

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

**1**

VOLUME 43  
PRAHA  
JANUARY 1998  
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí České akademie zemědělských věd

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

## Editorial Board – Redakční rada

### Chairman – Předseda

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### Members – Členové

Doc. MVDr. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfelden, Switzerland

Arnost Cepica, DVM., PhD., Associate Professor (Virology/Immunology), Atlantic Veterinary College, U.P.E.I., Charlottetown, Canada

Dr. Milan Fránek, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír Hoříšek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. Drahomír Horák, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. František Kovářů, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Dr. Jozef Laurinčík, DrSc., Institute of Genetics and Experimental Biology, RIAP, Nitra, Slovak Republic

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., DSc. (h. c.), National Institute for Agricultural Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. MVDr. h. c. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s.,

Jilové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

**World Wide Web (URL):** <http://www.clark.cz/vri/casopis.htm>

**Cíl a odborná náplň:** Časopis Veterinární medicína uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny v češtině, slovenštině a angličtině.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

**Periodicita:** Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 43 vychází v roce 1998.

**Přijímání rukopisů:** Rukopisy ve třech vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat u redakci.

**Informace o předplatném:** Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1998 je 624 Kč.

**Aims and scope:** The journal Veterinární medicína original publishes papers and reviews from all fields of veterinary medicine written in Czech, Slovak or English.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, abstracts from the journal are comprised in the databases: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

**Periodicity:** The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 43 appearing in 1998.

**Acceptance of manuscripts:** Three copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

**Subscription information:** Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1998 is 145 USD (Europe), 152 USD (overseas).

# LYSINE-SALICYLATE BASED ANTIPYRETIC IN CLINICAL AND LABORATORY EVALUATION OF TOLERANCE IN CALVES

## ANTIPYRETIKUM NA BÁZE LYZÍN-SALICYLÁTU V KLINICKOM A LABORATÓRNOM HODNOTENÍ ZNÁŠANLIVOSTI U TELIAT

J. Lehocký, O. Nagy, G. Kováč

*University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** In clinical experiments with 26 clinically healthy calves, 2 to 4 months old, Black Spotted Lowland, Slovakian Spotted cattle and their breeds of live weight 60 to 85 kg, clinical and laboratory methods were used to study the effect of combined antipyretic preparation lysine-salicylate (LS) with 20% content of salicylic acid and l-lysine (Biotika, a.s., Slovenská Lupča, SR) on the local and total tolerance, changes of triad values (body temperature, breath and heart rates), parameters of haematological (Er – erythrocyte counts, Lc – leucocyte counts, Hb – haemoglobin concentration, Hk – haematocrit value) and acid-base blood profile (pH, CO<sub>2</sub>, BE – base excess, SB – standard bicarbonate) and their possible changes from the side of circadian effects were compared. Haematological examinations were performed on automatic analyzer of blood cells SERONO system 150 and blood for acid-base analysis was examined on the apparatus ABL 4, manufactured by Radiometer Copenhagen, Denmark. Calves divided into three groups were examined by intramuscularly administered LS in the dose 0.5 ml per 1 kg of live weight (group 1,  $n = 11$ ), by the same dose of physiological solution (FR, group 2,  $n = 9$ ) and calves without examination (group 3,  $n = 6$ ). Maximum applied dose of preparations per 1 site of administration was 20 ml. Intramuscular LS administration, similar to FR, induced short-time (1–1.5 minute) psychomotoric uneasiness (3 calves in group 1, 2 calves in group II) without significant influence on the triad value or clinically detectable reaction of site of administration. Dynamics of the triad values in calves of all groups (Tab. I) did not exceed physiological standards, including consideration of daily rhythms. Haematological profile (Figs. 1–4) in evaluated time intervals showed significant differences neither in calves of different groups, nor among groups, except leukocytes whose counts significantly increased six hours after LS administration (group 1,  $p < 0.01$ ) with subsequent decrease on eighth hour of observation. Insignificant changes were also found in evaluation of parameters of acid-base profile, which in groups and among groups with small fluctuations ranged within initial values. The total values of clinical and metabolic reactions of calves to LS administration as efficient antipyretic in the given therapeutic dose confirmed its good tolerance as well as unburdening effect on studied parameters of internal medium.

calves; lysine-salicylate; clinical evaluation; haematological profile; acid-base profile

**ABSTRAKT:** V klinických pokusoch na 26 klinicky zdravých teľatách vo veku dva až štyri mesiace, plemena NČS, SS dobytka a ich krížencoch o živej hmotnosti 60 až 85 kg sme klinickými a laboratórnymi metódami sledovali vplyv kombinovaného antipyretického prípravku lyzín-salicylátu (LS) s obsahom 20 % kyseliny salicylovej a l-lyzínu (Biotika, a. s., Slovenská Lupča, SR) na lokálnu a celkovú znášateľnosť, zmeny triasových hodnôt (telesná teplota, frekvencia dychu a pulzu), parametre hematologického (Er, Lc, Hb, Hk) a acidobázického profilu (pH, pCO<sub>2</sub>, BE, ŠB) s porovnaním ich možných zmien so strany cirkadiánnych vplyvov. Teľatá rozdelené do troch skupín boli ošetrenej intramuskulárne podaným LS v dávke 0,5 ml na kg živej hmotnosti (1. skupina,  $n = 11$ ), rovnakou dávkou fyziologického roztoku – FR (2. skupina,  $n = 9$ ) a teľatá bez ošetrovania (3. skupina,  $n = 6$ ). Maximálna aplikovaná dávka prípravkov na jedno aplikáčne miesto bola 20 ml. Vnútrošvalové podanie LS, podobne ako aj FR, vyvolalo krátkodobý (1–1,5 min) psychomotorický nepokoj (tri teľatá v 1. skupine, dve teľatá v 2. skupine) bez významného vplyvu na hodnoty triasu, resp. na klinicky zistiteľnú reakciu miesta aplikácie. Dynamika triasových hodnôt u teľiat všetkých skupín (tab. I) nevybočovala z fyziologických noriem, vrátane zohľadnenia denných rytmov. Hematologický profil (obr. 1–4) v hodnotených časových intervaloch nevykázal u teľiat jednotlivých skupín ani medzi skupinami významné rozdiely s výnimkou leukocytov, ktorých počet významne stúpol v 6. hodine po aplikácii LS (1. skupina,  $p < 0,01$ ) s následným poklesom v 8. hodine sledovania. Nevýznamné zmeny sme zistili aj pri hodnotení parametrov acidobázického profilu, ktoré v skupinách i medzi skupinami boli s malými výkyvmi v rozmedzí východiskových hodnôt. Celkové hodnotenie klinických a metabolických reakcií teľiat na podanie LS ako účinného antipyretika v uvedenej terapeutickej dávke potvrdilo jeho dobrú znášateľnosť, ako aj nezafazujúci vplyv na sledované parametre vnútorného prostredia.

teľatá; lyzín-salicylát; znášateľnosť; klinické hodnotenie; hematologický profil; acidobázický profil

## ÚVOD

Rôzne infekčné a neinfekčné ochorenia zvierat sú spravidla sprevádzané alteráciou zdravotného stavu najmä v spojení s vysokou febrilitou. Zníženie vysýľujúcej horúčky a úprava celkovej reaktívnosti organizmu so zlepšením spontánneho príjmu krmiva a tekutín má mimoriadny význam pre ďalší priebeh ochorenia a konečný efekt použitej liečby. Kombinovaná terapia s použitím antibakterík a antipyretík aj na základe skúseností z humánnej medicíny umožňuje zefektívniť a skrátiť obdobie liečby. Hlavné v začiatkoch ochorenia predstavujú antipyretiká účinný prostriedok na prekonanie nežiaducich komplikácií následkom vyčerpania organizmu pri horúčkových stavoch spojených s ďalšími systémovými zmenami (Kastings a Martin, 1983).

Veterinárna medicína v súčasnosti nedisponuje špeciickým veterinárnym antipyretickým prípravkom. V praxi malých zvierat sa využíva kyselina acetylsalicylová vyrábaná pre humánne účely, v praxi veľkých zvierat sa používajú v súčasnosti niektoré prípravky s primárnym analgetickým a antiflogistickým účinkom zahŕňajúce aj pôsobenie antipyretické (Analgin, Novalgin, Finadyne, Novacoc forte). Salicylany sú však stále objektom záujmu lekárskej praxe a patria k veľmi často používaným liečivám vôbec. Účinok salicylanov na organizmus je mnohostranný a zostáva faktom, že patria k najstabilnejšej skupine liekov. Samotné alebo v kombinácii s inými liečivami majú svoje opodstatnenie v terapii horúčkových, zápalových a reumatických stavov (Hagg a i., 1986). Osobitný význam majú v prevencii srdcovo-cievnych ochorení vzhľadom na ich antikoagulačné účinky (Hromec, 1985) a u pacientov s chronickou nedostatočnosťou srdca sa používajú ako periférne hemodynamikum alebo ako inhibitor cyklooxygenázy (Van Wijngaarden, 1994). U teliat v kardiovaskulárnych implantačných pokusoch (Jarsma a i., 1993) sa využíva aspirín ako efektívny protizrážavý prostriedok. Priaznivé účinky malo podanie salicylanu sodného pri liečbe akútnych mastitíd kráv (Morkoc a i., 1993), ako aj kyseliny salicylovej pri subklinicky prebiehajúcich zápaloch mliečnej žľazy (Malinowski, 1992).

Cieľom práce bolo posúdiť vplyv parenterálne (intramuskulárne) podaného množstva odporúčanej terapeutickú dávku kombinovaného antipyretického prípravku na báze lyzín-salicylátu na hodnoty triasu, lokálnu a celkovú znášanlivosť, hematologický a acidobázický profil u teliat. Zámerom bolo posúdiť požadovanú toleranciu prípravku a súčasne hodnotením uvedených metabolických profilov, ako aj bežných ukazovateľov reaktivity, vrátane možných cirkadiánnych zmien, dokázať jeho nezaťažujúci vplyv v uvedenej dávke a zložením na vybrané parametre vnútorného prostredia ošetrovaných zvierat.

## MATERIÁL A METÓDY

Pokus bol vykonaný na klinike Katedry vnútorných chorôb prežúvavcov a ošpaných ÚVL v Košiciach na

26 kusoch klinicky zdravých teliat plemena NČS, SS dobytka a ich krížencoch vo veku dva až štyri mesiace s hmotnosťou 60 až 85 kg. Teľatá boli rozdelené do troch hmotnostne vyrovnaných skupín a pred pokusom im neboli podávané žiadne iné liečivá.

1. skupine teliat ( $n = 11$ ) bol aplikovaný v *i. m.* injekcii do svaloviny krku kombinovaný antipyretický prípravok na báze lyzín-salicylátu – LS (20% kyselina salicylová a l-lyzín; Biotika, a. s., Slovenská Lupča, SR) v dávke 0,5 ml/kg ž. hm., maximálne 20 ml na jedno miesto aplikácie.

2. skupine teliat ( $n = 9$ ) bola za rovnakých podmienok podaná rovnaká dávka fyziologického roztoku – FR.

3. skupina teliat ( $n = 6$ ) bola kontrolná (K), bez akejkoľvek aplikácie a slúžila na porovnanie vo vzťahu k možným cirkadiánnym vplyvom zmien hodnotených ukazovateľov.

Vo všetkých skupinách teliat sme sledovali a porovnávali hodnoty triasu (telesná teplota, frekvencia dychu a pulzu) pred aplikáciou a 5, 10, 30 a 60 minút po podaní roztokov. Lokálnu a celkovú znášanlivosť na podané roztoky sme sledovali hneď po aplikácii ďalej 2, 4, 8 a 24 hodín po aplikácii. Krv na sledovanie parametrov hematologického a acidobázického profilu sme odoberali z v. *jugularis* pred podaním prípravkov a 2, 4, 6 a 8 hodín po aplikácii. Uvedené vyššetrovania sme robili bežnými klinickými vyššetrovacími metódami (Slaniina, Lehocný a i., 1993).

Hematologické vyššetrovanie bolo vykonané na automatickom analyzátoze krviniek SERONO systém 150. Vyšetrenie zahŕňalo hodnotenie počtu erytrocytov (Er), leukocytov (Lc), koncentrácie hemoglobínu (Hb) a hodnoty hematokritu (Hk).

Krv na acidobázické vyššetrovanie bola odoberaná do sklenených striekačiek o objeme 1 ml s vyplneným mŕtvym priestorom roztokom heparínu o koncentrácii 500 m. j. a analyzovaná na prístroji ABL 4 fy. Radiometer Copenhagen, Dánsko, hneď po odbere. V acidobázickom profile sme hodnotili hodnoty aktuálnej acidity (pH), parciálneho tlaku oxidu uhličitého (pCO<sub>2</sub>), štandardného bikarbonátu (ŠB) a prebytok báz (BE).

Výsledky boli matematicky a štatisticky spracované v programe QPRO a Statgrafics s hodnotením priemerých hodnôt, smerodajnej odchýlky a párového *t*-testu.

## VÝSLEDKY

Lokálna znášanlivosť aplikovaných preparátov pri použitej dávke bola dobrá. U dvoch teliat v 1. skupine a u jedného teľaťa v 2. skupine bolo miesto aplikácie palpačne citlivejšie s miernou edematizáciou po dobu štyroch hodín od podania. Celková reakcia ošetrovaných teliat zodpovedala bežnej reakcii na vnútrošarvovú injekciu. Tri teľatá v 1. skupine a dve teľatá v 2. skupine prejavili krátkodobý psychomotorický nepokoj (1 až 1,5 min) hneď po aplikácii roztokov. V ďalšom období všetky teľatá normálne prijímali krmivo a pili. Ani u teliat s miernymi lokálnymi krátkodobými reakciami sa

po 24 hodinách nepozorovali žiadne klinické zmeny, resp. oneskorené prejavy iritácie tkaniva v mieste aplikácie.

Vnútrotná telesná teplota teliat (tab. I) sa počas celého sledovaného obdobia vo všetkých troch skupinách pohybovala priemerne v rozmedzí 38,6 až 39,4 °C. Neboli zaznamenané významné rozdiely v ich dynamike ani v rámci skupín, ani medzi skupinami. Priemerné hodnoty frekvencie pulzu (tab. I) v sledovaných intervaloch kolísali od 72 do 84 pulzov za minútu bez významných zmien v rámci skupín i medzi skupinami. Podobný trend sme zaznamenali aj pri hodnotení frekvencie dychu, ktorá sa v skupinách pohybovala v priemeroch v rozmedzí 28 až 36 za minútu bez významných zmien v dynamike medzi skupinami, resp. v rámci nich. Mierne nesignifikantné zvýšenie hodnôt frekvencie pulzu a dychu sme zaznamenali len v 5. minúte sledovania v 1. a 2. skupine teliat.

Sledované parametre hematologického profilu u hodnôt erytrocytov (obr. 1), hematokritu (obr. 2) a koncentrácie hemoglobínu (obr. 3) nevykázali v hodnotených intervaloch významné zmeny oproti východiskovým hodnotám vo všetkých troch skupinách teliat. Hodnoty počtu leukocytov v 1. skupine teliat (obr. 4) zaznamenali mierny nevýznamný nárast už v 2. a 4. hodine s ďalším štatisticky významným vzostupom ( $p < 0,01$ ) v 6. hodine pokusu a následným poklesom k 8. hodine po aplikácii. V 2. a 3. skupine teliat dynamika počtu leukocytov mala vyrovnaný trend bez významných zmien počas celého sledovaného obdobia.

