

ANKARA KEÇİLERİNİN PERİFER KAN T VE B LENFOSİTLERİNİN ALFA NAFTİL ASETAT ESTERAZ VE YÜZEY İMMUNGLOBULİN BOYAMA YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

Nevin Kurtdede¹
Hikmet Altunay¹

Reşat Nuri Aştı²
Cevdet Akdeniz³

Use of alpha-naphthyl acetate esterase and surface immunoglobulin staining to identify T and B lymphocytes in Angora goats.

Summary: The purpose of this study was to determine the percentage of the peripheral blood T lymphocytes and the localization of ANAE enzyme at the electron microscopic level in various ages of Angora goats by using alpha-naphthyl acetate esterase procedure and to establish the percentage of the B lymphocytes by using SIg staining.

Blood samples were obtained from 10 Angora goats on the day of birth and subsequently on days 7, 14, 21, 28 and 60 days postnatally and from twenty adult Angora goats.

The percentage of the ANAE and SIg positive lymphocytes in various ages of Angora goats were 59,3-63,9% and 35,2-41,0% respectively. The percentage of the ANAE negative and SIg positive lymphocytes were similar each other.

It has been demonstrated that monocytes, platelets, neutrophils and eosinophil granulocytes showed a diffuse granular positivity.

In the electron microscopic examination, ANAE positive reaction were seen in lizozomal granules found in lymphocytes, monocytes, platelets, neutrophils and eosinophil granulocytes.

Özet: Bu çalışma, ANAE enzim boyaması ile değişik yaşlardaki Ankara keçilerinin perifer kan T lenfosit oranlarının saptanması, enzimin ince yapı düzeyindeki lokalizasyonunun tesbiti ve SIg boyaması ile B lenfosit oranının belirlenmesi amacıyla yapıldı.

Çalışmada, 20 adet erişkin, 10 adet yeni doğmuş Ankara keçisinden alınan kan örnekleri materyal olarak kullanıldı. Yeni doğmuş hayvanlardan doğdukları gün, 7, 14, 21, 28. ve 60. günlerde perifer kan örnekleri alındı.

Değişik yaş gruplarında ANAE pozitif lenfosit oranının %59,3-63,9; SIg pozitif lenfosit oranının ise %35,2-41,0 arasında değiştiği saptandı. ANAE negatif lenfosit oranının, SIg pozitif lenfosit oranına yakın olduğu gözlemlendi.

Monosit, kan pulcukları, eozinofil ve nötrofil granulositlerin diffuz granüler pozitif reaksiyon gösterdikleri tesbit edildi.

Elektron mikroskopu ile yapılan incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı pozitif reaksiyona lenfosit, monosit, kan pulcukları, eozinofil ve nötrofil granulositlerinde bulunan lizozomal granüllerin içinde rastlandı.

Giriş

Perifer kan lenfositleri, immunolojik özelliklerine göre T ve B lenfositleri olarak sınıflandırılır (1, 6). Bu lenfosit tipleri, sağlıklı bir canlının perifer kanında belirli oranlarda bulunurken, bazı proliferatif hastalıklarda bu

1 Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

2 Prof. Dr., A.Ü. Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

3 Vet. Hek., Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü, Ankara.

oranlarda önemli sapmalar şekillenmektedir (1, 6, 9, 16). İmmun yetmezlik hastalıklarının teşhisi, lenfositik lösemilerde orijinin ortaya çıkarılabilmesi, kanser olgularında seluler immunitede meydana gelen değişikliklerin saptanabilmesi için perifer kan T ve B lenfosit oranının belirlenmesi gerekir (6).

