, Z. REHAKOVA, J. SINKORA (2007): Cross-reactive anti-human monoclonal antibodies as a tool for B-cell identification in dogs and pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 119, 56-62.

FERRO, A., J. MARCA, E. NAVARRETE, L. STIPKOVITS (2000a): Effect of the combination of lincomycin + Inmodulen® for swine dysentery control. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress, 18-21 July, Melbourne, Australia, p. 124.

FERRO, A., J. MARCA, E. NAVARRETE, L. STIPKOVITS (2000b): Effect of combination of benzylpenicillin + dihydrostreptomycin + Inmodulen® in the treatment of enzootic pneumonia. Proceedings of the 16th International Pig Veterinary Society Congress, 18-21 July, Melbourne, Australia, p. 129.

FIELD, H. J., T. J. HILL (1974): The Pathogenesis of Pseudorabies in Mice following Peripheral Inoculation. J. Gen. Virol. 23, 145-157.

GERDTS, V., A. JÖNS, B. MAKOSCHEY, N. VISSER, T. C. METTENLEITER (1997): Protection of pigs against Aujeszky's disease by DNA vaccination. J. Gen. Virol. 78, 2139-2145.

GERDTS, V. (2015): Adjuvants for veterinary vaccines - types and modes of action. Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 128, 456-463.

GERNER, W., M. S. DENYER, H. H. TAKAMATSU, T. E. WILEMAN, K. H. WIESMÜLLER, E. PFAFF, A. SAALMÜLLER (2006): Identification of novel foot-and-mouth disease virus specific T-cell epitopes in c/c and d/d haplotype miniature swine. Virus Res. 121, 223-228.

GERNER, W., T. KÄSER, A. SAALMÜLLER (2009): Porcine T lymphocytes and NK cells – An update. Dev. Comp. Immunol. 33, 310-320.

GERNER, W., S. C. TALKER, H. C. KOINIG, C. SEDLAK, K. H. MAIR, A. SAALMÜLLER (2015): Phenotypic and functional differentiation of porcine αβ T cells: Current knowledge and available tools. Mol. Immunol. 66, 3-13.

GLASS, C. M., R. G. MCLEAN, J. B. KATZ, D. S. MAEHR, C. B. CROPP, L. J. KIRK, A. J. MCKEIRNAN, J. F. EVERMANN (1994): Isolation of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus from a Florida panther. J. Wildl. Dis. 30, 180-184.

GODYŃ, D., M PIESZKA, P. LIPIŃSKI, R. R. STARZYŃSKI (2016): Diagnostics of iron deficiency anaemia in piglets in the early postnatal period – a review. Anim. Sci. Pap. Rep. 34, 307-318.

HAAGMANS, B. L., E. M. A. VAN ROOIJ, M. DUBELAAR, T. G. KIMMAN, M. C. HORZINEK, V. E. C. J. SCHIJNS, A. T. J. BIANCHI (1999): Vaccination of pigs against pseudorabies virus with plasmid DNA encoding glycoprotein D. Vaccine 17, 1264-1271.

HAHN, E. C., B. FADL-ALLA, C. A. LICHTENSTEIGER (2010): Variation of Aujeszky's disease viruses in wild swine in USA. Vet. Microbiol. 143, 45-51.

HEEGAARD, P. M. H., L. DEDIEU, N. JOHNSON, M. F. LE POTIER, M. MOCKEY, F. MUTINELLI, T. VAHLENKAMP, M. VASCELLARI, N. S. SØRENSEN (2011): Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. Arch. Virol. 156, 183-202.

HO, C. S., J. K. LUNNEY, A. ANDO, C. ROGEL-GAILLARD, J. H. LEE, L. B. SCHOOK, D. M. SMITH (2009): Nomenclature for factors of the SLA system, update 2008. Tissue Antigens 73, 307-315.

HOLDERNESS, J., J. F. HEDGES, A. RAMSTEAD, M. A. JUTILA (2013): Comparative Biology of γδ T Cell Function in Humans, Mice, and Domestic Animals. Annu. Rev. Anim. Biosci. 1, 99-124.

JOHNS, J. L. (2014): Alterations in Hemostasis. U: Large Animal Internal Medicine (Smith, B. P., ur.), Elsevier, St. Louis, str. 393-398.

JONES, M., J. L. CORDELL, A. D. BEYERS, A. G. TSE, D. Y. MASON (1993): Detection of T and B cells in many animal species using cross-reactive anti-peptide antibodies. J. Immunol. 150, 5429-5435.

KACSKOVICS, I. (2004): Fc receptors in livestock species. Vet. Immunol. Immunopathol. 102, 351-362.

KÄSER, T., W. GERNER, A. SAALMÜLLER (2011): Porcine regulatory T cells: Mechanisms and T-cell targets of suppression. Dev. Comp. Immunol. 35, 1166-1172.

KIM, Y. B., N. D. HUH, H. S. KOREN, D. B. AMOS (1980): Natural killing (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in specific pathogen-free (SPF) miniature swine and germfree piglets. I. Comparison of NK and ADCC. J. Immunol. 125, 755-762.

KIM, S. J., S. B. KIM, Y. W. HAN, E. UYANGAA, J. H. KIM, J. Y. CHOI, K. KIM, S. K. EO (2012): Co-administration of live attenuated *Salmonella enterica* serovar Typhimurium expressing swine interleukin-18 and interferon-α provides enhanced Th1-biased protective immunity against inactivated vaccine of pseudorabies virus. Microbiol. Immunol. 56, 529-540.

KIMANN, T. G., G. J. BINKHORST, T. S. VAN DEN INGH, J. M. POL, A. L. GIELKENS, M. E. ROELVINK (1991): Aujeszky's disease in horses fulfils Koch's postulates. Vet. Rec. 128, 103-106.

KIMMAN T. G., T. M. G. DE BRUIN, J. J. M. VOERMANS, B. P. H. PEETERS, A. T. T. BIANCHI (1995): Development of antigen specificity of the lymphoproliferation response of pigs to pseudorabies virus: dichotomy between secondary B- and T-cells responses. Immunology 86, 372-378.

KIMMAN, T. G., T. G. M. DE BRUIN, J. J. M. VOERMANS, A. T. J. BIANCHI (1996): Cell-mediated immunity to pseudorabies virus: cytolytic effector cells with characteristics of lymphokine-activated killer cells lyse virus-infected and glycoprotein gB- and gC-transfected L14 cells. J. Gen. Virol. 77, 987-990.

KIT, S., M. SHEPPARD, H. ICHIMURA, M. KIT (1987): Second-generation pseudorabies virus vaccine with deletions in thymidine kinase and glycoprotein genes. Am. J. Vet. Res. 48, 780-793.

KLUGE, J. P., G. W. BERAN, H. T. HILL, K. B. PLATT (1999): Pseudorabies (Aujeszky’s disease). U: Diseases of swine. (Straw, B. E., S. D’Allaire, W. L. Mengeling, D. J. Taylor, ur.), Iowa State University Press, Ames, str. 233-246.

KOINIG, H. C., S. C. TALKER, M. STADLER, A. LADINIG, R. GRAAGE, M. RITZMANN, I. HENNIG-PAUKA, W. GERNER, A SAALMÜLLER (2015): PCV2 vaccination induces IFN-γ/TNF-α co-producing T cells with a potential role in protection. Vet. Res. 46: 20.