I. Hodnoty triasu u teliat podľa skupín a jednotlivých časových intervalov – Triad values in calves according to groups and different time intervals

Čas po aplikácii <sup>1</sup> (min)	1. skupina (LS) <sup>2</sup>	2. skupina (FR) <sup>3</sup>	3. skupina (K) <sup>4</sup>
Telesná teplota <sup>5</sup> ( $\bar{x} \pm sd$ )			
0	38,9 ± 0,3	39,2 ± 0,2	38,8 ± 0,3
5	39,0 ± 0,2	39,1 ± 0,3	38,9 ± 0,2
10	38,8 ± 0,3	39,4 ± 0,1	38,6 ± 0,3
30	38,9 ± 0,2	38,9 ± 0,2	38,8 ± 0,2
60	38,7 ± 0,3	38,8 ± 0,3	38,9 ± 0,3
Frekvencia dychu <sup>6</sup> ( $\bar{x} \pm sd$ )			
0	28,2 ± 1,4	30,2 ± 2,0	32,1 ± 1,5
5	32,5 ± 1,6	33,1 ± 1,8	34,3 ± 1,7
10	30,3 ± 2,1	30,8 ± 1,6	36,4 ± 1,3
30	29,1 ± 1,5	31,3 ± 2,0	34,6 ± 1,9
60	28,4 ± 1,3	32,6 ± 1,7	34,1 ± 1,4
Frekvencia pulzu <sup>7</sup> ( $\bar{x} \pm sd$ )			
0	76,3 ± 3,1	78,2 ± 3,2	78,4 ± 2,8
5	72,4 ± 2,8	79,9 ± 2,9	82,8 ± 2,5
10	78,1 ± 2,9	83,3 ± 3,1	79,3 ± 2,9
30	76,2 ± 2,4	78,5 ± 2,5	83,8 ± 2,8
60	78,3 ± 2,7	80,6 ± 2,7	81,5 ± 2,6

<sup>1</sup>time after application, <sup>2</sup>group I (LS), <sup>3</sup>group II (FR), <sup>4</sup>group III (K), <sup>5</sup>body temperature, <sup>6</sup>breath rate, <sup>7</sup>heart rate

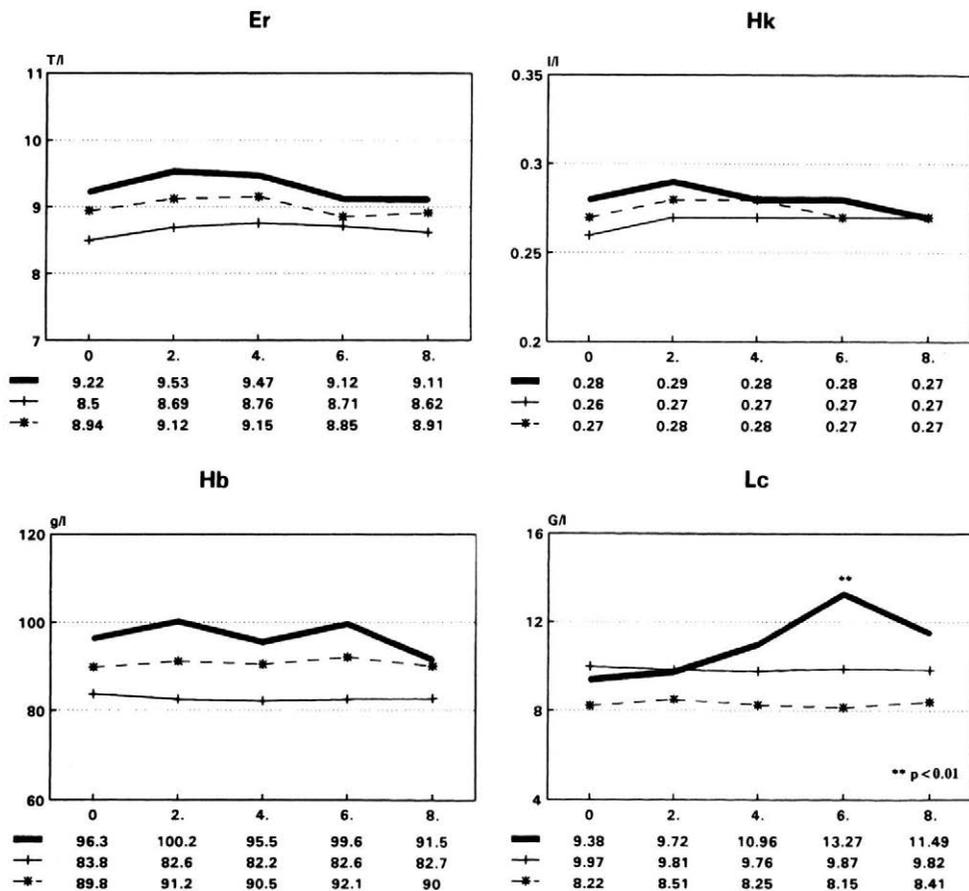
Pri hodnotení parametrov acidobázického profilu (obr. 5, 6, 7, 8) sme počas celého obdobia po aplikácii preparátov nezistili ani v jednej zo sledovaných skupín teliat sa aplikáciou LS a FR významné zmeny v dynamike hodnotených ukazovateľov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Vo všetkých troch skupinách bol preukázaný takmer vyrovnaný trend hodnôt len s miernymi nevýznamnými odchýlkami v porovnaní s východiskovými hodnotami počas celého obdobia sledovania.

## DISKUSIA

Parenterálne formy liečiv okrem deklarovaného účinku, sterility a apyrogenity by po podaní odporúčanej dávky mali čo najmenej poškodiť tkanivo v mieste aplikácie a neprekročiť nevyhnutnú mieru lokálnej a celkovej reakcie ošetrovaného zvieratá. Praktické skúsenosti ukázali, že vnútrošalová injekcia u teliat podaná v množstve do 20 ml na jedno miesto je spravidla dobre tolerovaná. Väčšie množstvá sa neodporúčajú pre možné kompresné podráždenie tkanív a následné, väčšinou krátkodobé a prechodné iritačné zmeny. Nevyhnutná manipulácia so zvieratami v súvislosti najmä s parenterálnou aplikáciou zvyšuje ich iritačné prejavy a môže najmä neurohumorálnou cestou ovplyvniť nielen lokálnu, ale aj celkovú reakciu zvieratá na podaný prípravok. Z tohto aspektu, ako ukázali naše sledovania u teliat, je intramuskulárna aplikácia LS v uvedenej terapeutickú a aplikačnej dávke vhodná. U ošetrovaných teliat sme nezaznamenali žiadne negatívne reakcie pri posudzovaní lokálnej a celkovej reakcie na podaný prípravok (LS a FR). Krátkodobý nepokoj niektorých teliat 1. a 2. skupiny tesne po aplikácii, vrátane mierneho zvýšenia frekvencie pulzu a dychu, súvisel s individuálnou reakciou teliat už na samotnú fixáciu a injekciu. Nevýznamnosť reakcie potvrdzuje dynamika triasových hodnôt a negatívny klinický nález v mieste aplikácie aj po 24 hodinách.

Pri hodnotení dynamik vnútornej telesnej teploty zistených v rámci skupín sú vo fyziologickom rozmedzí a podanie LS podobne ako FR ich významne neovplyvnilo. Podobné výsledky bez významných zmien dynamiky sledovaných parametrov hematologického a acidobázického profilu počas osemhodinového denného intervalu sme v žiadnej skupine teliat nezaznamenali s výnimkou dynamiky leukocytov.

Keďže z dostupných literárnych údajov je zrejmé, že pri hodnotení fyziologických, ale aj metabolických parametrov môžu mať cirkadiánne zmeny určitý vplyv, naše výsledky sme hodnotili aj z tohto hľadiska (3. skupina teliat – kontrolná). Odbery krvi a klinické vyšetrenia sme robili medzi 7.–15. hodinou tak, ako sa tieto úkony v klinickej praxi bežne dodržiavajú. Zohľadňuje sa pri nich denný a kŕmny režim, resp. v terénnych pokusoch technologické postupy, veková tvorba skupín zvierat a pod. (Aurich a Weber, 1994; Hosokawa a i., 1992). Autori prezentujúci výsledky vplyvov cirkadiánnych zmien interpretujú svoje poznatky



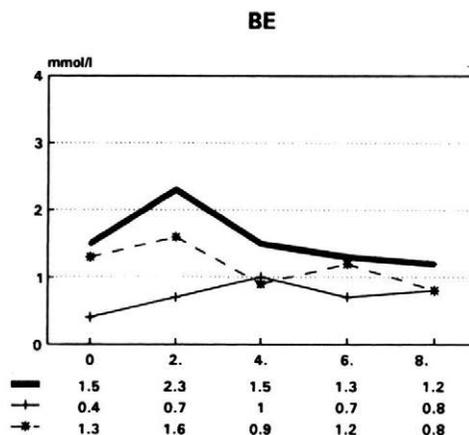
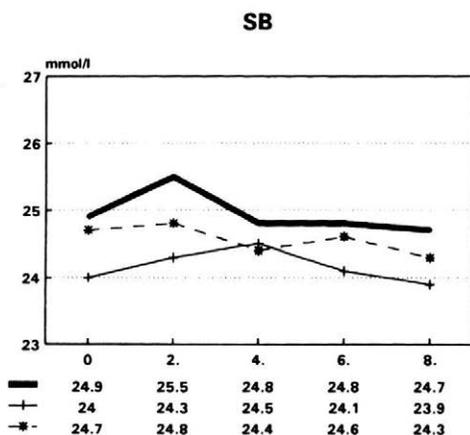
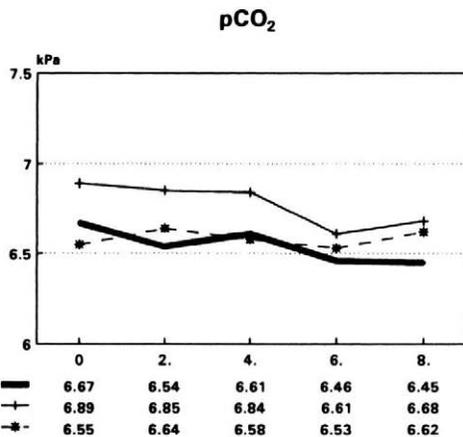
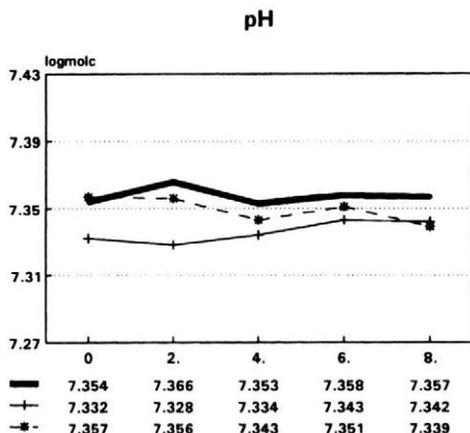
1.-4. Dynamika hematologických ukazovateľov v sledovaných skupinách teliat – Dynamics of haematological parameters in studied groups of calves

— 1. skupina – group 1  
 + 2. skupina – group 2  
 -\* 3. skupina – group 3

rôzne. Výraznejšiu dynamiku v hladinách rôznych minerálnych látok v krvi dojníc zistili pri sledovaní od 8. do 18. hodiny Unshelm a Rappon (1968) a pre aktivitu enzýmov Hagemeister a Unshelm (1968). Gabriš a Ďuran (1987), ktorí vyššie uvedené autorov citujú, pri sledovaní obsahu bielkovín, glukózy, popola a sušiny v jednotlivých intervaloch počas 24 hodín nezistili výraznú cirkadiánnu dynamiku. Odporúčajú však pri odbere vzoriek brať do úvahy dennú dobu, aby sa predišlo možným, ťažko vysvetliteľným nezrovnalostiam vo výsledkoch. Naše pozorovania konané v čase od 7. do 15. hodiny nepotvrdili významný vplyv cirkadiánných zmien na sledované parametre uvedených metabolických profilov. V hematologickom profile sa zisťované hodnoty Er, Hb a Hk pohybovali

vo všetkých skupinách zvierat v oblasti východiskových hodnôt. Štatisticky významný vzostup leukocytov ( $p < 0,01$ ) sme zistili v 6. hodine po podaní LS s následným poklesom k 8. hodine. LS má okrem antipyretického, analgetického, substitučného, aj stimulačný účinok vrátane vplyvu na celulárnu obranu organizmu. Zaznamenaný vzostup leukocytov mohol byť vyvolaný aj samotnou aplikáciou použitého objemu prípravku do svalu. Je známe, že aj nenáročné krátkodobé zákroky môžu viesť k leukocytóze spôsobenej neutrofiliou (Mudroň a i., 1994). Vzhľadom na krátky časový interval sledovania a použité klinicky zdravé teľatá vyžaduje toto zistenie opakované a cielene postavené experimenty.

V acidobázickom profile LS za sledované osemhodinové obdobie nemal významnejší vplyv na referenč-



5.-8. Dynamika parametrov acidobázického profilu krvi v sledovaných skupinách teliat – Dynamics of acid-base profile in blood in studied groups of calves

— 1. skupina – group 1  
 - - 2. skupina – group 2  
 . . . 3. skupina – group 3

né hodnoty a dynamiku uvedených parametrov. Úroveň zmien v jednotlivých časových intervaloch v 1. a 2. skupine bola podobná ako v skupine kontrolnej. Hodnoty pH krvi namerané počas celého experimentu vykazovali tendenciu k miernej acidóze (Vrzgula a Sokol, 1987; Slanina a Lehocký a i., 1992). V dostupných literárnych zdrojoch sme nezaznamenali poznatky s hodnotením acidobázických pomerov po parenterálnom podaní salicylátov. Častejšie sa popisujú otravy salicylátmi u ľudí po perorálnom prijíme vysokých dávok, prípadne aj v kombinácii s alkoholom, kde sa popisuje vznik metabolickej acidózy (Bartels a Lund-Jacobsen, 1986). Eppler a i. (1996)

hodnotili na modeli ošipaných perorálne podávanie vysokých dávok kyseliny acetylsalicylovej a konštatujú jej dobrú toleranciu, keď i pri dávke 500 mg/kg nekleslo pH venóznej krvi pod 7,2 a bikarbonáty boli vyššie než 15 mmol/l.

Z našich výsledkov je teda zrejme, že LS ani metabolicky nezaťažá ošetrované zvieratá a dynamika sledovaných biochemických parametrov sa nelíši v porovnaní s ostatnými hodnotenými skupinami. Ani možné cirkadánne vplyvy, ktoré sme však v našom pokuse nepotvrdili, negatívne neovplyvňujú použitie LS. Lyzín-salicylát v danej indikácii, dávke a forme aplikácie nenaruša aktuálny stav vnútorného prostredia ošetrovaných zvierat.

## LITERATÚRA

- AURICH, K. – WEBER, R. (1994): Effect of increased sucking resistance on sucking behaviour in a group of calves. *KTBL-Schrift*, 361(22), 154–166.
- BARTELS, P. D. – LUND-JACOBSEN, H. (1986): Blood lactate and ketone body concentrations in salicylate intoxication. *Hum. Toxicol.*, 5, 363–366.
- EPPLER, J. – JOHNSON, D. – VERJEE, Z. – GIESBRECHT, E. – ITO, S. (1996): Measurement of serum acetylsalicylic acid in a porcine model of aspirin overdose. *Vet. Hum. Toxicol.*, 38, 409–412.
- GABRIŠ, J. – ĐURAN, A. (1987): Hladina niektorých metabolitov v krvi kráv počas 24 hodín. *Vet. Med. – Czech*, 32, 399–407.
- HAGGAG, A. A. – MOHAMED, H. F. – ELDAWY, M. A. – ELBAHRAWY, H. (1986): Biochemical studies on the anti-inflammatory activity of salicylates as superoxide radical scavengers. *IRCS Med. Sci.*, 14, 1104–1105.
- HAGEMEISTER, H. – UNSHELM, J. (1968): Individuelle, tages- und tageszeitabhängige Schwankungen von Blutbestandteilen beim Rind. 2. Mitteilung. Das Verhalten der Enzymaktivität von GOT, GPT, LDH, MDH, CLDH und alkalische Phosphatase. *Zbl. Veter.-Med., R.A.*, 15, 499–509.
- HOSOKAWA, M. – OHATA, E. – YAMAMOTO, T. – OURA, R. – SEKINE, J. (1992): Pospartum changes in diurnal pattern of the behaviour for suckling, water drinking and solid feed eating of Japanese Black calves in the suckling period. *J. Fac. Agric., Tottori University*, 28, 45–52.
- HROMEČ, A. (1985): *Vademecum Medici*. Martin, Osveta. 1630 s.
- JAARSMA, R. L. – MOHAMMAD, S. F. – BURNS, G. L. – OLSEN, D. B. (1993): Alprostadil: an effective antiplatelet agent for calves. *Artif. Organs*, 17, 935–939.
- KASTING, N. W. – MARTIN, J. B. (1983): Push pull perfusion technique in the medium eminence a modul system for evaluating releasing factor dynamics. *Meth. Enzymol.*, 103, 176–187.
- MALINOWSKI, E. (1992): Single infusion on an antibiotic with glucose and acetylsalicylic acid or chlormethidine as a new method of subclinical mastitis treatment in cows in the lactation period. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 36, 24–30.
- MORKOC, A. C. – HURLEY, W. L. – WHITMORE, H. L. – GUSTAFSSON, B. K. (1993): Bovine acute mastitis: effects of intravenous sodium salicylate on endotoxin-induced intramammary inflammation. *J. Dairy Sci.*, 76, 2579–2588.
- MUDROŇ, P. – KOVÁČ, G. – BAJOVÁ, V. – PISTL, J. – CHOMA, J. – BARTKO, P. (1994): Effect of vitamin E on some leucotic parameters and functions in transported calves. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, 101, 47–49.
- SLANINA, L. – LEHOČKÝ, J. a i. (1992): Metabolický profil hovädzieho dobytko vo vzťahu k zdraviu a produkcii. Bratislava, ŠVS SR. 115 s.
- SLANINA, L. – LEHOČKÝ, J. a i. (1993): Veterinárna klinická diagnostika vnútorných chorôb. Bratislava, Príroda. 389 s.
- UNSHELM, J. – RAPPOŇ, W. H. (1968): Individuelle, tages- und tageszeitabhängige Schwankungen von Blutbestandteilen beim Rind. 1. Mitteilung: Das Verhalten der Mineralstoffe Natrium, Kalium, Kalzium, Magnesium und anorganischem Phosphor. *Zbl. Veter.-Med., R.A.*, 15, 418–437.
- VAN WIJNGAARDEN, J. (1994): Effects of acetylsalicylic acid on peripheral hemodynamics in patients with chronic heart failure treated with angiotensin-converting enzyme inhibitors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 23, 240–245.
- VRZGULA, L. – SOKOL, J. (1987): Hodnoty metabolických profilových testov u domácich zvierat a ich interpretácia. IVVVV Košice. 61 s.