Lenfosit tiplerinin ayırılması amacıyla kullanılmakta olan yöntemler hem oldukça pahalı, hem uzun zaman almakta ve pekçoğu da doku kesitlerine uygulanamamaktadır. Bu nedenle, gerek frotilerde ve gerekse doku kesitlerinde uygulanabilecek pratik bir yöntemin geliştirilmesi amacıyla çeşitli araştırmalar (2, 8, 9, 11) yapılmıştır. Son yıllarda, nonspesifik esterazlardan olan alfa naftil esetat esterazın (ANAE) T lenfositlerinde bulunduğu, B lenfositlerinde ise bulunmadığı çeşitli araştırmacılar (2, 8, 11, 19, 26) tarafından bildirilmiştir. ANAE pozitif reaksiyonun T hücrelerinde 1-2 adet lokalize granül şeklinde gözleendiği, B lenfositlerinin ANAE boyamasına karşı negatif reaksiyon verdiği araştırmacılar (2, 8, 9, 11, 18) tarafından ileri sürülmüştür. ANAE boyama metodu ile perifer kan T lenfosit oranı insanda %60 (19), sığırdada %64.2 (26), kanatlıda %60 (15) olarak bulunmuştur.

ANAE enziminin lizozomal enzim olduğu çeşitli araştırmacılar (8, 18, 27) tarafından ileri sürülmüştür. Bozdech ve Bainton (4) elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalarında alfa naftil butirat esteraz (ANBE) aktivitesinin, monosit ve lenfositlerin lizozomları içinde olduğunu göstermişlerdir.

Yüzey immunglobulin (surface Ig-SIg) boyama metodu ile perifer kan B lenfosit oranı insanda %26-40 (8), sığırdada %32 (16), kanatlıda %17 (15) olarak bulunmuştur.

Bu çalışmada, ANAE enzimi ve yüzey immunglobulinlerinin demonstrasyonu, Ankara keçilerinin perifer kan T ve B lenfosit oranlarının belirlenmesi ve ANAE enziminin ince yapı düzeyindeki yerleşiminin saptanması amaçlandı.

Materyal ve Metot

Çalışmada, değişik yaşlardaki 30 sağlıklı Ankara keçisinden alınan heparinize kan örnekleri materyal olarak kullanıldı. Bu hayvanlardan 20'si erişkin, 10'u ise yeni doğmuş olanlardan seçildi. Yeni doğmuş hayvanlardan doğdukları gün, 7, 14, 21, 28. ve 60. günlerde perifer kan örnekleri alındı.

Alınan kan örneklerinden, alfa naftil asetat esteraz enzimi (ANAE) demonstrasyonu için frotiler hazırlanarak havada kurutuldu ve

ANAE enzim boyaması (18) uygulanarak, bunlar ışık mikroskopta incelendiler.

İnce yapıya yönelik araştırmalar için, her hayvandan alınan heparinize kan örneklerinin yarısı, lenfosit izolasyonu yapıldıktan sonra Karnovsky (10) yöntemine göre glutaraldehid paraformaldehid tesbit sıvısı ile tesbit edildi. 1200 dev/dak.'da 10 dakika santrifüje edildikten sonra çökelti üzerine 50°C'de erimiş %2'lik agar'dan 1-2 damla damlatılarak tüp içeriği temiz bir lam üzerine döküldü. Agar donduktan sonra küçük parçacıklar halinde kesilerek %1'lik ozmik asitte iki saat süreyle tesbit edildi. Parçalar Araldit M'de bloklandı. İnce kesitler Reynold's (23) yöntemiyle boyanarak Carl Zeiss EM 9S-2 model mikroskopta incelendi.

Heparinize kan örneklerinin diğer yarısı ise elektron mikroskopta alfa naftil asetat esteraz enzimini demonstre etmek (27) için kullanıldı. Lenfosit izolasyonundan sonra glutaraldehid-aseton ile tesbit yapıldı ve süspansiyon içinde alfa naftil asetat esteraz enzim boyaması 45 dakika süreyle uygulandı; yukarıda anlatılan tekniğe göre elektron mikroskop'a hazırlandı. Ancak, bu örneklere ozmik asit tesbiti uygulanmadığı gibi, ince kesitlere kurşun sitrat boyaması da yapılmadı.

B lenfositlerdeki yüzey immunglobulinlerinin (SIg) demonstrasyonu B lenfosit kiti (Sigma diagnostic kit) kullanılarak yapıldı.

