

Radosław ŚPIEWAK

Instytut Dermatologii w Krakowie

# Test immunoenzymatyczny ELISPOT. Perspektywy zastosowań w alergologii i immunologii

### Słowa kluczowe:

- techniki laboratoryjne
- techniki immunoenzymatyczne
- ELISPOT
- ELISA
- immunologia
- alergologia
- onkologia
- wakuinologia

### Key words:

- laboratory techniques
- immunoenzymatic assays
- ELISPOT
- ELISA
- immunology
- allergology
- oncology
- vaccinology

ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay, synonimy: Immunospot, ELISA Spot, ELISA-plaque) staje się coraz bardziej uznanym narzędziem w nowoczesnej medycynie. Technika ma już ugruntowaną pozycję w takich dziedzinach jak biotechnologia (produkcja i selekcja przeciwciał), wakuinologia (produkcja i testowanie szczepionek), immunologia (badania naukowe i diagnostyka), choroby zakaźne (testy diagnostyczne o podwyższonej czułości), czy wreszcie onkologia (rozwój immunoterapii i testy leków przeciwnowotworowych). Coraz częściej ELISPOT stosowany jest również w alergologii doświadczalnej i klinicznej. ELISPOT, podobnie jak ELISA, opiera się na stosowaniu par przeciwciał wiążących oraz detekcyjnych. Są jednak istotne różnice, np. wiązanie przeciwciał z fazą stałą odbywa się w trakcie hodowli komórkowej. Dzięki temu ELISPOT przewyższa szereg problemów metodycznych techniki ELISA oraz zapewnia wysoką czułość. Wśród 1 000 000 komórek można wykryć pojedynczą komórkę wydzielającą dane białko (cytokinę, białko efektorowe, receptor, marker powierzchniowy lub przeciwciało). ELISPOT nie jest wrażliwy na zachodzącą w hodowli konsumpcję badanej cytokiny (jest to istotne np. przy oznaczaniu IL-4 lub IL-2). Dual ELISPOT jest rozwinięciem techniki, umożliwiającym śledzenie wydzielania różnych białek przez tę samą komórkę. Dzięki połączeniu metod ELISPOT i ELISA można ponadto szacować średnią produkcję cytokin przez pobudzone komórki. Ponieważ ELISPOT jest jeszcze słabo rozpoznany w naszym kraju, celem niniejszego artykułu jest przybliżenie czytelnikom tej obiecującej metody z jej możliwościami i ograniczeniami, a także przegląd potencjalnych zastosowań ELISPOTu w badaniach podstawowych oraz klinicznych z zakresu alergologii i immunologii.

## The immunosorbent immunospot assay (ELISPOT): Perspectives for use in allergology and immunology

ELISPOT (Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay, synonyms: Immunospot, ELISA Spot, ELISA-plaque) becomes an established tool in modern medicine. This technique has already a good standing in biotechnology (production and selection of antibodies), vaccinology (production and testing of vaccines), immunology (research and diagnosis), infectious diseases (sensitive detection of infections), and oncology (development of immunotherapeutic vaccines). There is also an increased use of the ELISPOT in experimental and clinical allergology. Similar to ELISA, ELISPOT is based on antibody pairs, including coating (catching) and detection antibodies. There are, however, substantial differences between these two techniques, e.g. the binding takes place in cell cultures. Thanks to this feature, ELISPOT overcomes a range of technical problems of ELISA and provides higher sensitivity. It is capable of detecting one single cell that secretes a protein of interest (a cytokine, effector protein, receptor, surface marker or an antibody), out of 1,000,000 cells. ELISPOT is not affected by the consumption of cytokines in the cell cultures, which is an important advantage while detecting e.g. IL-4 or IL-2. A further development of the technique is Dual ELISPOT that allows the detection of more than one protein secreted by a cell. By combining ELISPOT with ELISA, a mean cytokine production by stimulated cells can be assessed. As ELISPOT is not yet widely known in Poland, the aim of this review is to present some details on the method, with its advantages and drawbacks. Also an overview of established and emerging applications of ELISPOT will be given in basic and clinical allergology and immunology.

---

Adres do korespondencji:

Radosław ŚPIEWAK  
Instytut Dermatologii w Krakowie  
31-312 Kraków, ul. Lentza 6/17  
Tel./Fax: 012 636 00 51  
email: Radoslaw.Spiewak@plusnet.pl

Techniki immunoenzymatyczne to techniki laboratoryjne wykorzystujące łącznie 2 rodzaje reakcji: 1) reakcję immunologiczną (antygen-przeciwciało) w detekcji interesującej badacza cząsteczki oraz 2) reakcję enzymatyczną (przekształcenie chromogenu w barwnik znacznikowy) w pomiarze jakościowym (wizualizacja) lub ilościowym badanego białka. W technikach immuno-

enzymatycznych wnioski na temat obecności i/lub stężenia badanej substancji wyciąga się pośrednio, na podstawie obecności i/lub stężenia znacznika (barwnik powstały w wyniku enzymatycznej przemiany substancji barwnej, czyli chromogenu). Technika ELISPOT (*enzyme-linked immunospot assay*, synonimy: Immunospot, ELISA Spot, ELISA-plaque) jest twórczym rozwinięciem enzymatycznego testu immunosorpcyjnego ELISA i jednocześnie połączeniem testu immunoenzymatycznego z hodowlą komórkową. Test ten opracował w roku 1983 *Cecil Czerkinsky* – francuski badacz pracujący w Szwecji i niezależnie od niego australijski naukowiec *Jonathon D. Sedgwick* (tabela I).