Received: 97–07–15

Accepted after corrections: 97–10–21

---

### Kontaktná adresa:

Doc. MVDr. Ján Lehocký, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/633 21 11–15, fax 095/632 36 66, e-mail: lehocky@vsvnov.uvm.sk

---

# IMMUNOREACTIVITY OF INTERLEUKIN-8 AND ABSENCE OF INTERFERON-ALPHA IN PORCINE BRONCHOALVEOLAR LAVAGE CELLS INFECTED WITH PRRS VIRUS\*

## IMUNOREAKTIVITA INTERLEUKINU-8 A NEPŘÍTOMNOST INTERFERONU ALFA V PRASEČÍCH BUŇKÁCH BRONCHOALVEOLÁRNÍCH LAVÁŽÍ INFIKOVANÝCH VIREM PRRS

I. Trebichavský<sup>1</sup>, L. Valíček<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Nový Hrádek, Czech Republic

<sup>2</sup> Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

**ABSTRACT:** Interleukin-8 immunoreactivity was detected in porcine bronchoalveolar lavage (BAL) cells as soon as three hours postinfection *in vitro* with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), using the immunofluorescence method. Also the number of TGF- $\beta$  but not that of TNF- $\alpha$  BAL cells slightly increased after the infection. No IFN- $\alpha$  cells were detectable.

swine; alveolar macrophages; PRRS virus; interleukin-8

**ABSTRAKT:** Imunoreaktivita interleukinu-8 (IL-8) byla detekována již za tři hodiny v buňkách prasečích bronchoalveolárních laváží (BAL) *in vitro* infikovaných virem reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV) pomocí imunofluorescence. Také procento TGF- $\beta^+$  buněk se zvýšilo po infekci, avšak ne procento buněk obsahujících TNF- $\alpha$ . Nebyly nalezeny buňky produkující IFN- $\alpha$ .

prase; alveolární makrofágy; PRRS virus; interleukin-8

### INTRODUCTION

Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) was first reported in the United States in 1987 (Keffaber, 1989). Outbreaks of this disease were recorded in the nineties in many European countries. PRRS virus (PRRSV) isolated at the Central Veterinary Institute at Lelystad (the Netherlands) was designated as aetiological agent of this disease (Wensvoort et al., 1991; Terpstra et al., 1991). Its classification with the arterivirus group of *Togaviridae* is based on biochemical and morphological characteristics (Meulenbergh et al., 1993). In the Czech Republic PRRS was diagnosed for the first time in 1995 (Valíček et al., 1995).

PRRSV elicits immunosuppressive effects in their hosts causing a marked change in the CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> ratio in peripheral blood T cells in the first week after infection (Shimizu et al., 1996). Destruction of lung macrophages leads to fatal respiratory infections in young animals.

Porcine bronchoalveolar lavages (BAL) contain macrophages and lymphocytes (null, T and NK cells). Neutrophils occur mostly in the course of bacterial infections. Alveolar macrophages clear and inactivate airborne viral particles. They act as scavengers, antigen presenting and effector cells. Paradoxically enough, the same cells also represent the major target cell type for many viruses. In swine, African swine fever iridovirus replicates in monocytes/macrophages, and transmissible gastroenteritis coronavirus (Gendelman and Morahan, 1992), porcine cytomegalovirus (Valíček et al., 1977), and PRRS arterivirus in alveolar macrophages.

Antiviral immunity is regulated by cytokines induced within the infected cells. The most important antiviral cytokines interferon- $\alpha$  (produced by macrophages) and interferon- $\gamma$  (secreted by NK and T cells) upregulate MHC class II expression on macrophages and increase their ability to present viral antigens to T cells. Interferon- $\gamma$  upregulates macrophage expression of IL-8, a chemokine attracting neutrophils. Further

\* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grants Nos. 524/97/0533 and 508/95/0337).

two cytokines play an important role in the regulation of antiviral immunity: IL-4 inhibits the production of IL-8 and IFN- $\gamma$ , and IL-12 upregulates IFN- $\gamma$  and stimulates antiviral activity of NK cells (Biron, 1997). Antiviral role of other cytokines has not yet been elucidated, but it is known that inflammatory monokines increase the resistance against secondary bacterial infections.

PRRSV replicates in porcine alveolar macrophages and blood monocytes (Voicu et al., 1994). Infection of these cells is likely to cause the production of a number of monokines. The aim of this study was to detect cytokines induced in porcine BAL cells infected *in vitro* with the PRRSV strain Lelystad.

## MATERIAL AND METHODS

### Bronchoalveolar lavage (BAL) cells

Five-week-old piglets (Landrace x White Improved crosses) free of PRRSV antibodies and negative for Pasteurella were killed under anaesthesia. Their lung airways were lavaged twice with phosphate buffered saline (PBS) as described elsewhere (Šmíd et al., 1977). BAL cells were seeded in Nunclon 50ml polystyrene flasks (1.5 million cells/ml RPMI-1640 medium with antibiotics supplemented with 10% of bovine foetal serum). *In vitro* infection of BAL cells were repeated three times.

### Cell infection

BAL cells were infected *in vitro* with the Lelystad strain of PRRS virus ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>/ml). Neither brefeldin nor monensin were used for the inhibition of Golgi function. The cells were rinsed with PBS 3, 12 and 24 hours after the infection and fixed one day with 1% paraformaldehyde in PBS at 4 °C. The fixed cells were scraped off, thoroughly washed in PBS and incubated with anti-cytokine antibodies containing 0.1% saponin.

Mouse monoclonal anti-cytokine antibodies:

- anti-pig TNF- $\alpha$  was purchased from Endogen (Woburn, MA, USA);
- anti-pig IFN- $\alpha$  (F17 and K9 clones) antibodies were kindly donated by Dr. B. Charley (INRA, Jouy-en-Josas, France);
- cross-reactive (80% homology) anti-human IL-8 and cross-reactive (100% homology) anti-human TGF- $\beta$ 1,2,3 were purchased from Genzyme Diagnostics (Cambridge, USA).

### Immunofluorescence

Washed cells were permeabilized (Sander et al., 1991; Trebichavský et al., 1995). Anti-cytokine antibodies were diluted 1 : 10 with PBS containing 0.1% buffered saponin. Mouse antibodies were de-

TECTED with porcine anti-mouse immunoglobulin labelled with FITC (Medicamenta, Vysoké Mýto, Czech Rep.) 1 : 20 diluted with PBS containing saponin. This latter antibody does not bind to porcine cells.

Cell smears were examined in an Orthoplan fluorescence microscope (Leitz, Wetzlar, Germany) equipped with a FITC specific filter system. Two hundred cells were counted in each sample. Negative controls consisted of an irrelevant antibody of the same isotype. Both the anti-IFN- $\alpha$  antibodies used in this study were tested in porcine cells infected with TGE virus.

## RESULTS

BAL cells consisted of macrophages (31–90%) and lymphocytes. Neither neutrophils nor any other cell types (e.g. eosinophils or mast cells) were found in cell smears stained with May-Grünwald stain. Non-infected cells and BAL cells 3 hours postinfection showed normal morphological patterns. On the contrary, all macrophages collected 12 and 24 hours postinfection were seriously damaged. Lymphocytes in all the samples expressed the normal phenotype.

### Cytokine staining:

IL-8 and TGF- $\beta$  positivity increased with postinfection time. On the contrary, the TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> cells were rare in all the samples and IFN- $\alpha$  was not expressed at all.

Mean percentages of positive cells were as follows: IL-8 control 1.1  $\pm$  0.9% weak cytoplasmic staining

3 hours 4.6  $\pm$  1.7% perinuclear, Golgi and membrane staining

12 hours 16.6  $\pm$  7.9% cytoplasmic staining

24 hours 61.0  $\pm$  33.1% strong cytoplasmic staining

TGF- $\beta$  control 1.2%

3 hours 1.4%

12 hours 4.3  $\pm$  1.5%

TNF- $\alpha$  control 0.3  $\pm$  0.2%

3 hours 0.4  $\pm$  0.2%

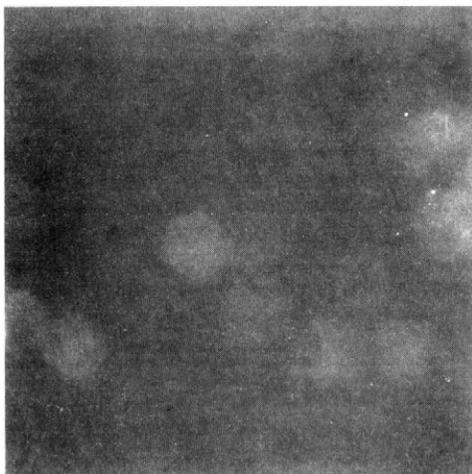
24 hours 0.5  $\pm$  0.1%

IFN- $\alpha$  all samples negative

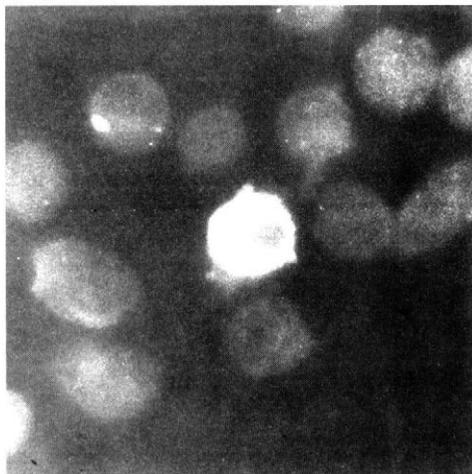
## DISCUSSION

To our knowledge, little is known about porcine IL-8. We found IL-8 immunoreactivity in bronchoalveolar lavage cells infected with PRRSV as early as three hours postinfection but not in non-infected cells (Fig. 1–3). Strong positivity of all macrophages one day postinfection (Fig. 4) could be explained either by non-specific binding to dead cells (not seen with other anti-cytokine antibodies, however), by external IL-8 molecules bound to macrophage IL-8 receptors, or by an irreversible block of IL-8 secretion.

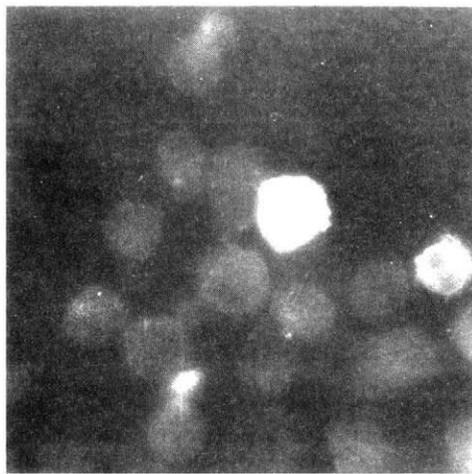
Anti-human IL-8 stains both human and porcine peripheral blood mononuclear cells stimulated with bacterial substances (unpublished results). IL-8 is induced



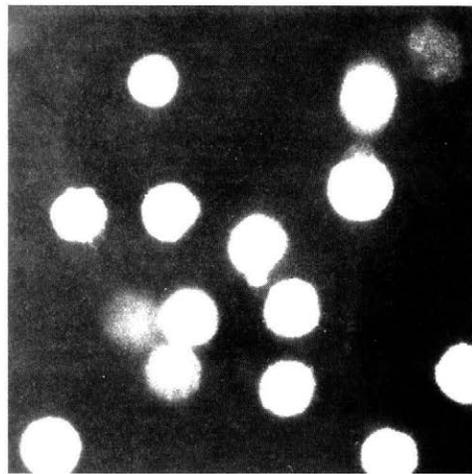
1. Negative non-infected cells (800x)



2. Membrane positivity 3 hours postchallenge (1000x)



3. Membrane and Golgi positivity 3 hours postchallenge (800x)



4. Cytoplasmic staining of all macrophages 24 hours postchallenge (600x)

in macrophages by viral RNA in the course of some viral infections, including HIV. Recombinant porcine IL-8 shows 80% similarity with human IL-8 which recruits porcine neutrophils as efficiently as human cells (Murtagh, 1994). It seems very probable that anti-human IL-8 recognizes porcine IL-8 molecules.

Porcine lung perivascular and alveolar macrophages form an important part of antibacterial resistance (Pabst, 1996). Consequently, PRRSV cytotoxicity enhances secondary respiratory infections which aggravate the prognosis of the disease. IL-8 produced by lung macrophages may explicate fever observed in piglets affected by PRRS.

TNF- $\alpha$  was not upregulated in infected BAL cells. This cytokine is often elicited by some bacterial substances as lipopolysaccharide and may be produced in PRRS during secondary bacterial infections.

The absence of IFN- $\alpha$  was surprising and could be explicated either by macrophage necrosis (cells are dead 12 hrs postinfection and IFN- $\alpha$  is produced in slower rate than other cytokines studied) or by cytokine inhibition in cells infected with PRRSV.

The frequency of TGF- $\beta$  correlated with that of IL-8. Porcine TGF- $\beta$  and human TGF- $\beta$  share a 100% homology and therefore antibodies reacting with one spe-

cies are applicable for both of them. TGF- $\beta$  was found also in the cytoplasm of damaged macrophages.

Finally, it should be mentioned that elevated concentrations of IL-8 correlated with cytomegalovirus replication in HIV infected cells. This suggests that cytokine induction can be used by infectious agents for their survival and could be responsible for at least some adverse effects of immune reactions observed in the course of viral diseases.

#### Notes in proof

It is noteworthy in this context that IFN- $\alpha$  was not detected by an ELISA in lavages of lungs taken from pigs infected with PRRSV. Furthermore, IFN- $\alpha$  induction in porcine BAL cells infected with an irrelevant virus was suppressed by PRRSV (Charley – personal communication).

In the time of reviewing of this manuscript, Whittall and Parkhouse published in *Immunology* (91, 1997: 444–449) similar results with another virus infecting porcine alveolar macrophages – African swine fever virus (ASFV). Porcine macrophages infected with ASFV *in vitro* did not produce TNF- $\alpha$ . On the contrary, TGF- $\beta$  was induced. Transforming growth factor- $\beta$  alone induced suppression in uninfected macrophages.

#### Acknowledgments

We wish to thank Ms. Marie Zahradníčková for her excellent technical assistance.

#### REFERENCES

BIRON, C. A. (1997): Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Curr. Opin. Immunol.*, **9**, 24–34.  
GENDELMAN, H. E. – MORAHAN, P. S. (1992): Macrophages in viral infections. In: LEWIS, C. E. – McGEE, J. O. D.: *The Macrophage*. Oxford, New York, Tokyo, Oxford University Press, 157–213.  
KEFFABER, K. K. (1989): Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newslett.*, **1**, 1–9.  
MEULENBERG, J. J. M. – HULST, M. M. – de MEIJER, E. J. – MOONEN, P. L. J. M. – den BESTEN, A. – de KLUYVER, E. P. – WENSVOORT, G. – MOORMANN, R. J. M. (1993): Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, **192**, 62–72.