KOREN, H. S., D. B. AMOS, Y. B. KIM (1978): Natural killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity are independent immune functions in the Minnesota miniature swine. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5127-5131.

KOVŠCA JANJATOVIĆ, A., G. LACKOVIĆ, F. BOŽIĆ, M. POPOVIĆ, I. VALPOTIĆ (2008): Levamisole synergizes proliferation of intestinal IgA^+ cells in weaned pigs immunized with vaccine candidate $F4ac^+$ nonenterotoxigenic *Escherichia coli* strain. J. Vet. Pharmacol. Therap. 31, 328-333.

KRITAS, S. K., M. B. PENSAERT, T. C. METTENlEITER (1994): Role of envelope glycoproteins gI, gp63 and gIII in the invasion and spread of Aujeszky's disease virus in the olfactory nervous pathway of the pig. J. Gen. Virol. 75, 2319-2327.

KRITAS, S. K., H. J. NAUWYNCK, M. B. PENSAERT, S. C. KYRIAKIS (1999): Neural invasion of two virulent Suid Herpesvirus 1 strains in neonatal pigs with or without maternal immunity. Vet. Microbiol. 69, 143-156.

KYRIAKIS, S. C., E. D. TZIKA, D. N. LYRAS, A. C. TSINAS, K. SAOULIDIS, K. SARRIS (1998): Effect of an inactivated Parapoxvirus based immunomodulator (Baypamun) on post weaning diarrhoea syndrome and wasting pig syndrome of piglets. Res. Vet. Sci. 64, 187-190.

LABARQUE, G. G., H. J. NAUWYNCK, D. G. MAES, M. B. PENSAERT (1999): Protection of fattening pigs against challenge with Aujeszky's disease virus after a successive intranasal/intramuscular vaccination. Vet. Q. 21, 104-107.

LÄHTEINEN, T., A. LINDHOLM, T. RINTTILÄ, S. JUNNIKKALA, R. KANT, T. E. PIETILÄ, K. LEVONEN, I. VON OSSOWSKI, G. SOLANO-AGUILAR, M. JAKAVA-VILJANEN, A. PALVA (2014): Effect of *Lactobacillus brevis* ATCC 8287 as a feeding

supplement on the performance and immune function of piglets. Vet. Immunol. Immunopathol. 158, 14-25.

LEAL, R. O., S. GIL (2016): The Use of Recombinant Feline Interferon Omega Therapy as an Immune-Modulator in Cats Naturally Infected with Feline Immunodeficiency Virus: New Perspectives. Vet. Sci. 3: 32.

LEE, J., K. CHOI, M. R. OLIN, S. N. CHO, T. W. MOLITOR (2004): γδ T Cells in Immunity Induced by *Mycobacterium bovis* Bacillus Calmette—Guérin Vaccination. Infect. Immun. 72, 1504-1511.

LI, J., D. F. LI, J. J. XING, Z. B. CHENG, C. H. LAI (2006): Effects of *β*-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. J. Anim. Sci. 84, 2374-2381.

LINGHUA, Z., G. YONG, T. XINGSHAN, Z. FENGZHEN (2006): Co-administration of porcine-specific CpG oligodeoxynucleotide enhances the immune responses to pseudorabies attenuated virus vaccine in newborn piglets in vivo. Dev. Comp. Immunol. 30, 589-596.

LIPIŃSKI, P., R. R. STARZYŃSKI, F. CANONNE-HERGAUX, B. TUDEK, R. OLIŃSKI, P. KOWALCZYK, T. DZIAMAN, O. THIBAUDEAU, M. A. GRALAK, E. SMUDA, J. WOLIŃSKI, A. USIŃSKA, R. ZABIELSKI (2010): Benefits and Risks of Iron Supplementation in Anemic Neonatal Pigs. Am. J. Pathol. 177, 1233-1243.

LO, D. Y., C. N. HUNG, W. C. LEE, J. W. LIAO, B. A. BLACKLAWS, T. H. CHEN, M. S. CHIEN, S. L. HSUAN (2009): Effect of Immunostimulation by Detoxified *E. coli* Lipopolysaccharide Combined with Inactivated *Propionibacterium granulosum* Cells on Porcine Immunity. J. Vet. Med. Sci. 71, 897-903.

LOMNICZI, B., M. L. BLANKENSHIP, T. BEN-PORAT (1984a): Deletions in the Genomes of Pseudorabies Virus Vaccine Strains and Existence of Four Isomers of the Genomes. J. Virol. 49, 970-979.

LOMNICZI, B., S. WATANABE, T. BEN-PORAT, A. S. KAPLAN (1984b): Genetic Basis of the Neurovirulence of Pseudorabies Virus. J. Virol. 52, 198-205.

LUNNEY, J. K. (1993): Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. Immunol. Today 14, 147-148.

LUNNEY, J. K., C. S. HO, M. WYSOCKI, D. M. SMITH (2009): Molecular genetics of the swine major histocompatibility complex, the SLA complex. Dev. Comp. Immunol. 33, 362-374.

MAASS, N., J. BAUER, B. R. PAULICKS, B. M. BÖHMER, D. A. ROTH-MAIER (2005): Efficiency of *Echinacea purpurea* on performance and immune status in pigs. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 89, 244-252.

MACEWEN, E. G., I. D. KURZMAN, D. M. VAIL, R. R. DUBIELZIG, K. EVERLITH, B. R. MADEWELL, C. O. RODRIGUEZ JR., B. PHILLIPS, C. H. ZWAHLEN, J. OBRADOVICH, R. C. ROSENTHAL, L. E. FOX, M. ROSENBERG, C. HENRY, J. FIDEL (1999): Adjuvant Therapy for Melanoma in Dogs: Results of Randomized Clinical Trials Using Surgery, Liposome-encapsulated Muramyl Tripeptide, and Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor. Clin. Cancer Res. 5, 4249-4258.

MAIR, K. H., S. E. ESSLER, M. PATZL, A. K. STORSET, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2012): NKp46 expression discriminates porcine NK cells with different functional properties. Eur. J. Immunol. 42, 1261-1271.

MAIR, K. H., A. MÜLLEBNER, S. E. ESSLER, J. C. DUVIGNEAU, A. K. STORSET, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2013): Porcine $CD8\alpha^{dim/-}NKp46^{high}$ NK cells are in a highly activated state. Vet. Res. 44: 13.

MAIR, K. H., M. STADLER, S. C. TALKER, H. FORBERG, A. K. STORSET, A. MÜLLEBNER, J. C. DUVIGNEAU, S. E. HAMMER, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2016): Porcine $CD3^{+}NKp46^{+}$ Lymphocytes Have NK-Cell Characteristics and Are Present in Increased Frequencies in the Lungs of Influenza-Infected Animals. Front. Immunol. 7: 263.

MARCHIOLI, C. C., R. J. YANCEY, R. C. WARDLEY, D. R. THOMSEN, L. E. POST (1987): A vaccine strain of pseudorabies virus with deletions in the thymidine kinase and glycoprotein X genes. Am. J. Vet. Res. 48, 1577-1583.

MARTIN S., R. C. WARDLEY, A. I. DONALDSON (1986): Functional antibody responses in pigs vaccinated with live and inactivated Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 41, 331-335.

MARTIN, S., R. C. WARDLEY (1987): Local humoral and cellular responses in Aujeszky's disease virus infection in pigs. Res. Vet. Sci. 42, 170-174.