### ELISPOT – test immunoenzymatyczny przyszłości

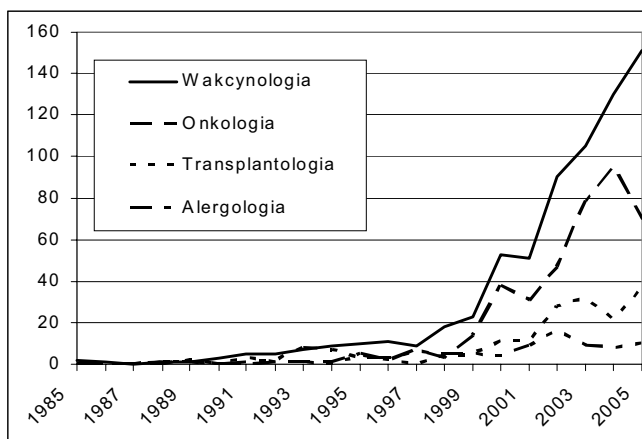
ELISPOT staje się coraz bardziej uznanym narzędziem w nowoczesnym laboratorium naukowym, co znajduje odzwierciedlenie w lawinowo rosnącej liczbie badań z jego zastosowaniem (rycina 1). Test ten ma już ugruntowaną pozycję w wakcynologii, gdzie stosowany jest między innymi w produkcji i testowaniu skuteczności szczepionek przeciw HIV [8-16], wirusowemu zapaleniu wątroby [17], cholercze [18,19], półpaścowi [20], grypie [21,22] czy malarii [23]. Test ELISPOT w kierunku komórek specyficznie reagujących na antygen prątka gruźlicy znalazł już rutynowe zastosowanie kliniczne i cechuje się większą czułością i swoistością w porównaniu do innych dostępnych testów na gruźlicę [24-33]. Technika ELISPOT jest również wykorzystywana w pracach nad skuteczniejszymi szczepionkami przeciwgruźliczymi [34]. Obiecujące są zastosowania testu ELISPOT w wykrywaniu swoistej odpowiedzi immunologicznej na antygeny krętka *Borrelia burgdorferi* [35,36], krętka bladego (*Treponema pallidum*) [37] oraz salmonelli [38]. Test ELISPOT stał się niezastąpionym narzędziem w immunologii onkologicznej, gdzie m. in. wyparł radioaktywny test uwalniania chromu w ocenie funkcji komórek cytotoxycznych [39,40]. Jest on również szeroko stosowany w badaniach nad szczepionkami przeciwnowotworowymi [41-43]. ELISPOT znajduje ponadto zastosowanie w badaniach naukowych i diagnostyce reumatologicznej, a także w testowaniu leków przeciwreumatycznych [44-55]. W diabetologii wykorzystuje się ELISPOT w wykrywaniu komórek cytotoxycznych skierowanych przeciw wyspom trzustkowym [56].

Z pewnym opóźnieniem, jednak coraz szerzej ELISPOT wkracza również do alergologii doświadczalnej i klinicznej. Test ten stosowano z powodzeniem w detekcji zaburzeń równowagi immunologicznej oraz swoistej odpowiedzi immunologicznej w skazie atopowej [57,58] oraz wyprysku atopowym [59]. Za pomocą testu ELISPOT wykrywa się swoiste limfocyty w alergii pokarmowej [60,61]. Technika ta jest również przydatna w ocenie przeobrażenia immunologicznego w przebiegu immunoterapii i farmakoterapii chorych uczulonych na jady owadów [62], oraz w wykrywaniu swoistych limfocytów w alergicznym zapaleniu pęcherzyków płucnych [63], a także w alergii lekowej [64].

Obszarem najintensywniej badanej eksplorowanym w alergologii za pomocą testu ELISPOT jest alergia kontaktowa i alergiczne kontaktowe zapalenie skóry. Jak się wydaje, wynika to głównie z dwóch cech tego testu: jego wysokiej czułości i niewrażliwości na konsumpcję wydzielanych cytokin przez komórki w hodowli. ELISPOT, podobnie jak tradycyjna ELISA opiera się na stosowaniu par przeciwciał wiążących oraz detekcyjnych. Są jednak istotne różnice, zestawione w tabeli II. Należy pamiętać, że przeciwciała stosowane w metodzie ELISA nie zawsze nadają się to ELISPOTu. Zalecane jest stosowanie par przeciwciał przygotowanych specjalnie dla tej metody (większość producentów, m.in. firmy Mabtech, Sanquin mają takie pary w swojej ofercie). Substraty barwne (chromogeny) do testu ELISA są rozpuszczalne w wodzie i nie sprawdzają się podczas wykonywania ELISPOTu, w którym potrzebne są chromogeny nierozpuszczalne. ELISPOT przewidywa szereg problemów metodycznych techniki ELISA oraz zapewnia wysoką czułość. Ta wysoka czułość testu ELISPOT pozwala wykryć pojedynczą komórkę wydzielającą dane białko (cytokinę, białko efektorowe, receptor, marker powierzchniowy lub przeciwciało) wśród 1 000 000 komórek w hodowli [66]. Umożliwia to wykrywanie w krwi obwodowej pojedynczych limfocytów pamięci, swoistych wobec danej substancji uczulającej [67]. Natychmiastowe i nieodwracalne związanie cytokiny wydzielonej przez komórkę z fazą stałą zapobiega zużyciu tej cytokiny przez komórki w dalszym przebiegu hodowli, co jest bardzo dużym pro-