MURTAUGH, M. P. (1994): Porcine cytokines. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **43**, 37–44.  
PABST, R. (1996): The respiratory immune system of pigs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **54**, 191–196.  
SANDER, B. – ANDERSSON, J. – ANDERSSON, U. (1991): Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol. Rev.*, **119**, 65–93.  
SHIMIZU, M. – YAMADA, S. – KAWASHIMA, K. – OHASHI, S. – SHIMIZU, S. – OGAWA, T. (1996): Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **50**, 19–27.  
ŠMÍD, B. – VALÍČEK, L. – MENŠÍK, J. (1977): Obtaining pig pulmonary macrophages for the cultivation of pig cytomegalovirus (in Czech). *Veter. Med. (Praha)*, **21**, 589–595.  
TERPSTRA, C. – WENSVOORT, G. – POL, J. M. A. (1991): Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Kochs postulate fulfilled. *Vet. Quart.*, **13**, 131–136.  
TREBICHAVSKÝ, I. – ŠPLÍČAL, I. – BAROT-CIORBARU, T. (1995): Expression of TNF-alpha in pig fetal cells stimulated *in vitro*. *Fol. Microbiol.*, **40**, 417–420.  
VALÍČEK, L. – ŠMÍD, B. – MENŠÍK, J. (1977): Isolation and experimental infection with porcine cytomegalovirus. *Zentbl. Vet. Med. B.*, **24**, 340–343.  
VALÍČEK, L. – PŠÍKAL, I. – ŠMÍD, B. – RODÁK, L. – KUBALÍKOVÁ, R. (1995): First detection PRRS in the Czech Republic. In: *Abstracts of the 2nd Int. Symp. on PRRS*. Copenhagen, Denmark, p. 46.  
VOICU, I. L. – SILIM, A. – MORIN, M. – ELAZHARY, M. A. S. Y. (1994): Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet. Rec.*, **134**, 422–423.  
WENSVOORT, G. – TERPSTRA, C. – POL, J. M. A. – Ter LAAK, E. A. – BLOEMRAAD, M. – de KLUYVER, E. P. – KRAGTEN, C. – van BUITEN, L. – den BESTEN, A. – WAGENAAR, F. – BROEKHUIJSEN, J. M. – MOONEN, P. L. J. M. – ZETSTRA, T. – de BOER, E. A. – TIBBEN, H. H. – deJONG, M. F. – vant VELD, P. – GROENLAND, G. J. R. – van GENNEP, J. A. – VOETS, M. Th. – VERHEIJDEN, J. H. M. –BRAAMSKAMP, J. (1991): Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Quart.*, **13**, 121–130.

Received: 97-07-01

Accepted: 97-09-03

---

#### Contact Address:

RNDr. Ilija Trebichavský, CSc. Mikrobiologický ústav AV ČR, 549 22 Nový Hrádek, Česká republika  
Tel. 0443/ 957 22, fax 0443/ 957 79, e-mail: immuno@mbu.anet.cz

---

# OEDEMA DISEASE OF SWINE: FORMATION OF ANTIBODIES NEUTRALIZING SHIGA-LIKE TOXIN II<sub>v</sub> IN PIGLETS IMMUNIZED WITH THE TOXOID SLTII

## EDÉMOVÁ NEMOC PRASAT: PROTILÁTKY NEUTRALIZUJÍCÍ SHIGA-LIKE TOXIN II<sub>v</sub> PO IMUNIZACI TOXOIDEM SLTII

P. Alexa<sup>1</sup>, E. Salajka<sup>1</sup>, J. Hamřík<sup>1</sup>, M. Žižlavský<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, Czech Republic

**ABSTRACT:** Induction of antibodies neutralizing the Shiga-like toxin II<sub>v</sub> (SLTII<sub>v</sub>) in piglets was attempted by immunization of suckling piglets intramuscularly with the SLTII toxoid completed with a lipid adjuvant or aluminium hydroxide adjuvant. The piglets coming from dams with detectable antibodies neutralizing SLTII and SLTII<sub>v</sub> produced antibodies to SLTII, but only a part of them produced antibodies to SLTII<sub>v</sub>. The piglets coming from dams free of the neutralizing antibodies did not produce any neutralizing antibodies following the immunization with the toxoid completed with the aluminium hydroxide adjuvant. The production of antibodies neutralizing SLTII<sub>v</sub> was demonstrable in 10 of the 54 immunized piglets. It is concluded that the immunization of piglets with SLTII did not induce sufficient production of antibodies neutralizing SLTII<sub>v</sub>.

*Escherichia coli*; verotoxin; SLTII; SLTII<sub>v</sub>; immunity; piglets

**ABSTRAKT:** Pokusy byly zaměřeny na ověření možnosti navodit u selat tvorbu protilátek neutralizujících Shiga-like toxin II<sub>v</sub> (SLTII<sub>v</sub>). Sající selata byla intramuskulárně imunizována toxoidem SLTII s lipidním adjuvans nebo Al(OH)<sub>3</sub>. Selata pocházející od matek, které měly detekovatelné množství neutralizačních protilátek v séru, tvořila neutralizační protilátky proti SLTII, ale jen část těchto selat tvořila protilátky proti SLTII<sub>v</sub>. Selata od matek bez neutralizačních protilátek imunizovaná preparátem s Al(OH)<sub>3</sub> netvořila žádné neutralizační protilátky. Selata imunizovaná preparátem s lipidním adjuvans tvořila protilátky proti SLTII, ale protilátky proti SLTII<sub>v</sub> tvořila selata od matek s protilátkami a jen ojedinělá selata od matek bez protilátek. Celkově tvořilo protilátky proti SLTII<sub>v</sub> 10 z 54 imunizovaných selat. Z pokusů vyplývá, že imunizace selat toxoidem SLTII nestačila k navození dostatečné tvorby protilátek neutralizujících SLTII<sub>v</sub>.

*Escherichia coli*; verotoxin; SLTII; SLTII<sub>v</sub>; imunita; selata

### INTRODUCTION

Oedema disease of weaned piglets is associated with the growth of certain serogroups of *Escherichia coli* in the intestine. The strains of these serogroups produce a toxin earlier designated as oedema disease principle (EDP) – Clugston and Nielsen (1974). Like the toxins of some human strains of *E. coli*, the toxins of the strains isolated from swine affected by oedema disease show a characteristic cytotoxic effects in Vero cells (Konowalchuk et al., 1977) and are therefore designated as verotoxins (VT). Owing to its similarity with the toxin of *Shigella dysenteriae*, this group of toxins is also designated as Shiga-like toxins (SLT) – O'Brien and LaVeck (1983). Several SLT types differing in their reactions in neutralization test and in heat inactivation have been identified. SLTI and SLTII differ from each other in their

genomic and antigenic structures (Strockbine et al., 1986).

Of the strains associated with oedema disease of swine, the production of SLT is most frequently found in the serogroups O138, O139, and O141. The toxicity of EDP for Vero cells correlates well with the potency of SLT to induce neurological disorders and death in mice (Dobrescu, 1983). SLT of strains associated with oedema disease is identical with EDP, shows antigenic relationship to SLTII and has been designated Shiga-like toxin II variant (SLTII<sub>v</sub>) – Marques et al. (1987). SLTII<sub>v</sub>, the causative agent of oedema disease of weaned pigs, is neutralized by antibodies to SLTII (Marques et al., 1987) and shows a 90% homology in nucleotide and amino acid sequences with SLTII (Gyles et al., 1988). The two toxins differ from each other in the rate of heat inactivation (Gannon and Gyles, 1990).

SLTIIv induces in piglets characteristic lesions including fibrinoid necrosis of arterioles, brain haemorrhages and, at higher doses, surface necrosis of the colon epithelium and damage to kidneys (Gannon et al., 1989). Absence of antibodies neutralizing SLT is considered the decisive factor in the pathogenesis of oedema disease (Gannon et al., 1988).

Shiga-like toxins are strongly immunogenic. The reported weak immunogenicity of SLTIIv is apparently due to the fact that crude preparations contain only small amounts of this toxin (Smith et al., 1983), as confirmed also by unpublished results of our investigations (Tab. I).

Šarišské Michaľany, Slovak Republic). The cultures were incubated in a shaking machine at 37 °C for 18 hours. The grown cultures were treated with polymyxin (100 µg/ml) for 1 h and then centrifuged at 8000 g for 15 min. The supernatant was supplemented with penicillin (1000 U/ml) and neomycin (1000 µg/ml). Microtitre plates with 96 flat-bottomed wells (NUNC Camstrup, Denmark) were used for the titration of verotoxins. Serial dilutions starting from 1 : 5 were prepared of the antibiotic-treated supernatants in test tubes using MEM supplemented with antibiotics. Volumes 30 µl of each dilution were transferred into microtitre wells and completed with a suspension of Vero cells (90 µl, density

I. SLT titres in field strains of *E. coli*

	Serogroup	Titre								
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120
No. of strains	O139	1		3	13	2	3		1	2
	O141				1	9	1		2	

The aim of the experiments presented in this paper was to test the possibility of inducing in piglets sufficient production of antibodies neutralizing SLTIIv by immunization with SLTII.

## MATERIAL AND METHODS

### Bacterial strains

Strains of *Escherichia coli*, designated in our laboratory's collection as 5120 and 6006, were used in the experiments. The strain 5120 (E32511) O157 : H-, producing SLTII in high titres, was obtained from the Central Health Laboratory, London. The strain 6006 - O139 is an SLT-producing isolate from a piglet affected by oedema disease. The toxin of this strain was classified as SLTIIv on the basis of heat inactivation and neutralization tests.

### Cell cultures

Verotoxins and neutralizing antibodies were demonstrated in Vero cells (clone Moredun provided by the Collection of Animal Pathogenic Microorganisms at the Veterinary Research Institute, Brno). The cells were grown in Eagle's minimal essential medium (MEM) supplemented with 5% bovine foetal serum and the antibiotics gentamycin (50 µg/ml) and tylosin (50 µg/ml).

### Verotoxins

Crude verotoxin was prepared from cultures of the above strains grown in nutrient broth (Immuna,

3 x 10<sup>5</sup> per 1 ml). The results were read after 72 h of incubation at 37 °C and 5% carbon dioxide using an inversion microscope. The toxin titre was defined as the highest dilution inducing a 50% degeneration of the cells. This value is also equivalent to 50% cytotoxic dose (CD<sub>50</sub>).

### Titration of verotoxin neutralizing antibodies

Blood sera were inactivated by heating to 56 °C for 30 min and dilution series starting from 1 : 2 were prepared in test tubes using antibiotic-supplemented MEM. Then an equal volume of verotoxin at a concentration 10 CD<sub>50</sub> in MEM was added and the mixture was left to stand at 4 °C overnight. On the subsequent day, 60 µl of each dilution were pipetted into microplate wells and completed with 90 µl of a Vero cell suspension with a density of 3 x 10<sup>5</sup> per 1 ml. The results were read microscopically after 72 h of incubation at 37 °C and 5% carbon dioxide. The titre of neutralizing antibodies was defined as the highest dilution inhibiting the degeneration of Vero cells by 50%.

### Immunization of piglets

SLTII prepared from the strain 5120 with a titre of 650 000 inactivated with 0.3% glutaraldehyde was used as the vaccine for immunization of 16- to 21-day-old suckling piglets coming from a herd affected by oedema disease. The inactivated supernatant was mixed and homogenized with an equal volume of a lipoid adjuvant on the basis of Freund's incomplete adjuvant, or of aluminium hydroxide gel before the inoculation. All the piglets were vaccinated intramuscularly with a dose of 2 ml.

### Experiment I

The piglets were divided into 2 experimental groups of 12 and one control (non-treated) group of 7 animals. Group I and group II were immunized with the vaccine completed with the lipoid adjuvant and aluminium hydroxide, respectively, and the treatment was repeated 14 days later.

### Experiment II

A group of 24 piglets was vaccinated with the vaccine completed with the lipoid adjuvant 14 days before weaning (approx. age 14 days). The group was divided into two equal subgroups and the treatment was repeated after 7 and 14 days, respectively.

### Experiment III

A group of 6 piglets was vaccinated with the vaccine completed with the lipoid adjuvant 14 days before weaning (approx. age 14 days) and the treatment was repeated after 14 days. Another 6 piglets served as non-vaccinated controls.

Blood samples were collected from the experimental and control piglets before the vaccination and the sampling was repeated 5 times at weekly intervals thereafter. A single blood sample was collected from their dams before the experiment. The blood sera were inactivated at 56 °C for 30 min and tested for the content of antibodies neutralizing SLTIIv and SLTII.

## RESULTS

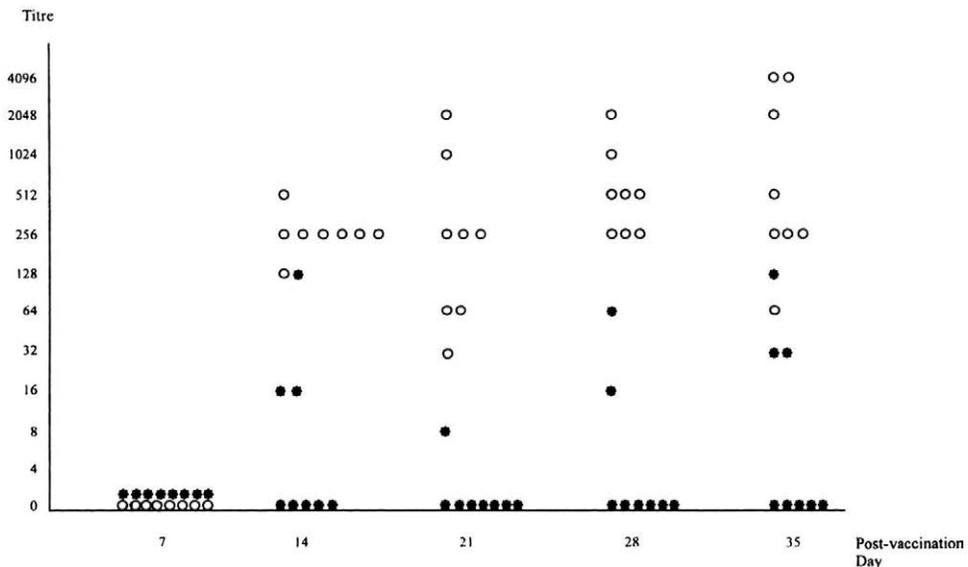
### Experiment I

Nine of the experimental piglets came from dams positive for antibodies neutralizing Shiga-like toxins. No such antibodies were demonstrated in blood sera of the dams of the remaining 14 piglets. One piglet died during the experiment. The piglet died on the weekend, in the farm, just 4 days after vaccination. Therefore necropsy could not be performed to determine the precise cause of death.

Antibody responses in piglets coming from the dams free of antibodies and vaccinated with SLTII completed with the lipoid adjuvant are shown in Fig. 1. A rise of antibodies neutralizing SLTII was observed on post-vaccination day 14. No antibodies to SLTIIv were demonstrable throughout the observation period in 5 piglets. Variable increases of antibodies to SLTIIv were apparent in 3 piglets on post-vaccination day 14.

No antibodies to any SLT were demonstrable in any of the piglets coming from antibody-free dams and vaccinated with SLTII completed with aluminium hydroxide.

The piglets coming from the serologically positive dams showed a marked increase in titres of antibodies to SLTII on post-vaccination day 14. An increase of antibodies to SLTIIv could be observed only from post-vaccination day 21 and no antibodies to SLTIIv were demonstrable in 4 piglets throughout the observation period. A rise of antibodies to SLTIIv was demonstrated in the piglets vaccinated with SLTII completed with the



1. Antibody responses in piglets coming from dams negative for antibodies to SLT and immunized with SLTII completed with the lipoid adjuvant; ● antibodies to SLTIIv, ○ antibodies to SLTII



lipoid adjuvant (Fig. 2). A moderate increase of antibodies to SLTIIv was observed in the piglets vaccinated with SLTII completed with aluminium hydroxide on post-vaccination day 21 (Fig. 3). No antibodies to SLTIIv were demonstrable in 2 piglets throughout the observation period.

No antibodies to any SLT were detectable in any of the control piglets.

### Experiment II

Two piglets coming from a dam positive for neutralizing antibodies were in each of the two groups. The remaining piglets came of dams free of antibodies neutralizing SLT. No antibodies to SLT were detectable in any of the piglets throughout the observation period.

### Experiment III

Transient rises of titres of antibodies to SLTII (128 and 32, respectively) were observed in two piglets on post-vaccination day 14. The titres dropped below the detection limit by post-vaccination day 21, however. One of them was positive for antibodies to SLTIIv (titre 32) on post-vaccination day 14, but the antibodies vanished by post-vaccination day 21. No antibodies to SLT were demonstrable in any of the remaining piglets.

### DISCUSSION

Several attempts to immunize piglets against oedema disease were carried out in the past. A wad-Masalmeh and Willinger (1987) succeeded in reducing the death rate by vaccination of piglets before weaning with supernatants of cultures of SLT-producing strains isolated in the respective herd.