MCFERRAN, J. B., C. DOW (1975): Studies on immunisation of pigs with the Bartha strain of Aujeszky's disease virus. Res. Vet. Sci. 19, 17-22.

MCGREGOR, S., B. C. EASTERDAY, A. S. KAPLAN, T. BEN-PORAT (1985): Vaccination of swine with thymidine kinase-deficient mutants of pseudorabies virus. Am. J. Vet. Res. 46, 1494-1497.

MENGELING, W. L., K. M. LAGER, D. M. VOLZ, S. L. BROCKMEIER (1992): Effect of different vaccination procedures on shedding, latency and reactivation of virulent pseudorabies virus in pigs. Am. J. Vet. Res. 53, 2164-2173.

MENGELING, W. L., S. L. BROCKMEIER, K. M. LAGER, A. C. VORWALD (1997): The role of biotechnologically engineered vaccines and diagnostics in pseudorabies (Aujeszky's disease) eradication strategies. Vet. Microbiol. 55, 49-60.

METTENLEITER, T. C., N. LUKÀCS, H. J. RZIHA (1985): Pseudorabies Virus Avirulent Strains Fail to Express a Major Glycoprotein. J. Virol. 56, 307-311.

METTENLEITER, T. C. (2000): Aujeszky`s Disease (pseudorabies) virus: the virus and molecular pathogenesis - State of the art, June 1999. Vet. Res. 31, 99-115.

METTENLEITER, T. C. (2008): Pseudorabies Virus. U: Encyclopedia of Virology. (Mahy, B. W. J., M. H. V. Van Regenmortel, ur.), Elsevier, Oxford, str. 341-351.

METTENLEITER, T. C., B. EHLERS, T. MÜLLER, K. J. YOON, J. P. TEIFKE (2012): Herpesviruses. U: Diseases of Swine. (Zimmerman, J. J., L. A. Karriker, A. Ramirez, K. J. Schwartz, G. W. Stevenson, ur.), Wiley-Blackwell, Ames, str. 421-446.

MINAGAWA, T., K. ISHIWATA, T. KAJIMOTO (1999): Feline interferon-ω treatment on canine parvovirus infection. Vet. Microbiol. 69, 51-53.

MOORMANN, R. J. M., T. DE ROVER, J. BRIAIRE, B. P. H. PEETERS, A. L. J. GIELKENS, J. T. VAN OIRSCHOT (1990): Inactivation of the thymidine kinase gene of a gI deletion mutant of pseudorabies virus generates a safe but still highly immunogenic vaccine strain. J. Gen. Virol. 71, 1591-1595.

MOSER, B., M. WOLF, A. WALZ, P. LOETSCHER (2004): Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. Trends Immunol. 25, 75-84.

MÜLLER, T., B. G. KLUPP, C. FREULING, B. HOFFMANN, M. MOJCICZ, I. CAPUA, V. PALFI, B. TOMA, W. LUTZ, F. RUIZ-FON, C. GORTÁZAR, A. HLINAK, U. SCHAARSCHMDT, K. ZIMMER, F. J. CONRATHS, E. C. HAHN, T. C. METTENLEITER (2010): Characterization of pseudorabies virus of wild boar originating from Europe. Epidemiol. Infect. 138, 1590-1600.

MURTAUGH, M. P., C. R. JOHNSON, Z. XIAO, R. W. SCAMURRA, Y. ZHOU (2009): Species specialization in cytokine biology: Is interleukin-4 central to the T_H1-T_H2 paradigm in swine? Dev. Comp. Immunol. 33, 344-352.

NAUWYNCK, H. J., M. B. PENSAERT (1994): Programs for the eradication of Aujeszky's disease virus (Pseudorabies virus) in the member states of the European Union. Proceedings of the O.I.E. Symposium Aujeszky's Disease, 30 June-01 July, Bangkok, Thailand, str. 55-66.

NAWYNCK, H. J. (1997): Functional aspects of Aujeszky's disease (pseudorabies) viral proteins with relation to invasion, virulence and immunogenicity. Vet. Microbiol. 55, 3-11.

NIMMERJAHN, F., J. V. RAVETCH (2006): Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. Immunity 24, 19-28.

OBER, B. T, A. SUMMERFIELD, C. MATTLINGER, K. H.WIESMÜLLER, G. JUNG, E. PFAFF, A. SALMÜLLER, H. J. RZIHA (1998.): Vaccine-Induced, Pseudorabies Virus-Specific, Extrathymic $CD4^+CD8^+$ Memory T-Helper Cells in Swine. J. Virol. 72, 4866–4873.

OGILVIE, G. K., R. E. ELMSLIE, M. CECCHINI, L. M. WALTERS, F. C. PEARSON (1992): Use of a biological extract of *Serratia marcescens* to decrease doxorubicin-induced myelosuppression in dogs. Am. J. Vet. Res. 53, 1787-1790.

OLIN, M. R., K. H. CHOI, J. LEE, T. W. MOLITOR (2005): γδ T-lymphocyte cytotoxic activity against *Mycobacterium bovis* analyzed by flow cytometry. J. Immunol. Methods 297, 1–11.

OPAL, S. M., J. W. JHUNG, J. C. KEITH JR., J. E. PALARDY, N. A. PAREJO, L. D. YOUNG, A. BHATTACHARJEE (1998): Recombinant Human Interleukin-11 in Experimental *Pseudomonas aeruginosa* Sepsis in Immunocompromised Animals. J. Infect. Dis. 178, 1205-1208.

PAPPATERRA MENDOZA, G. J., E. MATEU DE ANTONIO, M. E. NOVELL BADAL, M. MARTÍN CASTILLO, J. CASAL FÁBREGA, J. MARCA PUIG (2000): *In Vitro* and *In Vivo* Effects of an Immunomodulator Composed of *Escherichia coli* Lipopolysaccharide and *Propionibacterium granulosum*-Inactivated Cells in Pigs. J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health 47, 619-627.

PAULY, T., E. WEILAND, W. HIRT, C. DREYER-BUX, S. MAURER, A. SUMMERFIELD, A. SAALMÜLLER (1996): Differentiation between MHC-restricted and non-MHC-restricted porcine cytolytic T lymphocytes. Immunology 88, 238-246.

PEETERS, B., K. BIENKOWSKA-SZEWCZYK, M. HULST, A. GIELKENS, T. KIMMAN (1997): Biologically safe, non-transmissible pseudorabies virus vector vaccine protects pigs against both Aujeszky's disease and classical swine fever. J. Gen. Virol. 78, 3311-3315.

PENSAERT, M. B., J. P. KLUGE (1989): Pseudorabies virus (Aujeszky's disease). U: Virus infections of porcines. (Pensaert, M. B., ur.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, str. 39-64.

PENSAERT, M., G. LABARQUE, H. FAVOREEL, H. NAUWYNCK (2004): Aujeszky's Disease Vaccination and Differentiation of Vaccinated from Infected Pigs. Dev. Biol. Basel 119, 243-254.

PEPPER, M., M. K. JENKINS (2011): Origins of $CD4^+$ effector and central memory T cells. Nat. Immunol. 12, 467-471.

PERRY, A., P. LAMBERT (2011): *Propionibacterium acnes*: infection beyond the skin. Expert Rev. Anti Infect. Ther. 9, 1149-1156.