**Tabela I**  
**ELISPOT – chronologia zastosowań.**  
**ELISPOT – the chronology of applications.**

1982	Cecil Czerkinsky i wsp. (1)	Pierwszy opis zastosowania ELISPOTu do wykrywania komórek bakteryjnych wydzielających enterotoksynę
1983	Jonathon D. Sedgwick i Patrick G. Holt (2)	Zastosowanie ELISPOTu (autorzy używali nazwy ELISA-plaque) do wykrywania komórek (plazmocytów) szczurzych wydzielających przeciwciała swoiste wobec albuminy jaja kurzego
1983	Cecil Czerkinsky i wsp. (3)	Zastosowanie ELISPOTu do wykrywania komórek (plazmocytów) mysich wydzielających przeciwciała swoiste wobec albuminy jaja kurzego
1988	Cecil Czerkinsky i wsp. (4)	Zastosowanie ELISPOTu do wykrywania komórek wydzielających IFN- $\gamma$
1988	Cecil Czerkinsky i wsp. (5)	Dual-ELISPOT - system dwubarwny do jednoczesnej detekcji wydzielania dwóch różnych cytokin w jednej hodowli komórkowej (a także z jednej komórki)
1997	Yan Cui i Lung-Ji Chang (6)	Wprowadzenie komputerowej analizy obrazu w celu przyspieszenia i obiektywizacji oceny wyników
2002	Radosław Śpiewak (7)	Pierwsze w Polsce zastosowanie ELISPOTu: detekcja swoistej odpowiedzi komórek jednojądrzastych krwi na antygeny bakterii powietrznoPOCHODNYCH



**Rycina 1**  
**Liczba publikacji opartych na technice ELISPOT (analiza własna danych z Medline).**

**Publications based on ELISPOT assay in the Medline (author's analysis).**

blemem np. przy oznaczaniu cytokin (np. IL-4 lub IL-2) za pomocą tradycyjnego testu ELISA [68]. Kolejną zaletą jest możliwość śledzenia wydzielania różnych białek przez tę samą komórkę za pomocą techniki *Dual ELISPOT* [5,55]. Dzięki wymienionym zaletom testu ELISPOT możliwe było dokonanie istotnego postępu. To właśnie za pomocą tej techniki udało się badaczom wykazać, że w patomechanizmie alergii kontaktowej i alergicznego kontaktowego zapalenia skóry kluczową rolę odgrywają limfocyty wydzielające IL-4, IL-5 i IL-13, co stanowi przełom w naszym rozumieniu mechanizmów tych zaburzeń [69-79].

### Jak działa ELISPOT

Jak już wspomniano, ELISPOT jest połączeniem techniki immunoenzymatycznej fazy stałej z krótkoterminową hodowlą komórkową (od kilku godzin do kilku dni). Kolejne etapy wykonania testu zostały przedstawione na rycinie 2.

1. Komórki inkubuje się w płytkach ELISPOT. Dno każdego dołka płytki zostało uprzednio opłaszczane przeciwciałami wiążącymi (syn. przeciwciała pierwotne, opłaszczające). Przeciwciała te są swoiste wobec interesującego nas białka, np. określonej cytokiny, przeciwciała, markera błonowego, receptora itd. Jeżeli w trakcie hodowli komórka wydzieli interesujące nas białko, to zostanie ono związane z dnem dołka przez przeciwciało wiążą-

**Tabela II**  
**ELISPOT i ELISA: podobieństwa i różnice [65].**  
**ELISPOT and ELISA: similarities and differences.**

Porównywana cecha	ELISA	ELISPOT
Wynik badania:	Stężenie danej cytokiny wydzielonej przez wszystkie komórki w hodowli (np. pg/ml nadsącza)	Liczba komórek wydzielających daną cytokinę (np. n/1 mln komórek)
Ryzyko zafalszowania wyniku na skutek konsumpcji analizowanego białka przez komórki w hodowli:	Tak	Nie
Zasada detekcji białka:	Reakcja immunoenzymatyczna	Reakcja immunoenzymatyczna
Przeciwciała pierwotne:	Oplaszczane w dodatkowej płytce sorbcyjnej po zakończeniu hodowli	Oplaszczane w płytce hodowlanej przed rozpoczęciem hodowli
Przeciwciała wtórne:	Dodawane do dodatkowej płytki sorbcyjnej po zakończeniu hodowli	Dodawane do płytki hodowlanej po zakończeniu hodowli
Reakcja barwna:	Fosfataza zasadowa (ALP) + substrat barwny lub peroksydaza chrzanowa (HRP) + substrat barwny	Fosfataza zasadowa (ALP) + substrat barwny lub peroksydaza chrzanowa (HRP) + substrat barwny
Wykonanie detekcji i reakcji barwnej:	W nadsącza z hodowli w osobnej płytce sorbcyjnej	Bezpośrednio w płytce hodowlanej
Sposób zatrzymania reakcji barwnej:	Zmiana pH (np. dodanie H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) w fazie płynnej	Wypłukanie wodą i wysuszenie płytki
Faza ostatecznego pomiaru:	Faza płynna	Faza sucha
Urządzenie pomiarowe:	Czytnik ELISA (spektrofotometr)	Czytnik ELISPOTu (kamera + program do analizy obrazu)
Uzyskanie wyniku ilościowego:	Pomiar ekstynkcji w reakcji barwnej i wyliczenie stężenia z krzywej kalibracyjnej	Komputerowa analiza obrazu (1 plamka = 1 komórka)
Możliwość przesyłania płytki do analizy poza laboratorium:	Nie	Tak
Okres, w którym jest możliwa powtórna analiza:	15-30 minut	Tygodnie - miesiące