Good immune responses were reported by MacLeod and Gyles (1991), who immunized piglets with the toxoid of purified SLTIIv. However, the purification step is laborious and expensive and therefore a wide use of such vaccines is not feasible.

The production of neutralizing antibodies was rather variable in our experiments. Relatively high titres of antibodies to SLTII were obtained in Experiment I, but the presence of neutralizing antibodies was demonstrated only sporadically in the subsequent experiments. In serologically positive piglets, the titres of antibodies to SLTIIv were lower than of those to SLTII. A similar result was reported by Gannon and Gyles (1990) who used a different (long-term) immunization scheme and a smaller number of piglets.

No antibodies neutralizing SLTIIv or SLTII were detectable in a considerable number of the piglets. In addition to the adjuvant, immune responses are apparently influenced by a number of other factors. Considerably stronger immune responses were observed in the piglets coming from dams with detectable levels of antibodies to SLT in their blood sera.

Genetic resistance to oedema disease (Smith and Halls, 1968) consisting in the resistance to the colonization of the small intestine (Bertschinger et al., 1993) is presumed. The resistance of piglets to oedema disease may be associated with the level of natural antibodies in dams' blood sera.

### Acknowledgements

We thank to Dr. S. M. Scotland from the Central Public Health Laboratory, London for sending the strain *E. coli* E32511 - 0157:H.

### REFERENCES

- AWAD-MASALMEH, M. - WILLINGER, H. (1987): Untersuchungen zur Prophylaxe der Ödemkrankheit des Absetzferkels. Wien. Tierärztl. Mschr., 74, 422-426.
- BERTSCHINGER, H.U. - STAMM, M. - VÖGELI, P. (1993): Inheritance of resistance to oedema disease in the pig: experiments with an *Escherichia coli* strain expressing fimbriae 107. Vet. Microbiol., 35, 79-89.
- CLUGSTON, R. E. - NIELSEN, N. O. (1974): Experimental edema disease of swine (*E. coli* enterotoxemia). I. Detection and preparation of an active principle. Can. J. Comp. Med., 38, 22-28.
- DOBRESCU, L. (1983): New biological effect of oedema disease principle (*Escherichia coli*-neurotoxin) and its use at an *in vitro* assay for this toxin. Am. J. Vet. Res., 44, 31-34.
- GANNON, V. P. J. - GYLES, C. L. (1990): Characteristics of the Shiga-like toxin produced by *Escherichia coli* associated with porcine edema disease. Vet. Microbiol., 24, 89-100.
- GANNON, V. P. J. - GYLES, C. L. - FRIENDSHIP, R. W. (1988): Characteristics of verotoxigenic *Escherichia coli* from pigs. Can. J. Vet. Res., 52, 331-337.
- GANNON, V. P. J. - GYLES, C. L. - WILCOCK, B. P. (1989): Effects of *Escherichia coli* Shiga-like toxins (verotoxins) in pigs. Can. J. Vet. Res., 53, 306-312.
- GYLES, C. L. - De GRANDIS, S. A. - MACKENZIE, C. - BRUNTON, J. L. (1988): Cloning and nucleotide sequence analysis of the genes determining verocytotoxin production in a porcine edema disease isolate of *Escherichia coli*. Microb. Pathogenesis, 5, 419-426.
- KONOWALCHUK, J. - SPEIRS, J. I. - STAVRIC, S. (1977): Vero response to a cytotoxin *Escherichia coli*. Infect. Immun., 18, 775-779.
- MACLEOD, D. L. - GYLES, C. L. (1991): Immunization of pigs with a purified Shiga-like toxin II variant toxoid. Vet. Microbiol., 29, 309-318.
- MARQUES, L. R. M. - PEIRIS, J. S. M. - CRYZ, S. J. - O'BRIEN, A. D. (1987): *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. FEMS Microbiol. Lett., 44, 33-38.
- O'BRIEN, A. D. - LAVECK, G. D. (1983): Purification and characterization of a *Shigella dysenteriae* 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. Infect. Immun., 40, 675-683.
- SMITH, H. W. - GREEN, P. - PARSELL, Z. (1983): Vero cell toxins in *Escherichia coli* and related bacteria: Transfer

by phage and conjugation and toxic action in laboratory animals, chickens and pigs. *J. Gen. Microbiol.*, 129, 3121–3137.  
SMITH, H. W. – HALLS, S. (1968): The production of oedema disease and diarrhoea in weaned pigs by the oral administration of *Escherichia coli*: factors that influence the course of the experimental disease. *J. Med. Microbiol.*, 1, 45–59.

STROCKBINE, N. A. – MARQUES, L. R. M. – NEWLAND, J. W. – SMITH, H. W. – HOLMES, R. K. – O'BRIEN, A. D. (1986): Two toxin-converting phages from *Escherichia coli* O157:H7 strain 933 encode antigenically distinct toxins with similar biologic activities. *Infect. Immun.*, 53, 135–140.

Received: 97–08–20

Accepted after correction: 97–10–30

---

Contact Address:

MVDr. Pavel A l e x a, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70. 621 32 Brno, Česká republika  
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29, e-mail: olma@vuvel.anet.cz

---

## INFORMATION

## INFORMACE

### CIVIL CORPORATION BIOTREND

### OBČANSKÉ SDRUŽENÍ BIOTREND

Vědečtí pracovníci některých univerzitních pracovišť a ústavů Akademie věd České republiky založili Občanské sdružení BIOTREND se sídlem v Praze (Viničná 5, 128 44 Praha 2) s cílem poskytovat odborné i laické veřejnosti a orgánům státní správy informace o biotechnologiích a přispět k přípravě zákonů a předpisů, upravujících výzkum a použití geneticky modifikovaných organismů. Bílá kniha BIOTREND, vydaná v září 1997, přináší články J. Drobníka, Z. Storchové, M. Ondřeje a S. Rakouského (Co jsou genetické modifikace), M. Ondřeje (Transgenní rostliny: obavy nebo perspektiva?), K. Kopce (Jakost transgenového ovoce a zeleniny), J. R. Beringera (Obchodování s geneticky modifikovanými organismy). Dále obsahuje seznam vědeckých institucí a pracovišť v České republice zabývajících se geneticky modifikovanými mikroorganismy, rostlinami a živočichy, přehled dosud geneticky modifikovaných odrůd v USA, Kanadě, Japonsku, Evropské unii, Velké Británii a Holandsku, některé články z českého tisku a výkladový slovník některých pojmů, často používaných v biotechnologii.

Prof. MVDr. Karel H r u š k a, CSc.

# OCCURRENCE OF CARCINOGENIC POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAH) ON PIG AND CATTLE FARMS\*

## VÝSKYT KARCINOGENNÍCH POLYCYKlickÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ (PAH) NA FARMÁCH PRASAT A SKOTU

J. Raszyk<sup>1</sup>, R. Ulrich<sup>1</sup>, V. Gajdůšková<sup>1</sup>, J. Salava<sup>2</sup>, J. Palác<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

<sup>2</sup>*District Veterinary Administration, Hodonín, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (U.S. EPA priority pollutant PAHs) were studied in feedstuffs ( $n = 12$ ), drinking water ( $n = 21$ ), stable dust ( $n = 17$ ), porcine liquid manure ( $n = 16$ ), road dust ( $n = 14$ ) and soil ( $n = 11$ ) on three pig farms (D., M., T.) and two cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 and 1996. Seven out of the studied PAHs are considered as animal carcinogens (International Agency for Research on Cancer, 1983), namely benzo(a)anthracene (BaA), chrysene (Chry), benzo(b)fluoranthene (BbF), benzo(k)fluoranthene (BkF), benzo(a)pyrene (BaP), dibenzo(a,h)anthracene (DBaA) and indeno(1,2,3-cd)pyrene (IcdP). The average sum of 16 PAHs for feedstuffs was 207.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , the average sum of seven carcinogenic PAHs made 7.4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and average BaP concentration was lower than 0.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Sixteen PAH average sum for drinking water amounted to 51.6 ng/l, average sum of seven carcinogenic PAHs made 8.4 ng/l and average BaP concentration was 1.1 ng/l. The respective values for stable dust were 2 147.9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 178.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 5.6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The average sum of 16 PAHs for porcine liquid manure was 543.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of dry matter, average sum of seven carcinogenic PAHs amounted to 47.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of dry matter and average BaP concentration made 2.3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of dry matter. Sixteen PAH average sum for road dust amounted to 13 142.7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , average sum of seven carcinogenic PAH was 4 597.2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and average BaP concentration made 384.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . The respective values for soil were 3 542.8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 1 767.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 187.1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Chrysene, benzo(a)anthracene and benzo(b)fluoranthene are dominant PAH carcinogens in the stable environment and in the environment on pig and cattle farms. Among the other PAHs, phenanthrene, fluoranthene and pyrene are dominant. A permanent goal of veterinary service is to seek additional sources and to reduce the penetration of carcinogenic PAHs into livestock herds. Data on carcinogenic PAH concentrations in the stable environment on pig and cattle farms collected within a pilot study can also be used by medical service (preventive and occupational medicine).

pig and cattle farms; polycyclic aromatic hydrocarbons; carcinogens; feedstuffs; drinking water; stable dust; porcine liquid manure; road dust; soil; health hazard

**ABSTRAKT:** V průběhu let 1995 a 1996 byl v okrese Hodonín ve třech chovech prasat (D., M., T.) a dvou chovech skotu (Na., Ne.) sledován obsah 16 polycyklických aromatických uhlovodíků (U.S. EPA „priority pollutant PAHs“) v krmivu ( $n = 12$ ), napájecí vodě ( $n = 21$ ), stájovém prachu ( $n = 17$ ), prasečí kejdě ( $n = 16$ ), vozovkovém prachu ( $n = 14$ ) a půdě ( $n = 11$ ). Sedm ze sledovaných PAH je považováno za živočišné karcinogeny (International Agency for Research on Cancer, 1983) a to benzo(a)antracen (BaA), chrysen (Chry), benzo(b)fluoranten (BbF), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(a)pyren (BaP), dibenzo(a,h)antracen (DBaA) a indeno(1,2,3-cd)pyren (IcdP). V krmivu byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 207,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 7,4  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a průměrná hladina BaP byla nižší než 0,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . V napájecí vodě byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 51,6 ng/l, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 8,4 ng/l a průměrná hladina BaP byla 1,1 ng/l. Ve stájovém prachu byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 2 147,9  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 178,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a průměrná hladina BaP byla 5,6  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . V prasečí kejdě byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 543,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sušiny, průměrná suma sedm karcinogenních PAH činila 47,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sušiny a průměrná hladina BaP byla 2,3  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sušiny. Ve vozovkovém prachu byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 13 142,7  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 4 597,2  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a průměrná hladina BaP byla 384,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . V půdě byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 3 542,8  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 1 767,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$  a průměrná hladina BaP byla 187,1  $\mu\text{g}/\text{kg}$ . Ve stájovém a mimostájovém prostředí farem prasat a skotu z karcinogenních PAH převládají chrysen, benzo(a)antracen a benzo(b)fluoranten. Z ostatních sledovaných PAH dominují fenantren, fluoranten a pyren. Trvalým úkolem veterinární služby zůstává dohledávání zdrojů a omezování pronikání karcinogenních PAH do chovů hospodářských zvířat. Poznatky o obsahu karcinogenních PAH ve stájovém prostředí farem prasat a skotu, získané v rámci pilotní studie, jsou využitelné i lékařskou službou (preventivní a pracovní lékařství).

farmy prasat a skotu; polycyklické aromatické uhlovodíky; karcinogeny; krmivo; napájecí voda; stájový prach; prasečí kejda; vozovkový prach; půda; zdravotní riziko

\* Support by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Projects RE 093 095 0048 and 342-09), the Ministry of Environment of the Czech Republic (Project GA/1650/93) and the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 525/96/0924).

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) patří mezi prioritní polutaný životního prostředí. Vznikají během spalování, pyrolýzy a pyrosyntézy organické hmoty. Některé z nich mají mutagenní (Marvin aj., 1995; Gabbani aj., 1996), karcinogenní (Ralston aj., 1995; Cui aj., 1995; Mass aj., 1996) a imunosupresivní účinky (Silkworth aj., 1995; Davila aj., 1996).

Jedním z nejzávažnějších negativních účinků některých PAH jsou jejich karcinogenní účinky. Mechanismus karcinogeneze lze doložit na příkladu benzo(a)pyrenu (BaP). Při biotransformaci BaP (ve které hraje důležitou roli cytochrom P 450 1A1 a enzym aryl hydrokarbon hydroxyláza) vzniká elektrofilní metabolit 7,8-dihydrodiol 9,10 epoxid (Surh aj., 1996), který je schopen vazby na DNA, přičemž vznikají DNA addukty, které charakterizují biologicky účinnou dávku genotoxických látek. Pokud DNA addukty nejsou eliminovány v procesu reparace ještě před replikací buňky představují první krok v indukci genových mutací a eventuální iniciace karcinogeneze (Šrám, 1995; Šrám aj., 1996).

V České republice byly v poslední době zveřejněny shrnující poznatky o výskytu PAH v hydrosféře (Kučílek, 1994), atmosféře (Holoubek, 1995a, b), půdě (Strnad aj., 1994) a vybraných potravinách, především rostlinného původu (Drápal a Valcl, 1996). Dále byly specifikovány negativní účinky PAH na zdraví lidí (Hrubá, 1993) a vyhodnoceny biomarkery expozice PAH u lidí (Binková aj., 1996).

O výskytu PAH na farmách hospodářských zvířat máme doposud velmi málo informací. Při sledování mutagenní aktivity stájového prostředí (Raszyk aj., 1995, 1996) jsme v létě roku 1994 orientačně vyšetřili čtyři vzorky stájového prachu na obsah sumy osmi PAH (fenantren, antracen, fluoranten, pyren, dibenzo(a,h)antracen, chrysen, benzo(a)pyren a dibenzo(a,h)antracen. Zjištěné hodnoty sumy osmi PAH se pohybovaly v rozsahu od 100 do 8 200 µg/kg.

V odborné literatuře se nám doposud podařilo zachytit jednu práci, hodnotící sumu 16 PAH v některých složkách zemědělského prostředí ve Švýcarsku (Berse a Holzer, 1995). Obsah sumy 16 PAH v prasečí kejdě byl v rozsahu 66 až 339 µg/kg a v půdě v rozpětí 60 až 575 µg/kg.

Při posuzování obsahu PAH v jednotlivých složkách životního prostředí se obvykle postupuje tak, že je sledováno 16 individuálních PAH (U.S. EPA „priority pollutant PAHs“), mezi které patří naftalen (Na), acenafylen (Acy), acenaften (Ace), fluoren (Fl), fenantren (Fen), antracen (An), fluoranten (Fa), pyren (Pyr), benzo(a)antracen (BaA), chrysen (Chry), benzo(b)fluoranten (BbF), benzo(k)fluoranten (BkF), benzo(a)pyren (BaP), dibenzo(a,h)antracen (DBaH), benzo(g,h,i)perylen (BghiP) a indeno(1,2,3-cd)pyren (IcdP). Mezi životnější karcinogeny je dle IARC, 1983 (International Agency for Research on Cancer, Lyon, France) zařazováno

váno sedm individuálních PAH, a to BaA, Chry, BbF, BkF, DBaH a IcdP.

Při posuzování obsahu 16 PAH v jednotlivých složkách životního prostředí je vhodné hodnotit: (1) celkovou sumu 16 PAH; (2) celkovou sumu sedmi karcinogenních PAH; (3) procentuální zastoupení karcinogenních PAH z celkové sumy PAH; (4) hladinu benzo(a)pyrenu. Tento postup umožňuje srovnání dosažených výsledků s obdobnými projekty realizovanými v České republice či v zahraničí (Watts aj., 1994).

Cílem předkládané pilotní studie bylo zhodnocení výskytu karcinogenních PAH ve složkách stájového prostředí (krmivo, napájecí voda, stájový prach, prasečí kejda) i mimostájového prostředí (vozovkový prach, půda) tří chovů prasat a dvou chovů skotu v okrese Hodonín v letech 1995 a 1996.

## MATERIÁL A METODY

Výskyt 16 PAH (U.S. EPA „priority pollutant PAHs“) byl sledován ve stájovém a mimostájovém prostředí tří chovů prasat (D., M., T.) a dvou chovů skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v průběhu let 1995 a 1996.