PESCOVITZ, M. D., A. G. SAKOPOULOS, J. A. GADDY, R. J. HUSMANN, F. A. ZUCKERMANN (1994a): Porcine peripheral blood $CD4^+/CD8^+$ dual expressing T-cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 53-62.

PESCOVITZ, M. D., B. AASTED, A. CANALS, J. DOMINGUEZ, J. S. VIZCAINO, R. POSPISIL, I. TREBICHAVSKY, H. SALMON, I. VALPOTIC, W. C. DAVIS, S. ARN, D. H. SACHS, J. K. LUNNEY, F. ZUCKERMAN, E WEILAND, A. SAALMÜLLER (1994b): Analysis of monoclonal antibodies reactive with the porcine CD4 antigen. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 233-236.

PESCOVITZ, M. D., B. K. BOOK, B. AASTED, J. DOMINGUEZ, A. EZQUERRA, I. TREBICHAVSKY, B. NOVIKOV, I. VALPOTIC, L. SVER, J. NIELSEN, S. ARN, D. H. SACHS, J. K. LUNNEY, P. C. BOYD, J. WALKER, R. LEE, W. DAVIS, I. R. BARBOSA, F. ZUCKERMANN, A. SAALMÜLLER (1998): Summary of workshop findings for antibodies reacting with porcine T-cells and activation antigens: results from the Second International Swine CD Workshop. Vet. Immunol. Immunopathol. 60, 251-260.

PINTARIČ, M., W. GRNER, A. SAALMÜLLER (2008): Synergistic effects of IL-2, IL-12 and IL-18 on cytolytic activity, perforin expression and IFN-γ production of porcine natural killer cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 121, 68-82.

PIRIOU-GUZYLACK, L., H. SALMON (2008): Membrane markers of the immune cells in swine: an update. Vet. Res. 39: 54.

POMORSKA-MÓL, M., I. MARKOWSKA-DANIEL (2010): Interferon-γ secretion and proliferative responses of peripheral blood mononuclear cells after vaccination of pigs against Aujeszky's disease in the presence of maternal immunity. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 58, 405-411.

PULVERER, G., H. L. KO, K. ROSZKOWSKI, W. ROSZKOWSKI, J. JELJASZEWICZ (1985): Immunomodulation by Propionibacteria. Clin. Immunol. Newsletter 6, 51-54.

QUINT, W., A. GIELKENS, J. VAN OIRSCHOT, A. BERNS, H. T. CUYPERS (1987): Construction and Characterization of Deletion Mutants of Pseudorabies Virus: a New Generation of 'Live' Vaccines. J. Gen. Virol. 68, 523-534.

REUTNER, K., J. LEITNER, A. MÜLLEBNER, A. LADINIG, S. E. ESSLER, J. C. DUVIGNEAU, M. RITZMANN, P. STEINBERGER, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2013): CD27 expression discriminates porcine T helper cells with functionally distinct properties. Vet. Res. 44: 18.

REVILLA, C., M. P. RODRÍGUEZ-CARREÑO, B. ALVAREZ, S. CHAMORRO, L. M. ALONSO, A. EZQUERRA, F. ALONSO, J. DOMÍNGUEZ (2004): 2E3, a new marker that selectively identifies porcine $CD4^+$ naive T cells. Dev. Comp. Immunol. 28, 239-250.

REVILLA, C., S. CHAMORRO, B. ALVAREZ, C. PÉREZ, A. EZQUERRA, F. ALONSO, J. DOMÍNGUEZ (2005a): Analysis of functional heterogeneity of porcine memory $CD4^+$ T cells. Dev. Comp. Immunol. 29, 479-488.

REVILLA, C., B. ALVAREZ, M. LÓPEZ-FRAGA, S. CHAMORRO, P. MARTÍNEZ, A. EZQUERRA, F. ALONSO, J. DOMÍNGUEZ (2005b): Differential expression of chemokine receptors and CD95 in porcine $CD4^+$ T cell subsets. Vet. Immunol. Immunopathol. 106, 295-301.

RIVERO-LEZCANO, O. M. (2008): Cytokines as Immunomodulators in Tuberculosis Therapy. Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov. 3, 168-176.

ROIĆ, B., L. JEMERŠIĆ, Z. KROVINA, S. TERZIĆ, A. JUNGIĆ, T. KEROS, J. PRPIĆ, D. BRNIĆ (2013): Nacionalni program nadziranja bolesti Aujeszkoga u domaćih svinja u R. Hrvatskoj tijekom 2011. godine. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 44,19-26.

ROMERO, C. H., P. N. MEADE, B. L. HOMER, J. E. SHULTZ, G. LOLLIS (2003): Potential sites of virus latency associated with indigenous pseudorabies viruses in feral swine. J. Wildl. Dis. 39, 567-575.

ROSZKOWSKI, W., K. ROSZKOWSKI, H. L. KO, J. BEUTH, J. JELJASZEWICZ (1990): Immunomodulation by Propionibacteria. Zentralbl. Bakteriol. 274, 289-298.

ROTHKÖTTER, H. J. (2009): Anatomical particularities of the porcine immune system-A physician's view. Dev. Comp. Immunol. 33, 267-272.

RZIHA, H. J., T. C. METTENLEITER, V. OHLINGER, G. WITTMANN (1986): Herpesvirus (Pseudorabies Virus) Latency in Swine: Occurrence and Physical State of Viral DNA in Neural Tissues. Virology 155, 600-613.

SAALMÜLLER, A., M. J. REDDEHASE, H. J. BÜHRING, S. JONJIĆ, U. H. KOSZINOWSKI (1987): Simultaneous expression of CD4 and CD8 antigens by a substantial proportion of resting porcine T lymphocytes. Eur. J. Immunol. 17, 1297-1301.

SAALMÜLLER, A., W. HIRT, S. MAURER, E. WEILAND (1994a): Discrimination between two subsets of porcine $CD8^+$ cytolytic T lymphocytes by the expression of CD5 antigen. Immunology 81, 578-583.

SAALMÜLLER, A., B. AASTED, A. CANALS, J. DOMINGUEZ, T. GOLDMAN, J. K. LUNNEY, S. MAURER, M. D. PESCOVITZ, R. POSPISIL, H. SALMON, A. SUMMERFIELD, H. TLASKALOVA, I. VALPOTIC, J. S. VIZCAINO, E. WEILAND, F. ZUCKERMANN (1994b): Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD5. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 237-242.

SAALMÜLLER, A., B. AASTED, A. CANALS, J. DOMINGUEZ, T. GOLDMAN, J. K. LUNNEY, S. MAURER, T. PAULY, M. D. PESCOVITZ, R. POSPISIL, H. SALMON, I. TREBICHAVSKY, I. VALPOTIC, J. S. VIZCAINO, E. WEILAND, F. ZUCKERMANN (1994c): Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD6. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 243-247.

SAALMÜLLER, A., B. AASTED, A. CANALS, J. DOMINGUEZ, T. GOLDMAN, J. K. LUNNEY, S. MAURER, M. D. PESCOVITZ, R. POSPISIL, H. SALMON, I. TREBICHAVSKY, I. VALPOTIC, J. S. VIZCAINO, F. ZUCKERMANN (1994d): Analyses of monoclonal antibodies reactive with porcine CD8. Vet. Immunol. Immunopathol. 43, 249-254.