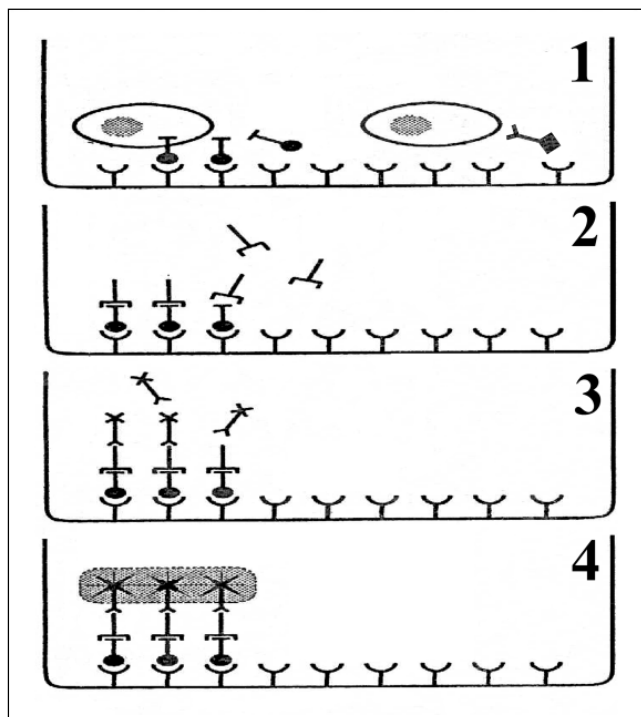
ce. Wiązanie takie jest swoiste, dlatego do membrany przyczepiają się tylko interesujące nas cząsteczki.

2. Po zakończeniu hodowli, usuwamy komórki z dołek, a płytkę dokładnie i wielokrotnie płuczemy. Na dnie dołka pozostaje jedynie badane białko związane przeciwciałem pierwotnym. Dodajemy znakowane białyną przeciwciała wtórne (syn. detekcyjne), które wiąże się z innym epitopem badanego białka.

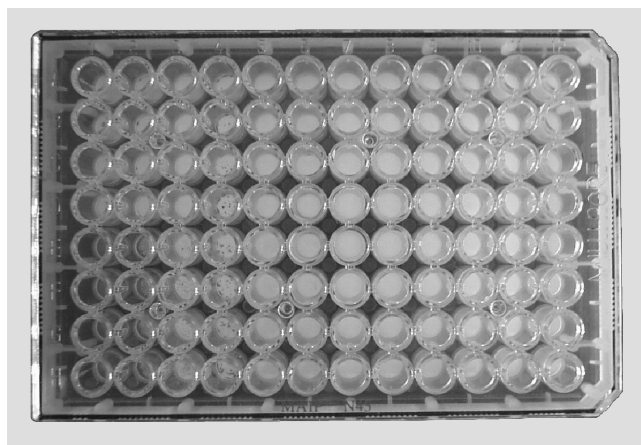
3. Następnie dodajemy sprzężony ze streptawidyną enzym, np. fosfatazę alkaliczną – ALP lub peroksydazę chrzanową – HRP. Streptawidyna silnie wiąże się z białyną znakującą przeciwciała wtórne (detekcyjne). Dokładne płukanie płytki usuwa nadmiar enzymu.

4. Dodajemy substraty barwne (chromogeny), które w obecności enzymu przekształcają się w barwnik. Na przykład w przypadku znakowania fosfatazą zasadową (ALP), dodaje się roztwór BCIP i NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate + nitro blue tetrazolium). W wyniku reakcji zachodzącej pod wpływem enzymu powstaje barwnik, który osadza się na dnie dołka.

5. Reakcję barwną zatrzymujemy przez dokładne wypłukanie i wysuszenie płytki.



**Rycina 2**  
**Zasada testu ELISPOT – objaśnienia w tekście [7].**  
**The principle of ELISPOT [7].**



**Rycina 3**  
**Płytkę ELISPOT po zakończeniu hodowli i wykonaniu reakcji barwnej. Każda plamka ("spot") widoczny np. we wszystkich dołkach w 4-jej kolumny reprezentuje jedną antygenowo-swoistą komórkę [7].**  
**The ELISPOT plate after finishing the cell culture and decelipong the colour reaction. Each spot visible, eg. in every well in column 4, represents one antigen-specific cell [7].**

6. W miejscu reakcji immunoenzymatycznej powstaje plamka barwna – „spot” (rycina 3). Przyjmuje się, że każdy spot jest śladem jednej komórki wydzielającej badane białko. W przypadku komórek szybko dzielących się, mówimy o „jednostkach tworzących spot” (*spot forming units – SFU*).

Ostatnim etapem jest liczenie spotów. Dawniej pracę tę wykonywano „na piechotę”, czyli pod mikroskopem, co znacznie zwiększało nakład pracy a tym samym ograniczało zastosowanie metody. Obecnie liczenie plamek barwnych wykonuje się automatycznie za pomocą specjalnego skanera z systemem analizy obrazu.

Podsumowując, ELISPOT jest rozwinięciem i pod wieloma względami udoskonaleniem techniki ELISA. Jego zalety zostały już docenione przez badaczy w wielu dziedzinach medycyny, co opisano powyżej. Aktualnie obserwujemy przełom w rozumieniu patomechanizmu alergii kontaktowej i alergicznej kontaktowe-

go zapalenia skóry, który dokonał się głównie dzięki omówionym zaletom testu ELISPOT. Kontynuacją opisanych wcześniej obserwacji są obiecujące próby wdrożenia ELISPOTu do diagnostyki laboratoryjnej alergicznego kontaktowego zapalenia skóry, w czym bierze udział również nasz zespół [74-77, 80-84].