ANAE ve SIg boyama metodlarıyla hazırlanan her preparattaki 3 değişik alanda yüzerden üçyüz lenfosit sayılarak pozitif lenfosit oranları saptandı.

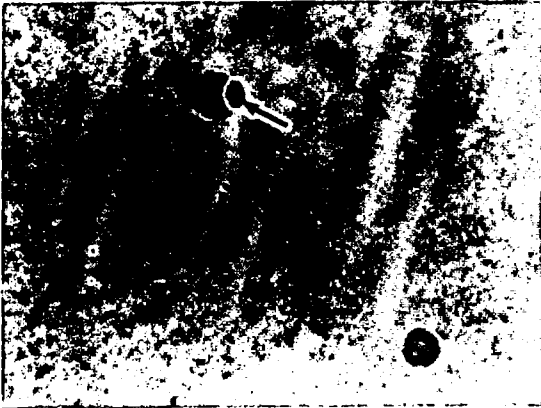
Bulgular

Işık mikroskobu ile yapılan incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı pozitif lenfositlerin büyük çoğunluğunda sayıları 1-2 arasında değişen spesifik kırmızı granüller gözleendi (Şekil 1 ok). Nötrofil granulositlerde granuler pozitiviteye rastlandı (Şekil 2 oklar). Eozinofil granulosit ve monositlerde kuvvetli, diffuz granuler pozitivite tesbit edildi.

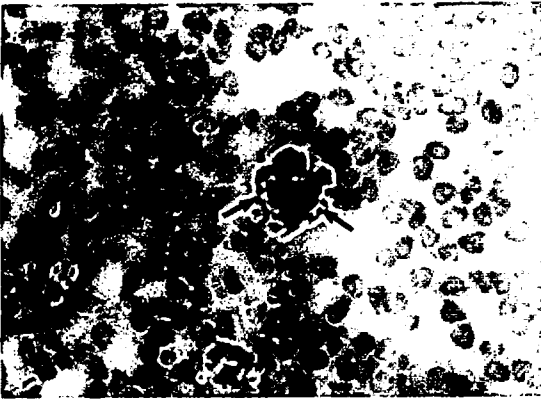
SIg boyaması uygulanan preparatlarda, B lenfositlerde SIg'lerinin hücre membranında homojen dağılım gösterdikleri (Şekil. 3 ok) ya da hücrenin bir kutpunda toplandıkları gözleendi (Şekil 4 ok).

ANAE ve SIg boyaması sonuçları tablo 1 ve 2'de verilmiştir.

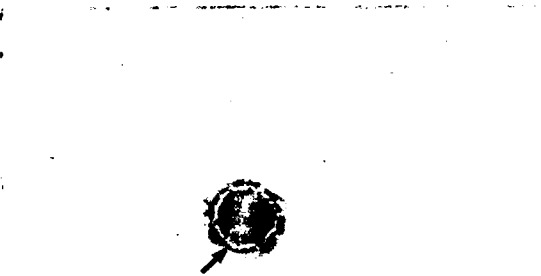
Değişik yaş gruplarında ANAE pozitif lenfosit oranının %59.3-63.9, ANAE negatif lenfosit oranının %36.4-40.7 arasında; SIg pozitif lenfosit oranının %35.2-41.0, SIg negatif lenfosit oranının ise %59.0-64.8 arasında değiştiği saptandı. Aynı yaş grupları, ANAE ve SIg boya-



Şekil 1: Erişkin Ankara keçisinde ANAE boyaması. Ok: T lenfositinde ANAE pozitif granül. ANAE.x990.
Figure 1: ANAE staining in adult Angora goat. Arrow: ANAE positive granule in T lymphocyte. ANAE.x 990.



Şekil 2: Erişkin Ankara keçisinde ANAE boyaması. Oklar: nötrofil granulositte ANAE pozitif granüller. ANAE.x1250.
Figure 2: ANAE staining in adult Angora goat. Arrows: ANAE positive granules in neutrophil granulocyte. ANAE.x 1250.