SAALMÜLLER, A. (1996): Characterization of swine leukocyte differentiation antigens. Immunol. Today 17, 352-354.

SAALMÜLLER, A., T. WERNER, V. FACHINGER (2002): T-helper cells from naive to committed. Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 137-145.

SALLUSTO, F., D. LENIG, R. FÖRSTER, M. LIPP, A. LANZAVECCHIA (1999): Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature 401, 708-712.

SALLUSTO, F., J. GEGINAT, A. LANZAVECCHIA (2004): Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets: Function, Generation, and Maintenance. Annu. Rev. Immunol. 22, 745-763.

SCHANG, L. M., G. F. KUTISH, F. A. OSORIO (1994): Correlation between Precolonization of Trigeminal Ganglia by Attenuated Strains of Pseudorabies Virus and Resistance to Wild-Type Virus Latency. J. Virol. 68, 8470-8476.

SCHMITT, B. J., F. A. OSORIO, W. W. STROUP, E. P. GIBBS (1991): A comparison of differential diagnostic tests to detect antibodies to pseudorabies glycoproteins gX, gI, and gIII in naturally infected feral pigs. J. Vet. Diagn. Investig. 3, 344-345.

SEDLAK, C., M. PATZL, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2014a): CD2 and CD8α define porcine γδ T cells with distinct cytokine production profiles. Dev. Comp. Immunol. 45, 97-106.

SEDLAK, C., M. PATZL, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2014b): IL-12 and IL-18 induce interferon-γ production and *de novo* CD2 expression in porcine γδ T cells. Dev. Comp. Immunol. 47, 115-122.

SHEKHAR, S., S. MILLING, X. YANG (2012): Migration of γδ T cells in steady-state conditions. Vet. Immunol. Immunopathol. 147, 1-5.

SIPOS, W., J. C. DUVIGNEAU, P. PIETSCHMANN, F. SCHILCHER, G. HOFBAUER, R. T. HARTL, F. SCHMOLL (2005): Porcine dermatitis and nephropathy syndrome (PDNS) is associated with a systemic cytokine expression profile indicative of proinflammation and a Th1 bias. Vet. Immunol. Immunopathol. 107, 303-313.

SIVORI, S., M. VITALE, L. MORELLI, L. SANSEVERINO, R. AUGUGLIARO, C. BOTTINO, L. MORETTA, A. MORETTA (1997): p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. J. Exp. Med. 186, 1129-1136.

SPICKLER, A. R., J. A. ROTH (2003): Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. J. Vet. Intern. Med. 17, 273-281.

STEGMAN, J. A., A. VAN NES, M. C. M. DE JONG, F. W. M. M. BOLDER (1995): Assessment of the effectiveness of vaccination against pseudorabies in finishing pigs. Am. J. Vet. Res. 56, 573-578.

STEGMAN, A., M. C. M. DE JONG, A. VAN NES, A. BOUMA (1997): Dynamics of pseudorabies virus infections in vaccinated pig populations: A review. Vet. Q. 19, 117-122.

STELLMANN, C., P. VANNIER, G. CHAPPUIS, A. BRUN, M. DAUVERGNE, D. FARGEAUD, M. BUGAUD, X. COLSON (1989): The potency testing of pseudorabies vaccines in pigs. A proposal for a quantitative criterion and a minimum requirement. J. Biol. Stand. 17, 17-27.

STEPANOVA, H., P. SAMANKOVA, L. LEVA, J. SINKORA, M. FALDYNA (2007): Early postnatal development of the immune system in piglets: The redistribution of T lymphocyte subsets. Cell Immunol. 249, 73-79.

STEPANOVA, H., M. MENSIKOVA, K. CHLEBOVA, M. FALDYNA (2012): $CD4^+$ and $\gamma\delta TCR^+$ T lymphocytes are sources of interleukin-17 in swine. Cytokine 58, 152-157.

STEPANOVA, K., M. SINKORA (2013): Porcine γδ T Lymphocytes Can Be Categorized into Two Functionally and Developmentally Distinct Subsets according to Expression of CD2 and Level of TCR. J. Immunol. 190, 2111-2120.

STORSET, A. K., S. KULBERG, I. BERG, P. BOYSEN, J. C. HOPE, E.DISSEN (2004): NKp46 defines a subset of bovine leukocytes with natural killer cell characteristics. Eur. J. Immunol. 34, 669-676.

SUMMERFIELD, A., H. J. RZIHA, A. SAALMÜLLER (1996): Functional Characterization of Porcine $CD4^+CD8^+$ Extrathymic T Lymphocytes. Cell Immunol. 168, 291-298.

SUMMERFIELD, A, L. GUZYLACK-PIRIOU, A. SCHAUB, C. P. CARRASCO, V. TÂCHE, B. CHARLEY, K. C. MCCULLOUGH (2003): Porcine peripheral blood dendritic cells and natural interferon-producing cells. Immunology 110, 440-449.

SUMMERFIELD, A., K. C. MCCULLOUGH (2009): The porcine dendritic cell family. Dev. Comp. Immunol. 33, 299-309.

SUN, P., J. Q. WANG, H. T. ZHANG (2010): Effects of *Bacillus subtilis natto* on performance and imune function of preweaning calves. J. Dairy Sci. 93, 5851-5855.

SWENSON, S. L., J. MCMILLEN, H. T. HILL (1993): Evaluation of the safety and efficacy of a thymidine kinase, inverted repeat, gI, and gpX gene-deleted pseudorabies vaccine. J. Vet. Diagn. Invest. 5, 341-346.

ŠINKORA, M., J. ŠINKORA, Z. ŘEHÁKOVÁ, I. ŠPLÍCHAL, H. YANG, R. M. E. PARKHOUSE, I. TREBICHAVSKÝ (1998): Prenatal ontogeny of lymphocyte subpopulations in pigs. Immunology 95, 595-603.

ŠINKORA, M., J. SUN, J. ŠINKOROVÁ, R. K. CHRISTENSON, S. P. FORD, J. E. BUTLER (2003): Antibody Repertoire Development in Fetal and Neonatal Piglets. VI. B Cell Lymphogenesis Occurs at Multiple Sites with Differences in the Frequency of In-frame Rearrangements. J. Immunol. 170, 1781-1788.

ŠINKORA, M., J. ŠINKOROVÁ, W. HOLTMEIER (2005): Development of γδ thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny. Immunology 115, 544-555.

ŠINKORA, M., J. E. BUTLER (2009.): The ontogeny of the porcine immune system. Dev. Comp. Immunol. 33, 273-283.

ŠTĚPÁNOVÁ, K., M. ŠINKORA (2012): The expression of CD25, CD11b, SWC1, SWC7, MHC-II, and family of CD45 molecules can be used to characterize different stages of γδ T lymphocytes in pigs. Dev. Comp. Immunol. 36, 728-740.

TAKAMATSU, H. H., M. S. DENYER, T. E. WILEMAN (2002): A sub-population of circulating porcine γδ T cells can act as professional antigen presenting cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 87, 223-224.

TAKAMATSU, H. H., M. S. DENYER, C. STIRLING, S. COX, N. AGGARWAL, P. DASH, T. E. WILEMAN, P. V. BARNETT (2006): Porcine γδ T cells: Possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 112, 49-61.