#### Piśmiennictwo

- Czerkinsky CC, Svennerholm AM. Ganglioside GM1 enzyme-linked immunospot assay for simple identification of heat-labile enterotoxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 1983; 17: 965-9.
- Sedgwick JD, Holt PG. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 57: 301-9.
- Czerkinsky CC, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O, Tarkowski A. A solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of specific antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1983; 65: 109-21.
- Czerkinsky C, Andersson G, Ekre HP, Nilsson LA, Klareskog L, Ouchterlony O. Reverse ELISPOT assay for clonal analysis of cytokine production. I. Enumeration of gamma-interferon-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988; 110: 29-36.
- Czerkinsky C, Moldoveanu Z, Mestecky J, Nilsson LA, Ouchterlony O. A novel two colour ELISPOT assay. I. Simultaneous detection of distinct types of antibody-secreting cells. *J Immunol Methods* 1988; 115: 31-7.
- Cui Y, Chang LJ. Computer-assisted, quantitative cytokine enzyme-linked immunospot analysis of human immune effector cell function. *Biotechniques* 1997; 22: 1146-9.
- Śpiewak R. Dermatozy zawodowe w rolnictwie: epidemiologia, etiopatogeneza, czynniki ryzyka. Wydawnictwo Czelej, Lublin 2002, 85-96.
- Ewer K, Deeks J, Alvarez L, Bryant G, Waller S, Andersen P, Monk P, Lalvani A. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *Lancet* 2003; 361: 1168-73.
- De Groot AS, Bishop EA, Khan B, Lally M, Marcon L, Franco J, Mayer KH, Carpenter CC, Martin W. Engineering immunogenic consensus T helper epitopes for a cross-clade HIV vaccine. *Methods* 2004; 34: 476-87.
- Eriksson K, Kilander A, Hagberg L, Norkrans G, Holmgren J, Czerkinsky C. Intestinal antibody responses to oral vaccination in HIV-infected individuals. *AIDS* 1993; 7: 1087-91.
- Moodie Z, Huang Y, Gu L, Hural J, Self SG. Statistical positivity criteria for the analysis of ELISPOT assay data in HIV-1 vaccine trials. *J Immunol Methods* 2006; 315: 121-32.
- Periwal SB, Spagna K, Shahabi V, Quiroz J, Shroff KE. Statistical evaluation for detection of peptide specific interferon-gamma secreting T-cells induced by HIV vaccine determined by ELISPOT assay. *J Immunol Methods* 2005; 305: 128-34.
- Cox JH, Ferrari G, Kalams SA, Lopaczynski W, Oden N, D'souza MP. Results of an ELISPOT proficiency panel conducted in 11 laboratories participating in international human immunodeficiency virus type 1 vaccine trials. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2005; 21: 68-81.
- Hudgens MG, Self SG, Chiu YL, Russell ND, Horton H, McElrath MJ. Statistical considerations for the design and analysis of the ELISPOT assay in HIV-1 vaccine trials. *J Immunol Methods* 2004; 288: 19-34.
- Novitsky V, Rybak N, McLane MF, Gilbert P, Chigwedere P, Klein I, Gaolekwe S, Chang SY, Peter T, Thior I. Identification of human immunodeficiency virus type 1 subtype C Gag-, Tat-, Rev-, and Nef-specific elispot-based cytotoxic T-lymphocyte responses for AIDS vaccine design. *J Virol*. 2001; 75: 9210-28.
- Mwau M, McMichael AJ, Hanke T. Design and validation of an enzyme-linked immunospot assay for use in clinical trials of candidate HIV vaccines. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2002; 18: 611-8.
- Shokrgozar MA, Sam MR, Amirkhani A, Shokri F. Frequency analysis of HBsAg-specific B lymphocytes in high-responder individuals to recombinant hepatitis B vaccine: comparison of LDA and ELISPOT assays. *Scand J Immunol* 2006; 64: 536-43.
- Friman V, Quiding M, Czerkinsky C, Nordstrom I, Larsson L, Ericson D, Bjorkander J, Theman K, Kilander A, Holmgren J. Intestinal and circulating antibody-forming cells in IgA-deficient individuals after oral cholera vaccination. *Clin Exp Immunol* 1994; 95: 222-6.
- Quiding M, Nordstrom I, Kilander A, Andersson G, Hanson LA, Holmgren J, Czerkinsky C. Intestinal immune responses in humans. Oral cholera vaccination induces strong intestinal antibody responses and interferon-gamma production and evokes local immunological memory. *J Clin Invest* 1991; 88: 143-8.
- Smith JG, Liu X, Kauffhold RM, Clair J, Caulfield MJ. Development and validation of a gamma interferon ELISPOT assay for quantitation of cellular immune responses to varicella-zoster virus. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 871-9.
- Dercamp C, Sanchez V, Barrier J, Trannoy E, Guy B. Depletion of human NK and CD8 cells prior to in vitro H1N1 flu vaccine stimulation increases the number of gamma interferon-secreting cells compared to the initial undepleted population in an ELISPOT assay. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 230-5.
- Currier JR, Kuta EG, Turk E, Earhart LB, Loomis-Price L, Janetzki S, Ferrari G, Birx DL, Cox JH. A panel of MHC class I restricted viral peptides for use as a quality control for vaccine trial ELISPOT assays. *J Immunol Methods* 2002; 260: 157-72.
- Qian F, Zhang QF, Shen LH, Pan WQ. [CTL response to pre-erythrocytic stage vaccine candidate of plasmodium falciparum in HLA-A\*0201 transgenic mice detected by ELISPOT assay]. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2006; 24: 319-20.
- Lawn SD, Bangani N, Vogt M, Bekker LG, Badri M, Ntobongwana M, Dockrell HM, Wilkinson RJ, Wood R. Utility of interferon-gamma ELISPOT assay responses in highly tuberculosis-exposed patients with advanced HIV infection in South Africa. *BMC Infect Dis* 2007; 7: 99.
- Clayton R, Grabczynska S, Wilkinson JD. Nodular vasculitis: an indicator for ELISPOT screening for tuberculosis? *Clin Exp Dermatol* 2007; 32: 761-2.
- Hill PC, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Jeffries DJ, Lugos MD, Donkor SA, Adetifa IM, de Jong BC, Aiken AM. Longitudinal assessment of an ELISPOT test for *Mycobacterium tuberculosis* infection. *PLoS Med* 2007; 4: e192.