Şekil 3: Erişkin Ankara keçisinde SIg boyaması. Ok: yüzey immunglobulinlerinin B lenfosit membranında diffuz dağılımı. SIg.x960.
Figure 3: SIg staining in adult Angora goat. Arrow: diffuse distribution of surface immunoglobulins in B lymphocyte membrane. SIg.x960.



Şekil 4: Erişkin Ankara keçisinde SIg boyaması. Ok: yüzey immunglobulinlerinin B lenfositin bir kutpunda toplanması. SIg.x870.
Figure 4: SIg staining in adult Angora goat. Arrow: localization of surface immunoglobulins at one pole of the B lymphocyte. SIg.x870.

masına karşı kendi aralarında karşılaştırıldıklarında ANAE negatif lenfosit oranının, SIg pozitif lenfosit oranına çok yakın olduğu dikkati çekti. Bu bulgulara göre ANAE pozitif lenfosit oranının genç hayvanlarda biraz daha yüksek ve SIg pozitif lenfosit oranının ise düşük olduğu, yaşın ilerlemesi ile birlikte ANAE pozitif lenfosit oranında bir düşmenin ve SIg pozitif lenfosit oranının da ise bir yükselmenin şekillendiği saptandı (Tablo 1 ve 2).

Tablo 1: Ankara Keçilerinin Perifer Kan Lenfositlerinde ANAE Boyaması
Table 1: ANAE Staining in Peripheral Blood Lymphocytes in Angora Goats

Hayvanın Yaşı	Hayvan Sayısı	Lenfosit (%)	
		ANAE ⁺	ANAE ⁻
O-1 gün	10	63.6	36.4
7 gün	10	62.9	37.1
14 gün	10	63.3	36.7
21 gün	10	60.9	39.1
28 gün	10	60.7	39.3
60 gün	10	61.8	38.2
1-3 yaş	20	59.3	40.7

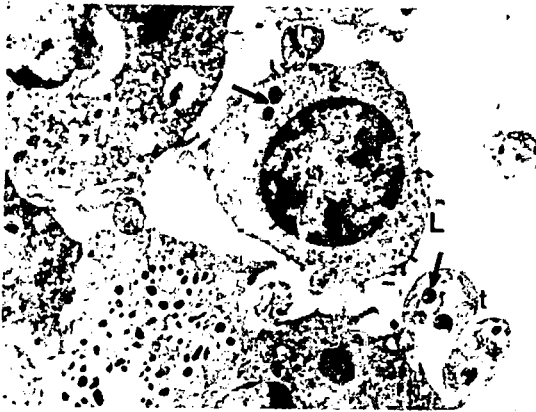
Tablo 2: Ankara Keçilerinin Perifer Kan Lenfositlerinde SIg Boyaması
Table 2: SIg Staining in Peripheral Blood Lymphocytes in Angora Goats

Hayvanın Yaşı	Hayvan Sayısı	Lenfosit (%)	
		SIg ⁺	SIg ⁻
O-1 gün	5	35.2	64.8
14 gün	5	36.4	63.6
28 gün	5	41.0	59.0
1-3 yaş	5	39.0	61.0

Elektron mikroskobu ile yapılan incelemelerde, ANAE enzim boyamasına karşı lenfosit (Şekil 5 L), monosit (Şekil 6 M), kan pulcukları (Şekil 5,8 t), nötrofil (Şekil 7 N) ve eozinofil (Şekil 8 E) granulositlerde bulunan lizozomal granüllerin pozitif reaksiyon verdiği saptandı. Reaksiyonun, lizozomal granüllerin içinde difüz olarak yerleştiği dikkati çekti (Şekil 5, 6, 7, 8 oklar).