### Stručná charakteristika sledovaných chovů

V chovu prasat D. je chováno 17 000 výkrmových prasat. Výkrmové haly mají hliníkový plášť a jsou vybaveny okny. Ventilace je regulována čidlem dle aktuální teploty v hale. Ke krmení jsou používány sypké krmné směsi (A1, A2, CDP), pouze ve dvou halách z 15 je tekuté krmení systém Schauer. Voda k napájení pochází z veřejného zdroje, používají se prstové napáječky. Kejda z celého chovu se odvádí do separační stanice. Jako palivo se používá lignit a hnědé uhlí.

V chovu prasat M. je chováno 10 000 výkrmových prasat. Výkrmové haly mají hliníkový plášť a jsou vybaveny okny. Ventilace je regulována čidlem dle aktuální teploty v hale. Používá se tekuté krmení systém Schauer (krmné směsi A1, A2, CDP). Voda k přípravě tekutého krmení pochází z vlastního zdroje. Kejda z celého chovu se odvádí do separační stanice. Jako palivo se používá zemní plyn.

V chovu prasat T. je chováno 1 650 výkrmových prasat. Výkrmové haly jsou zděné a jsou vybaveny okny. Větrání hal je podtlakové. Používá se tekuté krmení (krmné směsi A1, A2, CDP), prasata však mají k dispozici i prstové napáječky. Voda k napájení prasat pochází z veřejného zdroje. Kejda z celého chovu se shromažďuje ve dvou sběrných jímkách. Jako palivo se používá hnědé uhlí.

V chovu skotu Na. je chováno 338 krav. Stáje mají plechový plášť, volné ustájení, pouze v porodnách je vazné. Větrání je přetlakové. Krmnou dávku tvoří kukuřičná siláž, zelená vojtěška (v zimě vojtěškové seno), ječná sláma (v zimě řepné skrojky) a krmná směs pro dojnice. Chlévská mrvna se shromažďuje ve čtyřech

sběrných jímkách. Jako palivo se v chovu skotu Na. používá černé uhlí.

V chovu skotu Ne. je chováno 265 krav. Stáje jsou sestaveny z montovaných prefabrikátů. Větrání je podtlakové. Krmnou dávku tvoří kukuřičná siláž, zelená vojtěška (v zimě vojtěškové seno), pšeničné otruby, ovesné slupky a krmná směs pro dojnice. Voda k napájení krav pochází z veřejného zdroje, používají se miskovitě napáječky. Chlévská mrvna ve shromažďuje v jedné sběrné jímnice. K vytápění farmy se používá elektrická energie.

#### Odběry vzorků

Vzorky krmiv ( $n = 12$ ) byly odebírány přímo z koryt či krmných žlabů. V případě tekutého krmení byly vzorky suchých krmných směsí odebírány v přípravně tekutého krmiva. Byly vyšetřeny čtyři vzorky objemných krmiv pro skot a osm vzorků krmných směsí (dva vzorky krmných směsí pro skot a šest vzorků krmných směsí pro prasata).

Vzorky napájecí vody ( $n = 21$ ) byly odebírány z napáječek přímo ve stájích, ev. v přípravně tekutého krmiva.

Vzorky stájového sedimentovaného prachu ( $n = 17$ ) byly odebírány elektrickým vysavačem z vnitřního zařízení stáji. Získaný stájový prach jsme přesívali přes sito o velikosti oka 0,7 mm. K analýze byly používány částice prachu menší než 0,7 mm.

Vzorky tekuté neseptované kejdy ( $n = 16$ ) byly odebírány v chovech prasat v kejdivých hospodářstvích. Kejda byla před odběrem homogenizována.

Vzorky prachu usazeného na vozovkách ( $n = 14$ ) byly odebírány v areálech sledovaných chovů prasat a skotu. Vozovkový prach byl zpracován stejným způsobem jako stájový prach.

Vzorky půdy ( $n = 11$ ) byly odebírány uvnitř areálu jednotlivých sledovaných chovů prasat a skotu, a to ve vzdálenosti 10 až 15 m od stáji z hloubky 15 cm pod povrchem.

#### Stanovení PAH v indikátorech z prostředí

##### Použitelnost metody

Metoda je vhodná pro kvalitativní a kvantitativní stanovení 16 PAH (U.S. EPA „priority pollutant PAHs“) v krmivu, napájecí vodě, sedimentovaném prachu, prasečí kejdě, různých typech půd a kalech.

##### Princip metody

PAH se extrahují z upravených vzorků dichlormethanem, koextrakty se separují gelovou permeační chromatografií a rezidua PAH se stanovují technikou GC-MS. Z napájecí vody se PAH extrahují do malého objemu cyklohexanu a přímo stanoví GC-MS.

#### Přístroje a chemikálie

Plynový chromatograf Varian model 3400 (Varian, USA) s injektorem split/splitless/on-column dle Laubera, spojený s hmotnostním spektrometrem model Tracker (ion-trap system) (Finnigan MAT, USA) a datastaničí se software Magnum System verze 2.4 (Finnigan, U.S.A.).

Kapilární kolona DB-5, 60 m x 0,25 mm, film 0,25  $\mu$ m. Zařízení pro extrakci vzorků organickými rozpouštědly Soxtec system HT 1043 (Tecator, Švédsko).

Rotační vakuová odparka (RVO).

Laboratorní třepačka typ 3006 (GFL, Německo).

Čerpadlo LPC 4000 (ECOM, ČR).

Preparativní kolona 500 x 8 mm, Bio-Beads S-X3, 200–400 mesh (Labio, ČR).

Standardní roztok PAH-MIX 9 (směs 16 PAH v cyklohexanu, koncentrace 10  $\mu$ g/ml) – Dr. Ehrenstorfer, Německo.

Rozpouštědla: cyklohexan, dichlormethan (čistoty p.a.) před analýzou redestilovaná ve skleněné aparatuře.

Aktivní prášková měď (Lachema, ČR).

#### Úprava vzorků před analýzou

Vzorky sedimentovaného prachu (stájový a vozovkový prach) se přesíjí přes sito o velikosti oka 0,7 mm a k analýze se použije frakce částic pod 0,7 mm. Vzorky krmiv, prasečí kejdy, půdy a kalů se před analýzou suší při teplotě 50 °C v sušárně.

#### Pracovní postup

##### A. Napájecí voda

Vzorek vody (2 000 ml) se po dokonalém promíchání převede do baňky pro provádění mikroextrakce. PAH se extrahují 2 ml cyklohexanu intenzivním třepáním asi 5 min v uzavřené baňce. Pak je k baňce připojen nástavec pro mikroextrakci dle Hrivniaka a organická fáze je vytěsněna destilovanou vodou do zúženého prostoru nástavce. Objem organické fáze je upraven nebo přímo injikován alikvot pro GC-MS stanovení.

##### B. Krmivo, sedimentovaný prach, prasečí kejda, půda, kaly

Množství 2 až 5 g vysušeného vzorku se extrahuje dichlormethanem na zařízení Soxtec tři hodiny. Extrakt se zahustí a injikuje přes dávkovací smyčku na kolonu plněnou gelem. Eluát je při průtoku mobilní fáze (cyklohexan : dichlormethan, 1 : 1) 0,7 ml/min rozdělen na dvě frakce (0 až 28 min a 28 až 60 min), přičemž druhá frakce obsahující PAH je jímána. Eluát se zahustí na RVO a pomocí proudu dusíku se odpaří do sucha. Odparek se rozpustí v 0,2 až 1 ml cyklohexanu pro GC-MS analýzu. Pokud vzorek obsahuje elementární síru, která ruší stanovení PAH na kapilární koloně při GC-

-MS analýze, redukuje se rušivý vliv síry přidáním malého množství aktivní mědi k odparku rozpuštěnému v cyklohexanu a obsah se třepe 1 h na laboratorní třepače. Cyklohexanová vrstva se použije přímo k injikování do GC.

#### Podmínky GC-MS stanovení

Teplotní program kolony: 50 °C (2 min), pak vzestup při 20 °C/min. na 150 °C a při 7 °C/min na 250 °C (30 minut), teplota injektoru 225 °C, nástřík 2 µl/on column, nosný plyn helium o průtoku 1 ml/min, pracovní tlak 10<sup>-5</sup> Torr, teplota zdroje 200 °C, interface 250 °C.

Selektivní ionty pro hodnocení PAH: 128-naftalen; 152-acenaftalen; 154-acenaftalen; 166-fluoren; 178-fenantrén; antracen; 202-fluoranten, pyren; 228-benzo(a)antracen, chrysen; 252-benzo(b)fluoranten, benzo(k)fluoranten, benzo(a)pyren; 276-indeno(1,2,3-cd)pyren, benzo(g,h,i)perylene; 278-dibenzo(a,h)antracen.

#### Podmínky QA/QC, parametry metody

Jednotlivé analyty jsou identifikovány porovnáním jejich hmotnostních spekter a retenčních časů se spektry z knihovny spekter a časy standardů. Kalibrační přímky se sestavují v rozmezí koncentrací 0 až 1 ng/nástřík, ke kvantitativnímu hodnocení se používají plochy piků molekulových iontů. Hodnocení se provádí pomocí datastanice se software Magnum System verze 2.4.

Výtěžnost byla testována na vzorku stájového prachu (šest paralelních stanovení) po přidavku jednotlivých PAH v koncentraci 10 µg/kg a pohybuje se v rozmezí 64 až 98 %. Limit detekce jednotlivých PAH v krmivu, sedimentovaném prachu, prasečím kejždě, různých typech půd a kalech dosahuje hodnoty 0,1 až 0,5 µg/kg původní hmoty dle typu PAH. U vzorků vody, analyzovaných mikroextrakcí, je výtěžnost PAH nad 90 % a limit detekce 1 až 5 ng/l vody dle typu PAH.

#### Hodnocení výsledků

K hodnocení výsledků byl použit program STAT Plus, verze 1.01 (Matoušková aj., 1992). Výsledky v tabulkách jsou vyjádřeny takto: počet vyšetřených vzorků (*n*), medián, průměr, směrodatná odchylka, minimální a maximální hodnota. Obsah vybraných PAH v napájecí vodě byl posuzován dle ČSN 751111.

#### VÝSLEDKY

Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v krmivu je uveden v tab. I. V krmivu byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 207,7 µg/kg, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 7,4 µg/kg a průměrná hladina BaP byla nižší než 0,1 µg/kg. Karcinogenní PAH tvořily 3,6 % z celkové sumy PAH v krmivu.

Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v napájecí vodě je uveden v tab. II. Nejvyšší mezní hodnota (NMH) pro BaP v napájecí vodě (10 ng/l) byla mírně překročena pouze u jednoho vzorku (11,0 ng/l) z chovu skotu Ne. V napájecí vodě byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 51,6 ng/l, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 8,4 ng/l a průměrná hladina BaP byla 1,1 ng/l. Karcinogenní PAH tvořily 16,3 % z celkové sumy PAH v napájecí vodě.

Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) ve stájovém prachu je uveden v tab. III. Ve stájovém prachu byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 2 147,9 µg/kg, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 178,0 µg/kg a průměrná hladina BaP byla 5,6 µg/kg. Karcinogenní PAH tvořily 8,3 % z celkové sumy PAH ve stájovém prachu.

Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v prasečím kejždě je uveden v tab. IV. V prasečím kejždě byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 543,2 µg/kg sušiny, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 47,0 µg/kg sušiny a průměrná hladina BaP byla 2,3 µg/kg sušiny. Karcinogenní PAH tvořily 8,6 % z celkové sumy PAH v prasečím kejždě.

Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) ve vozovkovém prachu je uveden v tab. V. Ve vozovkovém prachu byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 13 142,7 µg/kg, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 4 597,2 µg/kg a průměrná hladina BaP byla 384,0 µg/kg. Karcinogenní PAH tvořily 35,0 % z celkové sumy PAH ve vozovkovém prachu.

Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v půdě je uveden v tabulce VI. V půdě byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 3 542,8 µg/kg, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 1 767,1 µg/kg a průměrná hladina BaP byla 187,1 µg/kg. Karcinogenní PAH tvořily 49,9 % z celkové sumy PAH v půdě.

#### DISKUSE

Jsou shrnuty výsledky dvouleté pilotní studie, jejímž cílem bylo přinést základní informace o výskytu 16 PAH (U.S. EPA „priority pollutant PAHs“) ve stájovém a mimostájovém prostředí farem prasat a skotu.

Hygienické limity pro obsah PAH v krmivu, stájovém prachu, prasečím kejždě a vozovkovém prachu doposud nejsou stanoveny. Pro pitnou vodu je stanovena nejvyšší mezní hodnota (NMH) pro fluoranten (50 ng/l) a pro benzo(a)pyren (10 ng/l), a to dle ČSN 751111. Pro půdu byly navrženy (Podlešáková, 1995) následující limity kontaminace (LK) pro 12 individuálních PAH (µg/kg), a to: fluoranten (300), pyren (200), fenantrén (150), benzo(a)fluoranten (100), benzo(a)antracen (100), antracen (80), indeno(1,2,3-cd)pyren (100), benzo(a)pyren (75), benzo(g,h,i)perylene (60), benzo(k)fluoranten (50), chrysen (50) a naftalen (30).

Průměrná celková suma 16 PAH (v jednotlivých komoditách) bude v dalším textu označována jako celko-

I. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (µg/kg) v krmivu ( $n = 12$ ) odebraném v chovech prasat (D., M., T.) a skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 a 1996 – Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (µg/kg) in feedstuffs samples ( $n = 12$ ) taken on pig farms (D., M., T.) and cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyt <sup>1</sup>	Medián <sup>2</sup>	Průměr <sup>3</sup>	Směrodatná odchylka <sup>4</sup>	Minimum	Maximum
Na	2,0	4,3	5,6	0,1	19,8
Acy	0,7	0,6	0,4	0,1	1,0
Ace	1,0	3,7	6,1	0,1	19,3
Fl	2,0	5,6	8,2	0,4	27,3
Fen	27,0	95,7	151,5	0,3	517,2
An	1,0	60,3	149,8	0,1	486,9
Fa	9,0	14,3	17,4	0,1	61,4
Pyr	9,5	15,8	27,0	0,1	97,2
BaA*	1,0	2,8	5,9	0,1	20,7
Chry*	1,0	4,6	9,3	0,1	32,8
BbF*	–	<0,1	–	–	–
BkF*	–	<0,1	–	–	–
BaP*	–	<0,1	–	–	–
DBahA*	–	<0,2	–	–	–
BghiP	–	<0,2	–	–	–
IcdP*	–	<0,2	–	–	–

Vysvětlivky použitých značek – Symbols and abbreviations used:

\* živočišné karcinogeny – animal carcinogens

Na = naftalen – naphthalene  
 Acy = acenaftylen – acenaphthylene  
 Ace = acenaften – acenaphthene  
 Fl = fluoren – fluorene  
 Fen = fenantren – phenanthrene  
 An = antracen – anthracene  
 Fa = fluoranten – fluoranthene  
 Pyr = pyren – pyrene  
 BaA = benzo(a)antracen – benzo(a)anthracene  
 Chry = chrysen – chrysene  
 BbF = benzo(b)fluoranten – benzo(b)fluoranthene  
 BkF = benzo(k)fluoranten – benzo(k)fluoranthene  
 BaP = benzo(a)pyren – benzo(a)pyrene  
 DBahA = dibenzo(a,h)antracen – dibenzo(a,h)anthracene  
 BghiP = benzo(g,h,i)perylene – benzo(g,h,i)perylene  
 IcdP = indeno(1,2,3-cd)pyren – indeno(1,2,3-cd)pyrene

<sup>1</sup>analyte, <sup>2</sup>median, <sup>3</sup>average, <sup>4</sup>standard deviation

vá suma PAH, průměrná celková suma sedmi karcinogenních jako celková suma karcinogenních PAH a průměrná hladina BaP jako hladina BaP.