TALKER, S. C., T. KÄSER, K. REUTNER, C. SEDLAK, K. H., MAIR, H. KOINIG, R. GRAAGE, M. VIEHMANN, E. KLINGLER, A. LADINIG, M. RITZMANN, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2013): Phenotypic maturation of porcine NK- and T-cell subsets. Dev. Comp. Immunol. 40, 51-68.

TALKER, S. C., H. C. KOINIG, M. STADLER, R. GRAAGE, E. KLINGLER, A. LADINIG, K. H. MAIR, S. E. HAMMER, H. WEISSENBÖCK, R. DÜRRWALD, M. RITZMANN, A. SAALMÜLLER, W. GERNER (2015): Magnitude and kinetics of multifunctional $CD4^+$ and CD8β+ T cells in pigs infected with swine influenza A virus. Vet. Res. 46: 52.

TANG, W. R., N. SHIOYA, T. EGUCHI, T. EBATA, J. MATSUI, H. TAKENOUCHI, D. HONMA, H. YASUE, Y. TAKAGAKI, S. ENOSAWA, M. ITAGAKI, T. TAGUCHI, N. KIYOKAWA, H. AMEMIYA, J. FUJIMOTO (2005): Characterization of new monoclonal antibodies against porcine lymphocytes: molecular characterization of clone 7G3, an antibody reactive with the constant region of the T-cell receptor δ-chains. Vet. Immunol. Immunopathol. 103, 113-127.

TERZIĆ, S, L. ŠVER, I. VALPOTIĆ, M. LOJKIĆ, Z. MILETIĆ, L. JEMERŠIĆ, G. LACKOVIĆ, A. KOVŠCA-JANJATOVIĆ, N. ORŠOLIĆ (2002): Immunophenotyping of Leukocyte Subsets in Peripheral Blood and Palatine Tonsils of Prefattening Pigs. Vet. Res. Commun. 26, 273-283.

TERZIĆ, S., L. JEMERŠIĆ, M. LOJKIĆ, L. ŠVER, I. VALPOTIĆ, N. ORŠOLIĆ, A. HUMSKI, Ž. CVETNIĆ (2004): Leukocyte subsets and specific antibodies in pigs vaccinated with a classical swine fever subunit (E2) vaccine and the attenuated ORF virus strain D1701. Acta Vet. Hung. 52, 151-161.

THORN, C. E. (2010): Hematology of the Pig. U: Schalm's Veterinary Hematology. (Weiss, D. J., K. J. Wardrop, ur.), Wiley-Blackwell, Ames, str. 843-851.

TIZARD, I. R. (2000a): Resistance to Viruses. U: Veterinary Immunology: An Introduction. (Tizard, I. R., ur.), W. B. Saunders Company, Philadelphia, str. 267-279.

TIZARD, I. R. (2000b): Lymphocytes. U: Veterinary Immunology: An Introduction. (Tizard, I. R., ur.), W. B. Saunders Company, Philadelphia, str. 84-97.

TIZARD, I. R. (2000c): Cytokines and the Immune System. U: Veterinary Immunology: An Introduction. (Tizard, I. R., ur.), W. B. Saunders Company, Philadelphia, str. 127-138.

TIZARD, I. R. (2013a): Innate Immunity: Neutrofils and Phagocytosis. U: Veterinary Immunology. (Tizard, I. R., ur.), Elsevier Saunders, St. Louis, str. 30-40.

TIZARD, I. R. (2013b): Dendritic Cells and Antigen Processing. U: Veterinary Immunology. (Tizard, I. R., ur.), Elsevier Saunders, St. Louis, str. 91-101.

TOKA, F. N., C. K. NFON, H. DAWSON, D. M. ESTES, W. T. GOLDE (2009): Activation of Porcine Natural Killer Cells and Lysis of Foot-and-Mouth Disease Virus Infected Cells. J. Interferon Cytokine Res. 29, 179-192.

TRAPERO-MARUGÁN, M., L. GARCÍA-BUEY, C. MUÑOZ, N. E. QUINTANA, J. A. MORENO-MONTEAGUDO, M. J. BORQUE, M. J. FERNÁNDEZ, F. R. SALVANÉS, J. MEDINA, R. MORENO-OTERO (2006): Sustained virological response to peginterferon plus ribavirin in chronic hepatitis C genotype 1 patients is associated with a persistent Th1 immune response. Aliment. Pharmacol. Ther. 24, 117-128.

TREVISI, P., G. MERIALDI, M. MAZZONI, L. CASINI, C. TITTARELLI, S. DE FILIPPI, L. MINIERI, G. LALATTA-COSTERBOSA, P. BOSI (2007): Effect of dietary addition of thymol on growth, salivary and gastric function, immune response and excretion of Salmonella enterica serovar Typhimurium, in weaning pigs challenged with this microbe strain. Ital. J. Anim. Sci. 6, 374-376.

VAN DE VEERDONK, F. L., B. J. KULLBERG, M. G. NETEA (2012): Adjunctive immunotherapy with recombinant cytokines for the treatment of disseminated candidiasis. Clin. Microbiol. Infect. 18, 112-119.

VANDEPUTTE, J., G. CHAPPUIS, D. FARGEAUD, P. PRÉCAUSTA, F. GUILLEMIN, A. BRUN, P. DESMETTRE, C. STELLMANN (1990): Vaccination against Pseudorabies with glycoprotein gI+ or glycoprotein gI- vaccine. Am. J. Vet. Res. 51, 1100-1106.

VANNIER, P. (1985): Experimental infection of fattening pigs with pseudorabies (Aujeszky's disease) virus: efficacy of attenuated live- and inactivated-virus vaccines in pigs with or without passive immunity. Am. J. Vet. Res. 46, 1498-1

VANNIER, P. (1986): Vaccination against Aujeszky's Disease by Different Routes using Live Attenuated and Inactivated Virus Vaccines in Pigs with or without Passive Immunity. J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health 33, 704-721.

VAN OIRSCHOT, J. T., H. J. RZIHA, P. J. MOONEN, J. M. POL, D. VAN ZAANE (1986): Differentiation of Serum Antibodies from Pigs Vaccinated or Infected with Aujeszky's Disease Virus by a Competitive Enzyme Immunoassay. J. Gen. Virol. 67, 1179-1182.

VAN OIRSCHOT, J. T. (1999): Diva vaccines that reduce virus transmission. J. Biotechnol. 73, 195-205.

VAN ROOIJ, E. M. A., B. L. HAAGMANS, Y. E. DE VISSER, M. G. M. DE BRUIN, W. BOERSMA, A. T. J. BIANCHI (1998): Effect of vaccination route and composition of DNA vaccine on the induction of protective immunity against pseudorabies infection in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 66, 113-126.

VAN ROOIJ, E. M. A., B. L. HAAGMANS, H. L. GLANSBEEK, Y. E. DE VISSER, M. G. M. DE BRUIN, W. BOERSMA, A. T. J. BIANCHI (2000): A DNA vaccine coding for glycoprotein B of pseudorabies virus induces cell-mediated immunity in pigs and reduces virus excretion early after infection. Vet. Immunol. Immunopathol. 74, 121-136.

VAN ROOIJ, E. M. A., M. G. M. DE BRUIN, Y. E. DE VISSER, W. G. J. MIDDEL, W. J. A. BOERSMA, A. T. J. BIANCHI (2004): Vaccine-induced T cell-mediated immunity plays a critical role in early protection against pseudorabies virus (suid herpes virus type 1) infection in pigs. Vet. Immunol. Immunopathol. 99, 113-125.