- Adetifa IM, Brookes R, Lugos MD, de Jong BC, Antonio M, Adegbola RA, Hill PC. Rising ELISPOT count prior to the onset of symptoms of full-blown tuberculosis disease. *Int J Tuberc Lung Dis* 2007; 11: 350-2.
- Hill PC, Jeffries DJ, Brookes RH, Fox A, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Donkor SA, de Jong BC, Corrah T, Adegbola RA. Using ELISPOT to expose false positive skin test conversion in tuberculosis contacts. *PLoS ONE* 2007; 2: e183.
- Mantegani P, Piana F, Codecasa L, Galli L, Scarpellini P, Lazzarin A, Cirillo D, Fortis C. Comparison of an in-house and a commercial RD1-based ELISPOT-IFN-gamma assay for the diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clin Med Res* 2006; 4: 266-72.
- Aiken AM, Hill PC, Fox A, McAdam KP, Jackson-Sillah D, Lugos MD, Donkor SA, Adegbola RA, Brookes RH. Reversion of the ELISPOT test after treatment in Gambian tuberculosis cases. *BMC Infect Dis* 2006; 6: 66.
- Jeffries DJ, Hill PC, Fox A, Lugos M, Jackson-Sillah DJ, Adegbola RA, Brookes RH. Identifying ELISPOT and skin test cut-offs for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in The Gambia. *Int J Tuberc Lung Dis* 2006; 10: 192-8.
- Lazarevic V, Pawar S, Flynn J. Measuring T-cell function in animal models of tuberculosis by ELISPOT. *Methods Mol Biol* 2005; 302: 179-90.
- Doherty TM, Demissie A, Menzies D, Andersen P, Rook G, Zumla A. Effect of sample handling on analysis of cytokine responses to *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples using ELISA, ELISPOT and quantitative PCR. *J Immunol Methods* 2005; 298: 129-41.
- McMurry JA, Kimball S, Lee JH, Rivera D, Martin W, Weiner DB, Kutzler M, Sherman DR, Kornfeld H, De Groot AS. Epitope-driven TB vaccine development: a streamlined approach using immuno-informatics, ELISPOT assays, and HLA transgenic mice. *Curr Mol Med* 2007; 7: 351-68.
- Ekerfelt C, Masreliez C, Svenvik M, Ernerudh J, Roberg M, Forsberg P. Antibodies and T-cell reactivity to *Borrelia burgdorferi* in an asymptomatic population: a study of healthy blood donors in an inland town district in the south-east of Sweden. *Scand J Infect Dis* 2001; 33: 806-8.
- Ekerfelt C, Ernerudh J, Bunikis J, Vrethem M, Aagesen J, Roberg M, Bergstrom S, Forsberg P. Compartmentalization of antigen specific cytokine responses to the central nervous system in CNS borreliosis: secretion of IFN-gamma predominates over IL-4 secretion in response to outer surface proteins of Lyme disease *Borrelia spirochetes*. *J Neuroimmunol* 1997; 79: 155-62.
- Tabidze IL, Lee FK, Tambe P, Rocha E, Larsen SA, Stoll BJ, Louis MES, Nahmias AJ. Enzyme-linked immunospot assay for the diagnosis of active *Treponema pallidum* infection during the various stages of syphilis. *Sex Transm Dis* 1999; 26: 426-30.
- VanCoste JL, Staats HF, Pascual DW, Roberts M, Chatfield SN, Yamamoto M, Cott M, Carter PB, Kiyono H, McGhee JR. Regulation of mucosal and systemic antibody responses by T helper cell subsets, macrophages, and derived cytokines following oral immunization with live recombinant *Salmonella*. *J Immunol* 1996; 156: 1504-14.
- Scheibenbogen C, Romero P, Rivoltini L, Herr W, Schmittl A, Cerottini JC, Woelfel T, Eggermont AM, Keilholz U. Quantitation of antigen-reactive T cells in peripheral blood by IFN-gamma-ELISPOT assay and chromium-release assay: a four-centre comparative trial. *J Immunol Methods* 2000; 244: 81-9.
- Jonuleit H, Giesecke A, Kandemir A, Paragnik L, Knop J, Enk AH. Induction of tumor peptide-specific cytotoxic T cells under serum-free conditions by mature human dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 2000; 292: 325-32.
- Janetzki S, Panageas KS, Ben-Porat L, Boyer J, Britten CM, Clay TM, Kalos M, Maecker HT, Romero P, Yuan J. Results and harmonization guidelines from two large-scale international Elispot proficiency panels conducted by the Cancer Vaccine Consortium (CVC/SVI). *Cancer Immunol Immunother*. 2007 August 25.
- Shafer-Weaver K, Rosenberg S, Strobl S, Gregory AW, Baseler M, Malyguine A. Application of the granzyme B ELISPOT assay for monitoring cancer vaccine trials. *J Immunother* (1997) 2006; 29: 328-35.
- Tarkowski A, Czerkinsky C, Nilsson LA. Simultaneous induction of rheumatoid factor- and antigen-specific antibody-secreting cells during the secondary immune response in man. *Clin Exp Immunol* 1985; 61: 379-87.
- Tarkowski A, Czerkinsky C, Nilsson LA, Nygren H, Ouchterlony O. Solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) assay for enumeration of IgG rheumatoid factor-secreting cells. *J Immunol Methods* 1984; 72: 451-9.
- Pass HA, Schwarz SL, Wunderlich JR, Rosenberg SA. Immunization of patients with melanoma peptide vaccines: immunologic assessment using the ELISPOT assay. *Cancer J Sci Am* 1998; 4: 316-23.
- Frauenthorf E, von GH, May E, Marker-Hermann E. HLA-B27-restricted T cells from patients with ankylosing spondylitis recognize peptides from B\*2705 that are similar to bacteria-derived peptides. *Clin Exp Immunol* 2003; 134: 351-9.
- Willeke P, Schotte H, Schluter B, Erren M, Becker H, Dyong A, Mickholz E, Domschke W, Gaubitz M. Interleukin 1beta and tumour necrosis factor alpha secreting cells are increased in the peripheral blood of patients with primary Sjogren's syndrome. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 359-62.
- Fiorillo MT, Maragno M, Butler R, Dupuis ML, Sorrentino R. CD8(+) T-cell autoreactivity to an HLA-B27-restricted self-epitope correlates with ankylosing spondylitis. *J Clin Invest* 2000; 106: 47-53.
- Hohler T, Hug R, Schneider PM, Krummenauer F, Grippenberg-Lerche C, Granfors K, Marker-Hermann E. Ankylosing spondylitis in monozygotic twins: studies on immunological parameters. *Ann Rheum Dis* 1999; 58: 435-40.