Česká zemědělská a potravinářská inspekce (ČZPI) od roku 1993 sleduje obsah 12 PAH ve vybraných potravinách rostlinného původu (jablka, zelí, rýže, pšeničná mouka a rostlinné oleje). Z těchto komodit lze v krmných směsích (KS) pro hospodářská zvířata využít pšeničnou mouku, a to jako vehikulum doplňku biofaktorů (tvoří 1 až 3 % KS). Pšeničná mouka ( $n = 48$ ) vyšetřená v České republice v roce 1995 obsahovala průměrně 1,864 µg/kg sumy 12 PAH. Nejvíce byly

II. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (ng/l) v napájecí vodě ( $n = 21$ ) odebrané v chovech prasat (D., M., T.) a skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 a 1996 – Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (ng/l) in feed water samples ( $n = 21$ ) taken on pig farms (D., M., T.) and cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyt <sup>1</sup>	Medián <sup>2</sup>	Průměr <sup>3</sup>	Směrodatná odchylka <sup>4</sup>	Minimum	Maximum
Na	4,0	11,0	13,3	1,0	51,0
Acy	0,6	1,4	2,1	0,2	7,4
Ace	1,0	3,9	7,9	0,2	36,2
Fl	1,0	2,1	2,7	0,2	9,5
Fen	4,2	11,1	14,4	0,5	41,9
An	1,0	3,5	8,7	0,2	40,2
Fa	1,7	3,8	5,5	0,7	25,5
Pyr	3,4	5,7	8,8	0,4	41,7
BaA*	0,6	1,8	3,3	0,2	12,6
Chry*	1,0	1,7	3,0	0,3	12,7
BbF*	0,9	1,0	1,6	0,3	8,0
BkF*	0,9	0,9	1,6	0,3	7,9
BaP*	1,1	1,1	2,3	0,3	11,0
DBahA*	1,2	1,2	1,9	0,5	9,2
BghiP	0,8	0,7	0,2	0,5	1,0
IcdP*	0,7	0,7	0,2	0,5	1,0

Vysvětlivky použitých značek a zkratk viz tab. I – Symbols and abbreviations see Tab. I

v pšeničné mouce zastoupeny fenantren, fluoranten a pyren, které tvořily 89 % celkové sumy 12 PAH (Drápal a Valcl, 1996).

Ve vyšetřených krmivech byla celková suma PAH (207,7 µg/kg) i celková suma karcinogenních PAH (7,4 µg/kg) nízká. Karcinogenní PAH tvoří přibližně 3,6 % z celkové sumy PAH v krmivech. Hladina BaP v krmivech byla pod limitem detekce metody. Z nekarcinogenních PAH v krmivech převažují fenantren, antracen a pyren, které dohromady tvoří 83 % z celkové sumy PAH v krmivech.

Nejvyšší celková suma PAH (1 091 µg/kg) byla zjištěna ve vojtěškovém seně na farmě skotu Ne. Vojtěškové seno bylo sklizeno z pole, které se nachází v těsné blízkosti Hodonínské tepelné elektrárny. Elektrárny spalující uhlí patří mezi významné zdroje PAH v ovzduší, nelze však opomenout ani lokální topeniště, která při zhoršených podmínkách spalování rovněž produkují vysoce toxické PAH (Šrám aj., 1996).

Nejvyšší mezní hodnota (NMH) pro BaP v napájecí vodě byla mírně překročena pouze u jednoho vzorku (11,0 ng/l) z chovu skotu Ne. Rovněž v napájecí vodě byla celková suma PAH (51,6 ng/l) i celková suma karcinogenních PAH (8,4 ng/l) nízká. Karcinogenní PAH tvoří přibližně 16,3 % z celkové sumy PAH v napájecí vodě. Průměrná hladina BaP v napájecí vodě činila 1,1 ng/l.

III. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (µg/kg) ve stájovém prachu ( $n = 17$ ) odebraném v chovech prasat (D., M., T.) a skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 a 1996 – Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (µg/kg) in stable dust samples ( $n = 17$ ) taken on pig farms (D., M., T.) and cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 and 1996

Aanalyt <sup>1</sup>	Medián <sup>2</sup>	Průměr <sup>3</sup>	Směrodatná odchylka <sup>4</sup>	Minimum	Maximum
Na	4,4	212,8	375,4	0,6	1 356,0
Acy	0,6	7,9	14,8	0,1	51,0
Ace	7,0	31,1	49,9	0,6	169,0
Fl	18,0	73,2	153,5	0,2	571,0
Fen	186,6	689,6	1 839,8	0,2	7 774,0
An	11,1	510,6	1 637,7	0,2	6 810,0
Fa	142,0	299,4	422,2	39,5	1 598,0
Pyr	74,0	127,6	134,4	6,0	493,7
BaA*	18,0	32,6	52,4	0,2	225,0
Chry*	33,0	51,0	69,1	8,0	302,6
BbF*	20,0	45,8	88,2	0,3	372,8
BkF*	1,2	15,1	30,0	0,3	120,0
BaP*	8,6	5,6	4,7	0,3	14,4
DBahA*	3,6	6,9	9,4	0,5	38,9
BghiP	8,0	17,7	32,3	0,5	137,8
IcdP*	9,0	21,0	38,8	0,5	166,7

Vysvětlivky použitých značek a zkratk viz tab. I – Symbols and abbreviations see Tab. I

Z nekarcinogenních PAH v napájecí vodě převažují fenantren, naftalen a pyren, které dohromady tvoří 54 % z celkové sumy PAH. Z karcinogenních PAH v napájecí vodě převládají benzo(a)antracen a chrysen.

Nejvyšší celková suma PAH v napájecí vodě (232 ng/l) byla zjištěna na farmě prasat M., ve které se používá k napájení prasat vlastní zdroj (studna). Současně byla v chovu prasat M. prokázána Amesovým testem zvýšená mutagenní aktivita napájecí vody (Raszyk aj., 1995, 1996).

Koncentrace celkové sumy PAH ve stájovém prachu (2 148 µg/kg) byla přibližně desetkrát vyšší než v krmivu (208 µg/kg). Celková suma karcinogenních PAH (178 µg/kg) tvoří přibližně 8,3 % z celkové sumy PAH ve stájovém prachu. Hladina BaP ve stájovém prachu činí 5,6 µg/kg. Z nekarcinogenních PAH ve stájovém prachu převládají fenantren, antracen a fluoranten, které dohromady tvoří přibližně 70 % z celkové sumy PAH. Z karcinogenních PAH ve stájovém prachu převažují chrysen a benzo(b)fluoranten.

Nejvyšší celková suma PAH (17 546 µg/kg) byla zjištěna ve stájovém prachu odebraném v kravíně na farmě skotu Ne. Do kravína zajíždí třikrát denně traktor při navážení krmiva. Traktory používají jako pohonnou hmotu motorovou naftu. Bylo zjištěno, že motorová nafta obsahuje vysokou koncentraci celkové sumy 27 PAH, a to 7 341 mg/l (Lee aj., 1995). Emise z die-

IV. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (µg/kg sušiny) v prasečí kejďe ( $n = 16$ ) odebrané v chovech prasat (D., M., T.) v okrese Hodonín v letech 1995 a 1996 – Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (µg/kg) of dry mater in porcine liquid manure in pig slurry samples ( $n = 16$ ) taken on pig farms (D., M., T.) and cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyt <sup>1</sup>	Medián <sup>2</sup>	Průměr <sup>3</sup>	Směrodatná odchylka <sup>4</sup>	Minimum	Maximum
Na	124,0	153,7	181,3	4,0	588,0
Acy	9,0	7,6	8,6	0,2	35,0
Ace	12,5	15,0	12,4	1,2	39,0
Fl	16,0	18,0	13,0	1,8	43,0
Fen	135,0	142,9	109,5	0,2	401,0
An	10,3	42,4	66,4	0,2	202,0
Fa	70,0	72,3	54,3	27,0	215,6
Pyr	25,5	38,7	33,0	4,5	119,7
BaA*	10,5	10,4	12,5	0,2	55,0
Chry*	10,0	12,8	13,9	0,2	60,0
BbF*	9,0	10,4	8,3	0,3	32,4
BkF*	0,6	3,2	2,3	0,3	5,0
BaP*	1,1	2,3	2,1	0,3	5,9
DBahA*	0,9	2,0	1,9	0,5	5,0
BghiP	4,0	5,6	3,3	0,5	16,0
IcdP*	4,1	5,9	4,3	0,2	19,9

Vysvětlivky použitých značek a zkratk viz tab. I – Symbols and abbreviations see Tab. I

selových motorů z hlediska obsahu PAH obsahují zejména benzo(a)pyren, benzo(b,j,k)fluoranteny a chrysen (Savela aj., 1995). Vysoké koncentrace PAH rovněž obsahuje vyjetý (upotřebený) motorový olej (Clouner aj., 1996). Může tedy docházet ke kontaminaci stájového prostředí unikajícím motorovým olejem při netěsnosti motoru.

Dalším zdrojem PAH ve vnitřním stájovém prostředí může být asfalt používaný jako izolační či spárovací materiál. V asfaltu se může nacházet až 2 g/kg PAH (Kučílek, 1994).

Celková suma PAH v prasečí kejďe (543 µg/kg sušiny) byla přibližně 2,6krát vyšší než v krmivu (208 µg/kg) a celková suma karcinogenních PAH (47 µg/kg sušiny) tvoří přibližně 8,6 % z celkové sumy PAH v prasečí kejďe. Hladina BaP v prasečí kejďe činí 2,3 µg/kg sušiny.

Z nekarcinogenních PAH v prasečí kejďe dominují naftalen, fenantren a fluoranten, které dohromady tvoří 68 % z celkové sumy PAH. Z karcinogenních PAH v prasečí kejďe převládají chrysen, benzo(a)antracen a benzo(b)fluoranten.

Nejvyšší celková suma PAH v prasečí kejďe (1 018 µg/kg sušiny) byla zjištěna na farmě prasat D. Kejda byla odebrána z otevřené sběrné nádrže v zimním období. PAH, které se vyskytují v prasečí kejďe, mohou pocházet z krmiva, napájecí vody, stájového prachu,

V. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (µg/kg) ve vozovkovém prachu ( $n = 14$ ) odebraném v chovech prasat (D., M., T.) a skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 a 1996 – Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (µg/kg) in road dust samples ( $n = 14$ ) taken on pig farms (D., M., T.) and cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyt <sup>1</sup>	Medián <sup>2</sup>	Průměr <sup>3</sup>	Směrodatná odchyška <sup>4</sup>	Minimum	Maximum
Na	65,1	862,7	2 419,6	2,7	9 148,0
Acy	5,2	10,8	13,5	0,2	38,0
Ace	7,0	207,5	647,9	0,7	2 452,0
Fl	28,3	299,5	806,5	3,5	3 047,0
Fen	704,5	1 868,9	2 974,5	194,0	10 488,0
An	45,4	899,8	2 426,9	5,0	9 188,0
Fa	1 315,5	2 491,4	3 185,9	242,4	11 515,0
Pyr	736,4	1 436,4	1 928,8	231,0	7 331,0
BaA*	372,0	989,8	1 206,1	81,0	3 347,0
Chry*	830,0	1 167,1	1 386,5	135,0	4 511,4
BbF*	430,0	869,9	1 367,3	10,0	4 606,0
BkF*	103,0	523,7	650,7	5,0	1 812,0
BaP*	173,5	384,0	516,3	5,0	1 870,0
DBahA*	27,0	122,6	202,6	5,0	635,0
BghiP	104,0	468,5	826,1	5,0	2 798,1
IcdP*	138,0	540,1	841,7	5,0	2 293,5

Vysvětlivky použitých značek a zkratk viz tab. I – Symbols and abbreviations see Tab. I

asfaltu použitého na podlahách či kanalizaci vedoucí kejdou ze stájí do sběrné nádrže. Dalším zdrojem PAH v kejdě uložené v otevřených sběrných nádržích je atmosferický spad.

V zemědělských farmách ve Švýcarsku byla zjištěna průměrná hladina 16 PAH v prasečí kejdě 143 µg/kg (Berset a Holzer, 1995), byla tedy 3,8krát nižší než obsah 16 PAH v kejdě prasat v okrese Hodonín (543 µg/kg sušiny).

V prachu odebraném z vozovek lokalizovaných na farmách prasat a krav byla zjištěna nejvyšší celková suma PAH (13 143 µg/kg), která byla 6krát vyšší než ve stájovém prachu (2 148 µg/kg). Celková suma karcinogenních PAH (4 597 µg/kg) tvoří přibližně 35 % z celkové sumy PAH ve vozovkovém prachu. Hladina BaP ve vozovkovém prachu (384 µg/kg) byla téměř 70krát vyšší než ve stájovém prachu (5,6 µg/kg).

Z nekarcinogenních PAH ve vozovkovém prachu převažují fluoranten, fenantren a pyren, které dohromady tvoří 44 % z celkové sumy PAH. Z karcinogenních PAH ve vozovkovém prachu převažují chrysen, benzo(a)antracen a benzo(b)fluoranten, které představují 23 % z celkové sumy PAH a 66 % z celkové sumy karcinogenních PAH.

Nejvyšší celková suma PAH ve vozovkovém prachu (67 638 µg/kg) byla zjištěna v chovu skotu Na. Vzorek vozovkového prachu byl odebrán před opravárenskými

VI. Obsah polycyklických aromatických uhlovodíků (µg/kg) v půdě ( $n = 11$ ) odebrané v chovech prasat (D., M., T.) a skotu (Na., Ne.) v okrese Hodonín v letech 1995 a 1996 – Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons (µg/kg) in soil samples ( $n = 11$ ) taken on pig farms (D., M., T.) and cattle farms (Na., Ne.) in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyt <sup>1</sup>	Medián <sup>2</sup>	Průměr <sup>3</sup>	Směrodatná odchyška <sup>4</sup>	Minimum	Maximum
Na	5,2	79,8	116,6	2,5	297,0
Acy	3,8	7,2	7,5	0,6	21,0
Ace	4,0	6,8	7,6	0,5	20,2
Fl	5,9	8,3	11,4	0,3	39,0
Fen	77,0	172,5	300,9	8,2	1 005,0
An	10,4	136,8	275,1	0,2	880,0
Fa	189,0	606,7	918,5	19,3	2 954,0
Pyr	142,0	558,1	834,2	13,0	2 847,0
BaA*	99,7	294,2	359,8	8,7	1 160,0
Chry*	115,7	345,4	404,4	10,0	1 254,0
BbF*	423,0	455,8	558,6	18,0	1 832,0
BkF*	60,2	194,6	334,7	2,5	1 164,0
BaP*	80,1	187,1	285,5	7,7	949,0
DBahA*	35,6	61,1	69,3	2,3	236,0
BghiP	79,0	199,5	347,5	5,0	1 189,0
IcdP*	108,1	228,9	297,2	6,7	1 033,0

Vysvětlivky použitých značek a zkratk viz tab. I – Symbols and abbreviations see Tab. I

dílnami, které se nacházejí ve vzdálenosti 15 m od krávin.

Hlavním zdrojem PAH ve vozovkovém prachu jsou emise z automobilové dopravy (Smith aj., 1995). Bylo zjištěno, že ve velkých městech (Kodaň) dieselové motory produkují dvě třetiny PAH, které vznikají veškerým dopravním provozem (Nielsen aj., 1996). Rovněž Yang a Bauman (1995) prokázali, že fenantren, pyren a fluoranten převažují v silničním prachu a lze jich využít jako indikátory kontaminace vozovkového prachu PAH.

Navržené limity kontaminace PAH v zemědělské půdě (Podlešáková, 1995) byly překročeny u naftalenu u tří vzorků, u fenantrenu u dvou vzorků, u fluorantenu u tří vzorků, u pyrenu u tří vzorků, u benzo(a)antracenu u pěti vzorků, u chrysenu u devíti vzorků, u benzo(b)fluorantenu u devíti vzorků, u benzo(k)fluorantenu u šesti vzorků, u benzo(a)pyrenu u šesti vzorků a u benzo(g,h,i)perylenu u sedmi vzorků z celkového počtu 11 vyšetřených vzorků půdy z okolí vepřínů a krávin.

Celková suma PAH v půdě (3 543 µg/kg) byla přibližně čtyřikrát nižší než ve vozovkovém prachu (13 143 µg/kg), ale celková suma karcinogenních PAH tvořila zhruba 50 % celkové sumy PAH v půdě. Hladina BaP v půdě (187 µg/kg) byla přibližně poloviční ve srovnání s vozovkovým prachem (384 µg/kg).

Z nekarcinogenních PAH v půdě převládají fluoranten, pyren a fenantren, které dohromady tvoří 38 % z celkové sumy PAH v půdě. Z karcinogenních PAH v půdě převažují benzo(b)fluoranten, chrysen a benzo(a)antracen které společně tvoří 31 % z celkové sumy PAH a 62 % z celkové sumy karcinogenních PAH.

Nejvyšší celková suma PAH v půdě (15 965 µg/kg) byla zjištěna na farmě skotu Na., kde byla současně zjištěna i nejvyšší koncentrace celkové sumy PAH ve vozovkovém prachu (67 638 µg/kg).