Tartışma ve Sonuç

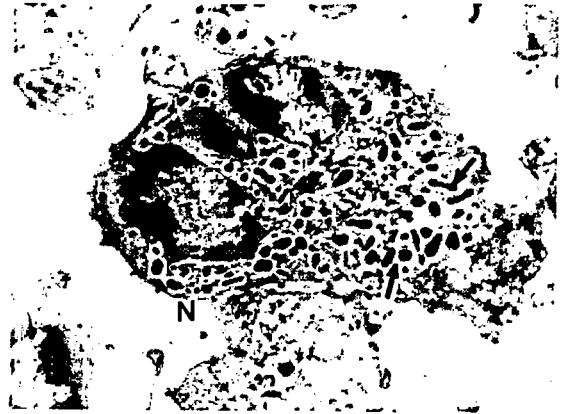
Perifer kan T lenfositlerini belirlemek için çeşitli araştırmacılar (5, 8, 9, 12, 18) tarafından li-



Şekil 5: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. Oklar: lenfosit ve kan pulcuklarında ANAE pozitif granüller, L: lenfosit, t: kan pulcuğu. ANAE. x 6185.
Figure 5: ANAE staining in Electron microscope. Arrows: ANAE positive granules in lymphocyte and platelet, L: lymphocyte, t: platelet. ANAE. x 6185.

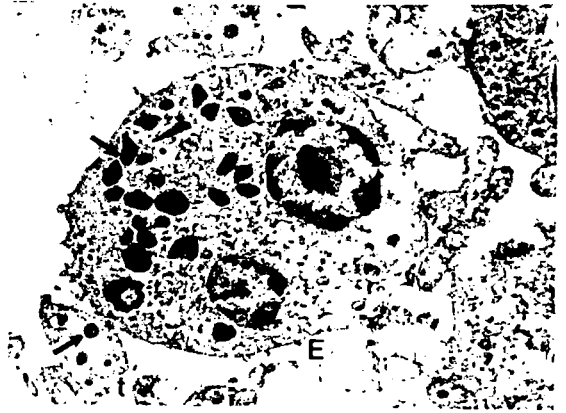


Şekil 6: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. Oklar: monositte ANAE pozitif granüller, M: monosit. ANAE. x 12 375.
Figure 6: ANAE staining in Electron microscope. Arrows: ANAE positive granules in monocyte, M: Monocyte. ANAE. x 12 375.



Şekil 7: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. Oklar: nötrofil granulositte ANAE pozitif granüller, N: nötrofil. ANAE. x 10 125.

Figure 7: ANAE staining in Electron microscope. Arrows: ANAE positive granules in neutrophil granulocyte, N: neutrophil. ANAE. x 10 125.



Şekil 8: Elektron mikroskopta ANAE boyaması. Oklar: eozinofil granulosit ve kan pulcuğunda ANAE pozitif granüller, E: eozinofil granulosit, t: kan pulcuğu. ANAE. x 9215.

Figure 8: ANAE staining in Electron microscope. Arrows: ANAE positive granules in eosinophil granulocyte and platelets, E: eosinophil granulocyte, t: platelet. ANAE. x 9215.

zozomal enzimlerden yararlanılmıştır. Son zamanlarda, nonspesifik esterazlardan olan alfa naftil asetat esteraz'ın T lenfositlerinde bulunup B lenfositlerinde bulunmadığı birçok araştırmacı (8, 11, 14, 19) tarafından bildirilmiştir.

Higgy ve ark. (8) T ve B lenfositleri ile Null hücrelerinden zenginleştirilmiş hücre süspansiyonları üzerinde yaptıkları bir çalışmada, ANBE enzimini demonstre ederek lokalize granüller pozitifitenin T lenfositleri için spesifik pozitif reaksiyon olduğunu tesbit etmişlerdir. Kajikawa ve ark. (9), sığırlarda yaptıkları çalış-