50. Halse A, Wahren-Herlenius M, Jonsson R. Ro/SS-A- and La/SS-B-reactive B lymphocytes in peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 208-13.
51. Halse A, Harley JB, Kroneld U, Jonsson R. Ro/SS-A-reactive B lymphocytes in salivary glands and peripheral blood of patients with Sjogren's syndrome. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 203-7.
52. Ronnelid J, Berg L, Rogberg S, Nilsson A, Albertsson K, Klareskog L. Production of T-cell cytokines at the single-cell level in patients with inflammatory arthritides: enhanced activity in synovial fluid compared to blood. *Br J Rheumatol* 1998; 37: 7-14.
53. Feltelius N, Gudmundsson S, Wennersten L, Sjoberg O, Hallgren R, Klareskog L. Enumeration of IgA producing cells by the enzyme linked immunospot (ELISPOT) technique to evaluate sulphasalazine effects in inflammatory arthritides. *Ann Rheum Dis* 1991; 50: 369-71.
54. Schotte H, Schluter B, Willeke P, Mickholz E, Schorat MA, Domschke W, Gaubitz M. Long-term treatment with etanercept significantly reduces the number of proinflammatory cytokine-secreting peripheral blood mononuclear cells in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2004; 43: 960-4.
55. Okamoto Y, Gotoh Y, Tokui H, Mizuno A, Kobayashi Y, Nishida M. Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT assay. *J Interferon Cytokine Res* 2000; 20: 55-61.
56. Schloot NC, Meierhoff G, Karlsson FM, Ott P, Putnam A, Lehmann P, Gottlieb P, Roep BO, Peakman M, Tree T. Comparison of cytokine ELISPOT assay formats for the detection of islet antigen autoreactive T cells. Report of the third immunology of diabetes society T-cell workshop. *J Autoimmun* 2003; 21: 365-76.
57. Gabriellsson S, Paulie S, Roquet A, Ihre E, Lagging E, van Hage-Hamsten M, Harfast B, Troye Blomberg M. Increased allergen-specific Th2 responses in vitro in atopic subjects receiving subclinical allergen challenge. *Allergy* 1997; 52: 860-5.
58. Gabriellsson S, Soderlund A, Paulie S, Rak S, van der Pouw Kraan TC, Troye Blomberg M. Increased frequencies of allergen-induced interleukin-13-producing cells in atopic individuals during the pollen season. *Scand J Immunol* 1998; 48: 429-35.
59. Thomas P, Pflutzner W, Przybilla B. Frequency and activity of IgE-secreting peripheral blood B-cells in atopic eczema. *Acta Derm Venereol* 1995; 75: 422-5.
60. Hauer AC, Riederer M, Griessl A, Rosegger H, MacDonald TT. Cytokine production by cord blood mononuclear cells stimulated with cows milk proteins in vitro: interleukin-4 and transforming growth factor beta-secreting cells detected in the CD45RO T cell population in children of atopic mothers. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 615-23.
61. Hauer AC, Breese EJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. The frequency of cells secreting interferon-gamma and interleukin-4, -5, and -10 in the blood and duodenal mucosa of children with cow's milk hypersensitivity. *Pediatr Res* 1997; 42: 629-38.
62. Straff W, Spiewak R, Al Massaoudi T, Renn C, Merk H, Sachs B. Wasp venom-induced IL-5, IL-10 and IFN-gamma secretion from human PBMC from patients with wasp venom allergy is differentially inhibited by loratadine, desloratadine, fexofenadine and cimetidine. *Allergy* 2002; 57(Suppl 73): 155.
63. Miyagawa T, Hamagami S, Ohhata I, Ochi T, Kishimoto S. Specific antibody-forming cells in bronchoalveolar lavage fluid of patients with summer-type hypersensitivity pneumonitis-detection by enzyme-linked immunospot (ELISPOT). *Nihon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi* 1993; 31: 840-7.
64. Beeler A, Pichler WJ. In vitro tests of T cell-mediated drug hypersensitivity. *Expert Rev Clin Immunol* 2006; 2: 887-900.
65. Spiewak R. ELISPOT a ELISA: Porównanie (Dokument elektroniczny). URL: [http://www.elispot.pl/epl\\_el01.htm](http://www.elispot.pl/epl_el01.htm) (stan: 29.11.2007)
66. Sedgwick JD, Czerkinsky C. Detection of cell-surface molecules, secreted products of single cells and cellular proliferation by enzyme immunoassay. *J Immunol Methods* 1992; 150: 159-75.