VAN ROOIJ, E. M. A., H. W. MOONEN-LEUSEN, Y. E. DE VISSER, W. G. J. MIDDEL, W. J. A. BOERSMA, A. T. J. BIANCHI (2006): A DNA vaccine coding for gB and gD of pseudorabies virus (suid herpes type 1) primes the immune system in the presence of maternal immunity more efficiently than conventional vaccines. Vaccine 24, 1264-1273.

VAN ROOIJ, E. M. A., F. A. M. RIJSEWIJK, H. W. MOONEN-LEUSEN, A. T. J. BIANCHI, H. J. RZIHA (2010): Comparison of different prime-boost regimes with DNA and

recombinant Orf virus based vaccines expressing glycoprotein D of pseudorabies virus in pigs. Vaccine 28, 1808-1813.

VENTRELLA, D., F. DONDI, F. BARONE, F. SERAFINI, A. ELMI, M. GIUNTI, N. ROMAGNOLI, M. FORNI, M. L. BACCI (2017): The biomedical piglet: establishing reference intervals for haematology and clinical chemistry parameters of two age groups with and without iron supplementation. BMC Vet. Res. 13: 23.

VILNIS, A., M. D. SUSSMAN, B. J. THACKER, M. SENN, R. K. MAES (1998): Vaccine genotype and route of administration affect pseudorabies field virus latency load after challenge. Vet. Microbiol. 62, 81-96.

VISSER, N., W. EGGER, D. LÜTTICKEN (1994): Intradermal application of Aujeszky's disease virus strain Begonia with tocopherol-based adjuvant and a novel design injection device. Acta Vet. Hung. 42, 413-418.

VISSER, N. (1997): Vaccination strategies for improving the efficacy of programs to eradicate Aujeszky's disease virus. Vet. Microbiol. 55, 61-74.

VOGEL, F. R. (2000): Improving Vaccine Performance with Adjuvants. Clin. Infect. Dis. 30, S266-S270.

WEBER, O., A. A. MERCER, A. FRIEBE, P. KNOLLE, H. D. VOLK (2013): Therapeutic immunomodulation using a virus-the potential of inactivated orf virus. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 32, 451-460.

WESTGAARD, I. H., S. F. BERG, J. T. VAAGE, L. L. WANG, W. M. YOKOYAMA, E. DISSEN, S. FOSSUM (2004): Rat NKp46 activates natural killer cell cytotoxicity and is associated with FcεRIγ and CD3ζ. J. Leukoc. Biol. 76, 1200-1206.

WHITE, A. K., J. CIACCI-ZANELLA, J. GALEOTA, S. ELE, F. A. OSORIO (1996): Comparison of the abilities of serologic tests to detect pseudorabies-infected pigs during the latent phase of infection. Am. J. Vet. Res. 57, 608-611.

WILDEMAN, P., H. BRÜGGEMANN, C. F. P. SCHOLZ, A. LEIMBACH, B. SÖDERQUIST (2016): *Propionibacterium avidum* as an Etiological Agent of Prosthetic Hip Joint Infection. PLoS One. 11: e0158164.

WILSON, S. M., B. N. WILKIE (2007): B-1 and B-2 B-cells in the pigcannot be differentiated by expression of CD5. Vet. Immunol. Immunopathol. 115, 10-16.

WITTMANN, G., H. J. RZIHA (1989): Aujeszky's disease (pseudorabies) in pigs. U: Herpesvirus diseases of cattle, horses and pigs. (Knipe, D. M., P. M. Howley, ur.), Kluwer Academic Publishers, Boston, str. 230-325.

WU, R., C. BAI, J. SUN, S. CHANG, X. ZHANG (2013): Emergence of virulent pseudorabies virus infection in Northern China. J. Vet. Sci. 14, 363-365.

WU, C. Y., C. M. LIAO, J. N. CHI, M. S. CHIEN, C. HUANG (2016): Growth properties and vaccine efficacy of recombinant pseudorabies virus defective in glycoprotein E and thymidine kinase genes. J. Biotechnol. 229, 58-64.

WYCISLO, K. L., T. M. FAN (2015): The Immunotherapy of Canine Osteosarcoma: A Historical and Systematic Review. J. Vet. Intern. Med. 29, 759-769.

YANG, H., R. M. E. PARKHOUSE (1996.): Phenotypic classification of porcine lymphocyte sub-populations in blood and lymphoid tissues. Immunology 89, 76-83.

YANG, H., C. A. L. OURA, P. A. KIRKHAM, R. M. E. PARKHOUSE (1996): Preparation of monoclonal anti-porcine CD3 antibodies and preliminary characterization of porcine T lymphocytes. Immunology 88, 577-585.

YANG, H., R. M. E. PARKHOUSE (1997): Differential expression of CD8 epitopes amongst porcine CD8-positive functional lymphocyte subsets. Immunology 92, 45-52.

YANG, H., R. M. E. PARKHOUSE, T. WILEMAN (2005): Monoclonal antibodies that identify the CD3 molecules expressed specifically at the surface of porcine γδ-T cells. Immunology 115, 189-196.

YUAN, S. L., X. S. PIAO, D. F. LI, S. W. KIM, H. S. LEE, P. F. GUO (2006): Effects of dietary *Astragalus polysaccharide* on growth performance and immune function in weaned pigs. Anim. Sci. 62, 501-507.

ZABEL, M. D., J. H. WEIS (2001): Cell-specific regulation of the CD21 gene. Int. Immunopharmacol. 1, 483-493.

ZARIPOV, M. M., O. S. MORENKOV, B. SIKLODI, I. BARNA-VETRO, A. GYÖNGYÖSI-HORVATH, I. FODOR (1998): Glycoprotein B of Aujeszky's disease virus: topographical epitope mapping and epitope-specific antibody response. Res. Virol. 149, 29-41.

ZUCKERMANN, F. A., L. ZSAK, T. C. METTENLEITER, T. BEN-PORAT (1990): Pseudorabies Virus Glycoprotein gIII Is a Major Target Antigen for Murine and Swine Virus-Specific Cytotoxic T Lymphocytes. J. Virol. 64, 802-812.

ZUCKERMANN, F. A., R. J. HUSMANN (1996): Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. Immunology 87, 500-509.

ZUCKERMANN F. A., R. J. HUSMANN, R. SCHWARTZ, J. BRANDT, E. MATEU DE ANTONIO, S. MARTIN (1998): Interleukin-12 enhances the virus-specific interferon gamma response of pigs to an inactivated pseudorabies virus vaccine. Vet. Immunol. Immunopathol. 63, 57-67.

ZUCKERMANN, F. A. (1999): Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. Vet. Immunol. Immunopathol. 72, 55-66.

ZUCKERMANN, F. A. (2000): Aujeszky's disease virus: opportunities and challenges. Vet. Res. 31, 121-131.

ŽUPANČIĆ, Ž., B. JUKIĆ, M. LOJKIĆ, Ž. ČAČ, L. JEMERŠIĆ, V. STAREŠINA (2002): Prevalence of Antibodies to Classical Swine Fever, Aujeszky’s Disease, Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome, and Bovine Viral Diarrhoea Viruses in Wild Boars in Croatia. J. Vet. Med. B, Infect. Dis. Vet. Public Health 49, 253-256.

9. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH ZNANSTVENIH RADOVA

Miroslav Andrišić rođen je 20. 04. 1978. godine u Osijeku. U Valpovu je završio osnovnu i srednju školu. Veterinarski fakultet sveučilišta u Zagrebu upisao je 1997. godine, a diplomirao je 2006. godine. Vježbenički staž je odradio u Veterinarskoj stanici Valpovo između 2006. i 2007. godine, nakon čega je položio stručni ispit i stekao stručnu osposobljenost za samostalni rad na poslovima doktora veterinarske medicine.

Od listopada 2007. godine zaposlen je u Laboratoriju za analizu veterinarsko-medicinskih pripravaka Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu, gdje radi na procjeni dokumentacije o veterinarsko-medicinskim proizvodima (VMP) u svrhu njihovog odobravanja za stavljanje u promet i kontroli kvalitete VMP-a. Od svibnja 2011. godine zaposlen je na mjestu znanstvenog novaka na radnom mjestu asistenta u istom laboratoriju. U Europskoj agencije za lijekove i medicinske proizvode (EMA) u Londonu od 2013. godine sudjeluje u radu Radnih skupina za VMP-e, a od 2014. godine član je Povjerenstva za VMP-e Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske.

Tijekom rada u Hrvatskom veterinarskom institutu prošao je edukacije vezane uz sustav upravljanja kvalitetom i akreditacije laboratorija sukladno Normi HR 17025. Također je sudjelovao u edukacijama i usavršavao se na području procjene dokumentacije o VMP-ima i rada s laboratorijskim životinjama na sljedećim radionicama:

1. „*Assessment of immunological part*”, French Agency for Veterinary Medicinal Products (ANMV) within French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (AFFSA), Fougéres, Francuska.
2. „*Study visit on veterinary medicinal products* (VMP)”, Veterinary Medicines Directorate (VMD), Woking, UK.
3. „*Laboratory animal science course* (FELASA cat. C equivalent)”, Galapagos, Zagreb, Croatia.
4. „*Workshop on the protection of animals used for scientific purposes*”, Hotel Panorama, Zagreb, Croatia.

Do sada je objavio četiri cjelovita znanstvena rada i jedan poster u časopisima indeksiranim *Current Contents*, tri znanstvena rada u drugim časopisima, sedam stručnih radova i sažetka u zbornicima skupova.

POPIS JAVNO OBJAVLJENIH RADOVA (ZNANSTVENIH I STRUČNIH) I POSTERA:

Izvorni znanstveni i pregledni radovi u CC časopisima

1. PLEADIN, J., A. VULIĆ, N. PERŠI, S. TERZIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ (2013): Rapid Immunoassay Method for the Determination of Clenbuterol and Salbutamol in Blood. J. Anal. Toxicol. 37, 241-245.

2. PLEADIN, J., A. VULIĆ, N. PERŠI, S. TERZIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, E. PERAK (2013): Comparison of ractopamine residue depletion from internal tissues. Immunopharmacol. Immunotoxicol. 35, 88-92.

3. PLEADIN, J., A. VULIĆ, N. PERŠI, S. TERZIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, E. PERAK, Ž. MIHALJEVIĆ (2013): Accumulation of Ractopamine Residues in Hair and Ocular Tissues of Animals during and after Treatment. J. Anal. Toxicol. 37, 117-121.

4. ŠANDOR, K., S. TERZIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, E. PERAK (2012): In-use stability of enrofloxacin solution for injection in multi-dose container. Acta Vet. Beograd 62, 213-225.

Znanstveni radovi u drugim časopisima

1. TERZIĆ, S., J. PLEADIN, K. ŠANDOR, A. VULIĆ, N. PERŠI, I. ŽARKOVIĆ, M. ANDRIŠIĆ, L. JEMERŠIĆ, M. WEBER SUŠANJ (2012): Aflatoxin B_1 in wheat bran containing premixes. Vet. arhiv 82, 155-166.

2. TERZIĆ, S., M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. BALLARIN PERHARIĆ, K. ŠANDOR, S. ŠPIČIĆ (2010): Određivanje biološke aktivnosti tuberkulina na zamorčadi. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 41, 483-491.

3. ŠANDOR, K., S. TERZIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ (2009): Mjerna nesigurnost rezultata analize sadržaja florfenikola u otopinama za injekcije. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 6, 353-359.

Ostali radovi u drugim časopisima

1. TERZIĆ, S., K. ŠANDOR, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, E. PERAK (2011): Krivotvoreni veterinarsko-medicinski proizvodi - potencijalna opasnost. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 42, 175-180.

2. ŽARKOVIĆ, I., M. ANDRIŠIĆ, K. ŠANDOR, E. PERAK, S. TERZIĆ (2011): Kontrola kvalitete veterinarsko-medicinskih proizvoda u HVI-u. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 43, 263-268.

3. ANDRIŠIĆ, M., I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, S. TERZIĆ (2010): Najčešće primjedbe pri procjeni dokumentacije o veterinarsko-medicinskim proizvodima. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 41, 349-355.

4. TERZIĆ, S., K. ŠANDOR, I. ŽARKOVIĆ, M. ANDRIŠIĆ (2009): Veterinarsko-medicinski proizvodi kontrolirani u Hrvatskom veterinarskom institutu tijekom 2008. godine. Veterinarska stanica: znanstveno-stručni veterinarski časopis 40, 225-233.

Kongresno priopćenje (sažeci) u CC časopisu

1. PLEADIN, J., A. VULIĆ, N. PERŠI, S. TERZIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, E. PERAK (2012): Comparison of ractopamine accumulation in tissues on days after treatment. Proceedings of 48th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2012), 17-20 June, Stockholm, Sweden, pp. 53-54.

Objavljena pozvana predavanja na skupovima

1. TERZIĆ, S., K. ŠANDOR, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ, A. VUJNOVIĆ (2016): Krivotvoreni veterinarsko-medicinski proizvodi. 6. Hrvatski veterinarski kongres s

međunarodnim sudjelovanjem, Zbornik radova, 26-29. listopada, Opatija, Republika Hrvatska, str. 55-61.

Sažeci u zbornicima skupova

1. ANDRIŠIĆ, M., I. ŽARKOVIĆ, K. ŠANDOR, S. TERZIĆ (2009): Procjena dokumentacije za izradu izvješća u svrhu odobrenja za stavljanje u promet veterinarsko-medicinskih proizvoda u Republici Hrvatskoj. Znanstveno stručni sastanak Veterinarska znanost i struka: zbornik sažetaka, 01-02. listopada, Zagreb, Hrvatska, str. 126-127.

2. ŠANDOR, K., S. TERZIĆ, M. ANDRIŠIĆ, I. ŽARKOVIĆ (2009): Određivanje sadržaja amoksicilin trihidrata u injekcijskim suspenzijama HPLC metodom., Znanstveno stručni sastanak Veterinarska znanost i struka: zbornik sažetaka, 01-02. listopada, Zagreb, Hrvatska, str. 56-57.

3. ŽARKOVIĆ, I., M. ANDRIŠIĆ, K. ŠANDOR, S. TERZIĆ (2009): Kontrola kvalitete veterinarsko-medicinskih proizvoda u Hrvatskom veterinarskom institutu. Znanstveno stručni sastanak Veterinarska znanost i struka: zbornik sažetaka, 01-02. listopada, Zagreb, Hrvatska, str. 164-165.