mada, ANAE uygulamasıyla perifer kan T lenfositlerinde granüler, monositlerde ise diffuz reaksiyonun görüldüğünü bildirmişlerdir. Ramos ve ark. (22) domuzlarda ANAE enzim boyamasında perifer kan T lenfositlerinde granüler, monosit ve eozinofil granulositlerde ise diffuz reaksiyonun görüldüğünden bahsetmektedirler. Knowles ve Susan (12), Kulenkampff ve ark. (14) ile Müller ve ark. (19) insan perifer kan T lenfositleri üzerinde yaptıkları çalışmada, ANAE enzimi boyamasıyla T lenfositlerinin sitoplazmasında genelde tek bir kırmızı granül, monositlerde diffuz şekilde pozitif reaksiyonun görüldüğünü, nötrofil granulositlerin ise negatif reaksiyon verdiğini bildirmişlerdir. Osbaldiston ve ark. (21) farklı türler üzerinde yaptıkları ANAE çalışmasında, rat, kobay, koyun ve keçilerin nötrofil granulositlerinde pozitif reaksiyona rastladıklarını, kedi ve domuzlarda ise bunu gözlemediklerini, ayrıca köpek ve tavşanlarda eozinofil granulositlerde ANAE'ye karşı pozitif reaksiyonu gözledikleri halde kobay, kedi, koyun, keçi ve insanlarda bu durumu göremediklerini bildirmektedirler.

Ankara keçilerinin perifer kan T lenfositleri üzerinde yapılan bu çalışmada ANAE boyamasıyla erişkin hayvanların lenfositlerinin çoğunda genelde bir, bazen daha fazla sayıda kırmızı granül şeklinde reaksiyon gözlemlendi. Monosit ve eozinofil granulositlerde kimi araştırmacıların (12, 18, 22) bildirdikleri gibi diffuz reaksiyon gözlemlendi, nötrofil'lerde de pozitif reaksiyon tesbit edildi. Nötrofil granulositlerden elde edilen bulgular, Osbaldiston ve ark. (21)'nin bulgularına uyum sağlamakta, Knowles ve Susan (12), Müller ve ark. (19)'nin bulgularına ise uymamaktadır. Ayrıca kan pulcuklarında da ANAE boyamasına karşı elektron mikroskop ile yapılan incelemelerde pozitif reaksiyon belirlendi. Çalışmadaki bu bulgu diğer araştırmacılar tarafından bildirilmemiştir.

İnsanlarda yapılan çalışmada, ANAE pozitif perifer kan T lenfosit oranını Müller ve ark. (19) %85, Knowles ve ark. (11) %70, Kulenkampff ve ark. (14) %68 olarak bildirmişlerdir. Bu oran tavuklarda %60 olarak bulunmuştur (15). Sığırların perifer kanındaki B ve T lenfosit oranlarının belirlendiği çalışmada farklı sonuçlar elde edilmiştir. Thurmond ve ark. (24) sığırlarda T lenfosit oranının %37-50, B lenfosit oranının ise %27-33 arasında değiştiğini bildirmişlerdir. Yapılan başka bir çalışmada (20) ise T lenfosit oranı %64.4, B lenfosit oranı da %25.4 olarak tespit edilmiştir. Yang (25) T lenfosit oranını %79.2, B lenfosit oranını da %26.9 olarak bildirmiştir. Yukarıdaki araştırmacıların (20, 24, 25) yaptıkları çalışmada farklı yaşlardaki sığırların perifer kanındaki

T lenfosit oranları hakkında bilgi verilmemektedir. Çalışmada, değişik yaş gruplarında ANAE pozitif lenfosit oranı %59.3-63.6, SIg pozitif lenfosit oranı ise %35.2-41.0 arası bulunmuştur. Ayrıca aynı yaş gruplarındaki SIg pozitif lenfosit oranının, ANAE negatif lenfosit oranına çok yakın olduğu dikkati çekmiştir. Erişkin hayvanlarda tesbit edilen T ve B lenfosit oranı insan ve sığırlarda bildirilene yakındır. Bugüne kadar yapılan çalışmalar erişkin insan ve hayvanlarda olduğu için gençlerdeki T lenfosit oranının erişkinlere göre yüksek, B lenfosit oranının ise düşük oluşunu tartışacak literatür bulunamamıştır. Miyasaka ve ark. (17) koyun fötusunda gebeliğin 54. gününde timositlerin %90'dan fazlasının T lenfosit olduğunu, Bianchi ve ark. (3) domuzlarda T lenfositlerin doğumdan önce tam geliştiğini bildirmişlerdir. İnsan ve fareler üzerinde yapılan çalışmada yaşlanmayla birlikte perifer kandaki T lenfosit sayılarının azaldığı, bu azalmaların timusun involusyonuyla ilgili olabileceği ileri sürülmüştür (6). Kroese ve ark. (13) ratların dalağında ilk sentrum germinativum'ların doğumdan sonraki 3-4. haftada geliştiğine dikkati çekmişlerdir. Genç hayvanlardaki ANAE pozitif lenfosit oranının erişkinlere göre yüksek, B lenfosit oranının ise düşük oluşunun, ilk bir aylık dönemde selüler immunitenin, humoral immuniteye göre daha iyi gelişmiş olmasından ileri geldiği kanısına varıldı.