67. McCutcheon M, Wehner N, Wensky A, Kushner M, Doan S, Hsiao L, Calabresi P, Ha T, Tran TV, Tate KM. A sensitive ELISPOT assay to detect low-frequency human T lymphocytes. *J Immunol Methods* 1997; 210: 149-66.
68. Ewen C, Baca-Estrada ME. Evaluation of interleukin-4 concentration by ELISA is influenced by the consumption of IL-4 by cultured cells. *J Interferon Cytokine Res* 2001; 21: 39-43.
69. Masjedi K, Ahlborg N, Gruvberger B, Bruze M, Karlberg AT. Methylisothiazolinones elicit increased production of both T helper (Th)1- and Th2-like cytokines by peripheral blood mononuclear cells from contact allergic individuals. *Br J Dermatol* 2003; 149: 1172-82.
70. Minang JT, Ahlborg N, Troye-Blomberg M. A simplified ELISPOT assay protocol used for detection of human interleukin-4, interleukin-13 and interferon-gamma production in response to the contact allergen nickel. *Exogenous Dermatology* 2003; 2: 306-13.
71. Minang JT, Arestrom I, Zuber B, Jonsson G, Troye-Blomberg M, Ahlborg N. Nickel-induced IL-10 down-regulates Th1- but not Th2-type cytokine responses to the contact allergen nickel. *Clin Exp Immunol* 2006; 143: 494-502.
72. Minang JT, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. Nickel elicits concomitant and correlated in vitro production of Th1, Th2-type and regulatory cytokines in subjects with contact allergy to nickel. *Scand J Immunol* 2005; 62: 289-96.
73. Minang JT, Arestrom I, Troye-Blomberg M, Lundeberg L, Ahlborg N. Nickel, cobalt, chromium, palladium and gold induce a mixed Th1- and Th2-type cytokine response in vitro in subjects with contact allergy to the respective metals. *Clin Exp Immunol* 2006; 146: 417-26.
74. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. Allergic contact dermatitis to nickel: modified in vitro test protocols for better detection of allergen-specific response. *Contact Dermatitis* 2007; 56: 63-9.
75. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. Diagnosis in vitro of contact allergy to nickel: Th2-skewing of PBMC cultures improves the detection of allergen-specific lymphocyte response. *Allergy Clin Immunol Int: J World Allergy Org* 2005; 17: 20-1.
76. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. ELISPOT: potentiële in vitro test voor contactallergie - protocolontwikkeling en eerste resultaten. *Ned Tijdschr Dermatol Venereol* 2004; 14: 61.
77. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. ELISPOT: Th2-polarisatie verbetert in vitro detectie van allergenspecifieke T-celresponsen in contact allergie tegen nikkel. *Ned Tijdschr Dermatol Venereol* 2005; 15: 64.
78. Webb EF, Tzimas MN, Newsholme SJ, Griswold DE. Intralésional cytokines in chronic oxazolone-induced contact sensitivity suggest roles for tumor necrosis factor alpha and interleukin-4. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 86-92.
79. Xu H, Dilulio NA, Fairchild RL. T cell populations primed by hapten sensitization in contact sensitivity are distinguished by polarized patterns of cytokine production: interferon gamma-producing (Tc1) effector CD8+ T cells and interleukin (IL) 4/IL-10-producing (Th2) negative regulatory CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996; 183: 1001-12.
80. Jakobson E, Masjedi K, Ahlborg N, Lundeberg L, Karlberg AT, Scheynius A. Cytokine production in nickel-sensitized individuals analysed with enzyme-linked immunospot assay: possible implication for diagnosis. *Br J Dermatol* 2002; 147: 442-9.
81. Lindemann M, Bohmer J, Zabel M, Grosse-Wilde H. ELISPOT: a new tool for the detection of nickel sensitization. *Clin Exp Allergy* 2003; 33: 992-8.
82. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. In vitro diagnosis of contact allergy to nickel: The value of the ELISPOT assay. *J Invest Dermatol* 2005; 125(3 Suppl): A52.
83. Spiewak R, Moed H, von Blomberg BME, Bruynzeel DP, Scheper RJ, Gibbs S, Rustemeyer T. In vitro diagnosis of nickel allergy. *Contact Dermatitis* 2006; 55(Suppl 1): 25-6.
84. Spiewak R, Czarnobilska E, Jenner B, Curzytek K, Piętowska J, Obtułowicz K. Contact allergy to nickel: Perspectives for reliable laboratory diagnosis. *Allergy* 2007; 62(Suppl 83): 435.