Grossi ve ark. (7) ANAE aktivitesinin primer lizozomlarda gözlemlendiğini, Bozdech ve Bainton (4) ANBE aktivitesinin monosit ve lenfositlerde granüllerin içinde, Zicca ve ark. (27) ise ANAE aktivitesinin lizozomların membranında bulunduğunu bildirmişlerdir. Elektron mikroskop ile yapılan incelemelerde ANAE ile boyamada pozitif reaksiyonu lenfosit, monosit, kan pulcukları, eozinofil ve nötrofil granulositlerdeki lizozomların içerisinde tesbit edildiğinden, Zicca ve ark. (27)'nin lizozomların membranında bulunduğu görüşüne katılmamaktayız.

Bu çalışmadan elde edilen bulgulara dayanarak Ankara keçilerinde ANAE demonstrasyonu ile perifer kandaki T lenfositlerin spesifik olarak belirlenebileceği ve ANAE enziminin T lenfositlerdeki lizozomların içinde bulunduğu sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Barret, T.J. (1980). *Basic immunology and its medical application*. The C.V. Mosby Company. London. pp. 48-65.
2. Basso, G., Cocito, M.G., Semenzato, G., Pezzuto, A. and Zanescio, L. (1980). *Cytochemical study of thymocytes and T lymphocytes*. Br. J. Haematol. 44:577-582.

3. Bianchi, A.T.J., Zwart, R.J., Jeurissen, S.H.M. and Moonen-Leusen, H.W.M. (1992). *Development of the B and T cell compartments in porcine Lymphoid organs from birth to adult life: an immunohistological approach*. Vet. Immun. Immunopath. 33:201-221.
4. Bozdech, M.J. and Bainton, D.F. (1981). *Identification of alfa naphthyl butyrate esterase as a plasma membrane ectoenzyme of monocytes and as a discrete intracellular membrane bounded organelle in lymphocytes*. J. Exp. Med. 153:182-195.
5. Edwin, P.T., Sondra, G.B., Marshall, E.K. and Dorathy, B.F. (1981). *Ultrastructural localization of acid phosphatase in rosetted T and B lymphocytes of normal human blood*. Am. J. Pathol. 102: 72-83.
6. Fudenberg, H., Stites, D., Caldwell, J. and Wells, V. (1978). *Basic clinical immunology*. Lang Medical Publication. California. pp. 78-95.
7. Grossi, C.E., Webb, S.R., Zicca, A., Lydyard, P.M., Moretta, L., Mingari, M.C. and Cooper, M.D. (1978). *Morphological and histochemical analysis of two human T-cell subpopulations bearing receptors for IgM or IgG*. J. Exp. Med. 147:1405-1417.
8. Higgy, K.E., Burns, G.F. and Hayhoe, F.G. (1977). *Discrimination of B, T and Null lymphocytes by esterase cytochemistry*. Scand. J. Haematol. 18:437-448.
9. Kajikawa, D.W.M., Koyama, H., Yushikawa, T. and Tsubaki, S. (1983). *Use of alpha-naphthyl acetate esterase staining to identify T lymphocytes in cattle*. Am. J. Vet. Res. 44:1549-1552.
10. Karnowsky, M.J. (1965). *A formadehyd-glutaraldehyd fixative of high osmolality for use in electron microscopy*. J. Cell. Biol. 27:137-138.
11. Knowles, D.M., Hofman, T., Ferrarini, M. and Kunkel, H.G. (1978). *The demonstration of acid alpha naphthyl acetate esterase activity in human lymphocytes usefulness as a T-cell marker*. Cellular Immunol. 35:112-123.
12. Knowles, D.M. and Susan, H. (1978). *Tissue localization of T-lymphocytes by the histochemical demonstration of acid alfa-naphthyl acetate esterase*. Lab. Invest. 39:70-76.
13. Kroese, F.G.M., Wubbena, A.S., Kuijpers, K.C. and Nieuwenhuis, P. (1987). *The ontogeny of germinal centre forming capacity of neonatal rat spleen*. Immunology. 60:597-602.
14. Kulenkampff, J., Janossy, G. and Greaves, M.F. (1977). *Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes*. British J. Haematol. 36:231-240.
15. Maiti, N.K., Saini, S.S. and Sharma, S.N. (1990). *Histochemical studies on chicken peripheral blood lymphocytes*. Vet. Resch. Communication. 14:207-210.
16. Mielke, H. und Füll, B. (1989). *Die zellen der peripheren Euterlymphe unter berücksichtigung der B- und T-lymphozyten im vergleich zu den zellen des peripheren Blutes und der Milch bei gesunden sowie mastitis-und leukosekranken Kühen*. Mh. Vet. Med. 44:629-632.
17. Miyasaka, M., Heron, I., Dudler, L., Cahill, R.N.P., Fornl, L., Knaak, T. and Trnka, Z. (1983). *Studies on the differentiation of T lymphocytes in sheep. I. Recognition of a sheep T lymphocyte differentiation antigen by a monoclonal antibody T-80*. Immunology. 49:545-553.
18. Mueller, J., Brundel, Re, G., Buerki, H., Keller, H. and Gottier, H. (1975). *Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiation of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes*. Eur. J. Immunol. 5:270-274.
19. Müller, J., Keller, H.U., Hagmann, J.D., Cornoley, R. J., Ruchti, C. and Cottler, H. (1981). *Nonspecific esterase in human lymphocytes*. Int. Archs. Allergy appl. Immun. 64:410-421.
20. Nakanishi, H., Koyama, H., Kajikawa, O. and Saito, H. (1983). *Identification of bovine T and B lymphocytes in normal peripheral blood, lymph nodes and spleen*. Jpn. J. Vet. Sci. 41:97-107.
21. Osbaldiston, BVSc., Sullivan, R.J. and Fox, A. (1978). *Cytochemical demonstration of esterases in peripheral blood leukocytes*. Am. J. Vet. Res. 39:683-685.
22. Ramos, J.A., Ramis, J.A., Marco, A., Domingo, M., Rabanal, R. and Ferrer, L. (1992). *Histochemical and immunohistochemical study of the mucosal lymphoid system in swine*. Am. J. Vet. Res. 53:1418-1426.
23. Reynolds, E.S. (1963). *The use of lead citrate at high pH as an electronopaque stain in electron microscopy*. J. Cell. Biol. 17:208-212.
24. Thurmond, M.C., Canter, R.L., Picanso, J.P. and Stralka, K. (1990). *Upper normal prediction limits of lymphocyte counts for cattle not infected with bovine leukemia virus*. Am. J. Vet. Res. 51:466-470.
25. Yang, T. (1981). *Identification of bovine T and B lymphocyte sub populations by immunofluorescence surface marker analyses*. Am. J. Vet. Res. 42:755-757.
26. Yang, T.J., Patricia, J.A. and Williams, L.F. (1979). *Acid alpha naphthyl acetate esterase presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes*. Immunology. 38:85-92.
27. Zicca, A., Leprini, A., Cadoni, A., Franci, T.A., Ferrarini, M. and Carlo, E.G. (1981). *Ultrastructural localization of alpha-naphthyl acid esterase in human Tm lymphocytes*. Am. J. Pathol. 105:40-46.