Hlavním zdrojem PAH v půdě je jejich atmosferická depozice (Smith aj., 1995). V plynné fázi ovzduší dominují nízkomolekulární PAH, zatímco v pevné fázi ovzduší převládají PAH s vyšší molekulovou hmotností (Jones aj., 1995). Na okrese Teplice, s využitím osobních odběrových souprav, bylo zjištěno, že průměrná suma 16 PAH v ovzduší byla 131 ng/m<sup>3</sup>, z toho zhruba 50 % tvořila suma sedmi karcinogenních PAH (Watts aj., 1994).

Vzhledem ke skutečnosti, že na našem pracovišti není k dispozici zařízení k odběrům vzorků ovzduší (např. Versatile Air Pollution Sampler – VAPS) nebylo provedeno stanovení koncentrace PAH v ovzduší.

Ve městě Brně, v blízkosti frekventovaných vozovek, činila suma 16 PAH v půdě 3 780 µg/kg (Strnad aj., 1994), byla tedy přibližně stejná jako v půdě v okolí vepřinů a kravinů (3 543 µg/kg).

V zemědělské půdě ve Švýcarsku (Berset a Holzer, 1995) byla zjištěna průměrná koncentrace sumy 16 PAH pouze 175 µg/kg, byla tedy 20krát nižší než v půdě v okolí vepřinů a kravinů.

Dalším nezanedbatelným zdrojem PAH na farmách může být spalování stohů slámy. Zejména při hoření ječné a pšeničné slámy dochází ke vzniku velkého množství PAH (Jenkins aj., 1996). Konečně k zátěži farem hospodářských zvířat PAH přispívá i spalování uhlí či zemního plynu při získávání tepelné energie k zabezpečení provozu farmy.

Vysoké koncentrace PAH ve stájovém prachu, vozovkovém prachu a v půdě v okolí vepřinů a kravinů dokládají, že prostředí farem hospodářských zvířat je značně zatížené rizikovými PAH. Z nekarcinogenních PAH zde převažují fenantren, fluoranten a pyren. Z karcinogenních PAH převládají chrysen, benzo(a)antracen a benzo(b)fluoranten.

Řešení problematiky karcinogenních PAH pokračuje a je zacílené především na odhalování zdrojů PAH a na omezování jejich produkce či pronikání do vnitřního stájového prostředí.

Stájové prostředí je současně pracovním prostředím pro ošetřovatele hospodářských zvířat, proto jsou poznatky o výskytu karcinogenních PAH v tomto prostředí bezprostředně využitelné i lékařskou službou (preventivní a pracovní lékařství).

## LITERATURA

- BERSET, J. D. – HOLZER, R. (1995): Organic micropollutants in Swiss agriculture: distribution of polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH) and polychlorinated biphenyls (PCB) in soil, liquid manure, sewage sludge and compost samples – a comparative study. *Int. Environ. Anal. Chem.*, 59, 145–165.
- BINKOVA, B. – LEWTAS, J. – MISOVA, I. – RESSNER, P. – CERNA, M. – MRACKOVA, G. – PETERKOVA, K. – MUMFORD, J. – MEYER, S. – SRAM, R. (1996): Biomarker studies in northern Bohemia. *Environ. Health Persp.*, 104, (Suppl. 3), 591–597.
- CLONFERO, E. – NARDINI, B. – MARCHIORO, M. – BORDIN, A. – GABBANI, G. (1996): Mutagenicity and contents of polycyclic aromatic hydrocarbons in used a recycled motor oil. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol.*, 368(3–4), 283–291.
- CUI, X. S. – TORNDAL, U. B. – ERIKSSON, L. C. – MOLLER, L. (1995): Early formation of DNA adducts compared with tumor formation in a long-term tumor study in rats after administration of 2-nitrofluorene. *Carcinogenesis*, 16, 2135–2141.
- DAVILA, D. R. – ROMERO, D. L. – BURCHIEL, S. W. (1996): Human T cells are highly sensitive to suppression of mitogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons and this effect is differentially reversed by alpha-naphthoflavone. *Toxicol. Appl. Pharm.*, 139, 333–341.
- DRÁPAL, J. – VALCL, O. (ed.), 1996: Kontaminace potravních řetězců cizorodými látkami. Situace v roce 1995. *Inf. Bull. SVS ČR*, 5, 277 s.
- GABBANI, G. – HOU, S. M. – NARDINI, B. – MARCHIORO, M. – LAMBERT, B. – CLONFERO, E. (1996): GSTM1 and NAT2 genotypes and urinary mutagens in coke oven workers. *Carcinogenesis*, 17, 1677–1681.
- HOLOUBEK, I. (1995a): Polycyklické aromatické uhlovodíky v ovzduší. 1. část. *Ochr. Ovzd.*, 7(4), 3–6.
- HOLOUBEK, I. (1995b): Polycyklické aromatické uhlovodíky v ovzduší. 2. část. *Ochr. Ovzd.*, 7(5), 10–22.
- HRUBÁ, D. (1993): Polycyklické aromatické uhlovodíky. *Českoslov. Hyg.*, 38, 106–113.
- JENKINS, B. B. – JONES, A. D. – TURN, S. Q. – WILLIAMS, R. B. (1996): Emission factors for polycyclic aromatic hydrocarbons from biomass burning. *Environ. Sci. Technol.*, 30, 2462–2469.
- JONES, K. C. – JOHNSTON, A. E. – MCGRATH, S. P. (1995): The importance of long- and short-term air soil exchanges of organic contaminants. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 59, 167–178.
- KUŽILEK, V. (1994): Polycyklické aromatické uhlovodíky v hydrosféře. Výzkum pro praxi, sešit 25. Praha, Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. Masaryka, 58 s.
- LEE, W. J. – WANG, Y. F. – LIN, T. C. – CHEN, Y. Y. – LIN, W. C. – KU, C. C. – CHENG, J. T. (1995): PAH characteristics in the ambient air of traffic-source. *Sci. Total Environ.*, 159, 185–200.
- MARVIN, C. H. – LUNDRIGAN, J. A. – MCCARRY, B. E. – BRYANT, D. W. (1995): Determination and genotoxicity of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons

- isolated from coal-tar-contaminated sediment. *Environ. Toxicol. Chem.*, *14*, 2059–2066.
- MASS, M. J. – ABUSHAKRA, A. – ROOP, B. C. – NELSON, G. – GALATI, A. J. – STONER, G. D. – NESNOW, S. – ROSS, J. A. (1996): Benzo(b)fluoranthene: Tumorigenicity in strain A/J mouse lungs. DNA adducts and mutations in the Ki-ras oncogene. *Carcinogenesis*, *17*, 1701–1704.
- MATOUŠKOVÁ, O. – CHALUPA, J. – CIGLER, M. – HRUŠKA, K. (1992): STAT plus-užívateľská príručka, verze 1.01. 1. vyd. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství. 168 s.
- NIELSEN, T. (1996): Traffic contribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in the center of a large city. *Atmos. Environ.*, *30*, 3481–3490.
- PODLEŠÁKOVÁ, E. (1995): Návrh limitů kontaminace (LK) perzistentních organických xenobiotických látek, geometrické průměry (GM) jejich požadových hodnot ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). In: Výsledky kontroly monitoringu cizorodých látek. Situace v roce 1994. Ročenka Ministerstva zemědělství České republiky. Ročník II. s. 37.
- RALSTON, S. L. – SEIDEL, A. – LUCH, A. – PLATT, K. L. – BAIRD, W. M. (1995): Stereoselective activation of dibenzo(a,l)pyrene to (–)-anti (11R, 12S, 13S, 14R)- and (+)-syn(11S, 12R, 13S, 14R) 11,12-diol-13,14-epoxides which bind extensively to deoxyadenosine residues of DNA in the human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Carcinogenesis*, *16*, 2899–2907.
- RASZYK, J. – POKORNÁ, Z. – STRNADOVÁ, V. – GAJDUŠKOVÁ, J. – ULRICH, R. – JAROŠOVÁ, A. – SALAVA, J. – PALÁC, J. (1995): Mutagenicity of stable dust and drinking water on swine and cattle farms. *Vet. Med. – Czech*, *40*, 273–278.
- RASZYK, J. – ULRICH, R. – GAJDUŠKOVÁ, V. – JAROŠOVÁ, V. – ŠABATOVÁ, V. (1996): Výskyt karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v chovech zvířat a možné riziko pro potravní řetězec člověka. In: Sbor. XXIII. Semináře o jakosti potravin a potravinových surovin. 6. 3. 1996, Brno, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, s. 20–21.
- SAVELA, K. – KING, L. – GALLAGHER, J. – LEWTAS, J. (1995): P-32-postlabeling and HPLC separation of DNA adducts formed by diesel exhaust extracts *in vitro* and in mouse skin and lung after topical treatment. *Carcinogenesis*, *16*, 2083–2089.
- SILKWORT, J. B. – LIPINSKAS, T. – STONER, C. R. (1995): Immunosuppressive potential of several polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) found at a Superfund site: New model used to evaluate additive interactions between benzo(a)pyrene and TCDD. *Toxicology*, *105*, 375–386.
- SMITH, D. J. T. – EDELHAUSER, E. C. – HARRISON, R. M. (1995): Polynuclear aromatic hydrocarbon concentrations in road dust and soil samples collected in the United Kingdom and Pakistan. *Environ. Technol.*, *16*, 45–53.
- STRNAD, M. – ŠAŇKA, M. – BOHÁČEK, Z. – BORKOVCOVÁ, I. – VONDRA, J. (1994): Soil pollution by heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons in the town of Brno (Czech Republic). *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, *54*, 233–248.
- SURH, Y. J. – SHLYANKEVICH, M. – LEE, J. W. – YOO, J. K. (1996): Inhibition of covalent DNA binding and mutagenicity of benzo(a)pyrene by isopropyl-2-(1,3-dithietane-2-ylidene)-2-[N-(4-methylthiazol-2-yl) carbonyl]acetate (YH439), a novel hepatoprotective agent. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol.*, *367*(4), 219–224.
- ŠRÁM, R.: Program Teplice ukazuje cesty k prevenci. *Přiloha ZdN*, 25. srpna 1995, 18–19.
- ŠRÁM, R. – BENEŠ, I. – BINKOVÁ, B. – DEJMEK, J. – HORSTMAN, D. – KOTĚŠOVEC, F. – OTTO, D. – PERREAULT, S. D. – RUBEŠ, J. – SELEVAN, S. G. – SKALÍK, I. – STEVENS, R. K. – LEWTAS, J. (1996): Teplice program – the impact of air pollution on human health. *Environ. Hlth Perspect.*, *104*, (Suppl.4), 699–714.
- WATTS, R. – LEWTAS, J. – STEVENS, R. – HARTLAGE, R. – PINTO, J. – WILLIAMS, R. – HATTAWAY, K. – MÍŠKOVÁ, I. – BENEŠ, I. – KOTĚŠOVEC, F. – ŠRÁM, R. (1994): Czech–U.S. EPA healthy study: Air exposure to PAH and organic mutagens in the Teplice district of northern Bohemia. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, *56*, 271–287.
- YANG, Y. – BAUMANN, W. (1995): Seasonal and areal variations of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in street dust determined by supercritical fluid extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Analyst*, *120*, 243–248.

Received: 97–06–04

Accepted after corrections: 97–09–01

---

*Kontaktní adresa:*

MVDr. Josef R a s z y k, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika  
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29, e-mail: kahr@vuvel.anet.cz

---

# ÚSTŘEDNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ KNIHOVNA, PRAHA 2, SLEZSKÁ 7

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna v Praze (dále jen ÚZLK), která je jednou z největších zemědělských knihoven na světě, byla založena v roce 1926. Již od počátku šlo o knihovnu veřejnou. Knihovna v současné době obsahuje více než jeden milion svazků knih, cestovních zpráv, dizertací, literatury FAO, svázaných ročníků časopisů z oblasti zemědělství, lesnictví, veterinární medicíny, ekologie a dalších oborů. Knihovna odebírá 750 titulů domácích a zahraničních časopisů. Informační prameny získané do fondu jsou v ÚZLK zpracovávány do systému katalogů – je budován jmenný katalog a předmětový katalog jako základní katalogy knihovny a dále různé speciální katalogy a kartotéky. Počátkem roku 1994 přistoupila ÚZLK k automatizovanému zpracování knihovního fondu v systému CDS/ISIS.

Pro informaci uživatelů o nových informačních pramenech ve fondech ÚZLK zpracovává a vydává knihovna následující publikace: Přehled novinek ve fondu ÚZLK, Seznam časopisů objednaných ÚZLK, Přehled rešerší a tematických bibliografií z oboru zemědělství, lesnictví a potravinářství, AGROFIRM – zpravodaj o přírůstcích firemní literatury (je distribuován na disketách), AGROVIDEO – katalog videokazet ÚZLK.

V oblasti mezinárodní výměny publikací knihovna spolupracuje s 800 partnery ze 45 zemí světa. Knihovna je členem IAALD – mezinárodní asociace zemědělských knihovníků. Od září 1991 je členem mezinárodní sítě zemědělských knihoven AGLINET a od 1. 1. 1994 je depozitní knihovnou materiálů FAO pro Českou republiku.

Knihovna poskytuje svým uživatelům následující služby:

## **Výpůjční služby**

Výpůjční služby jsou poskytovány všem uživatelům po zaplacení ročního registračního poplatku. Mimopražští uživatelé mohou využít možnosti meziknihovní výpůjční služby. Vzácné publikace a časopisy se však půjčují pouze prezenčně.

## **Reprografické služby**

Knihovna zabezpečuje pro své uživatele zhotovování kopií obsahů časopisů a následné kopie vybraných článků. Na počkání jsou zhotovovány kopie na přání uživatelů. Pro pražské a mimopražské uživatele jsou zabezpečovány tzv. individuální reproslužby.

## **Služby z automatizovaného systému firemní literatury**

Jsou poskytovány z databáze firemní literatury, která obsahuje téměř 13 000 záznamů 1 700 firem.

## **Referenční služby**

Knihovna poskytuje referenční služby vlastních databází knižních novinek, odebíraných časopisů, rešerší a tematických bibliografií, vědeckotechnických akcí, firemní literatury, videotéky, dále z databází převzatých – Celostátní evidence zahraničních časopisů, bibliografických databází CAB a Current Contents. Cílem je podat informace nejen o informačních pramenech ve fondech ÚZLK, ale i jiné informace zajímavé zemědělskou veřejnost.

## **Půjčování videokazet**

V AGROVIDEU ÚZLK jsou k dispozici videokazety s tematikou zemědělství, ochrany životního prostředí a příbuzných oborů. Videokazety zasílá AGROVIDEO mimopražským zájemcům poštou.

Uživatelům knihovny slouží dvě studovny – všeobecná studovna a studovna časopisů. Obě studovny jsou vybaveny příručkovou literaturou. Čtenáři zde mají volný přístup k novinkám přírůstků knihovního fondu ÚZLK.

## **Adresa knihovny:**

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna  
Slezská 7  
120 56 Praha 2

## **Výpůjční doba:**

pondělí, úterý, čtvrtek:	9,00–16,30
středa	9,00–18,00
pátek	9,00–13,00

## **Telefonické informace:**

vedoucí:	24 25 50 74, e-mail: IHOCH@uzpi.agrec.cz
referenční služby:	24 25 79 39/linka 520
časopisy:	24 25 66 10
výpůjční služby:	24 25 79 39/linka 415
meziknihovní výpůjční služby:	24 25 79 39/linka 304
Fax:	24 25 39 38
E-mail:	ÚZLK@uzpi.agrec.cz

# APPLICATIONS OF FENCL'S EQUATIONS IN THE ACID-BASE BALANCE CHANGES RELATED TO PREGNANCY ON EWE

## POUŽITÍ FENCLOVÝCH ROVNIC U ZMĚN ACIDOBAZICKÉ ROVNOVÁHY VE VZTAHU K BŘEZOSTI U BAHNIC

C. Castillo<sup>1</sup>, P. García-Partida<sup>2</sup>, J. Hernández<sup>1</sup>, J. L. Benedito<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Department of Animal Pathology, Veterinary Faculty, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain*

<sup>2</sup> *Department of Animal Pathology, Veterinary Faculty, University Complutense, Madrid, Spain*

**ABSTRACT:** The Fencl's equations consider variables controlling the blood pH such as SID, proteins (mainly albumin) and  $p\text{CO}_2$ . Our objective is to apply this new approach to acid-base balance during pregnancy in ewes, and to consider the differences that appear in late pregnancy. Results showed that during late pregnancy there is an increase in the levels of unmeasured anions and albumin which are the primary causes of metabolic acidosis status. This fact affects internal balance with a decrease in buffer bases. Fencl's equations showed that the components involved in buffer base deviation were albumin, unmeasured anions and free-water. This last parameter, combined with  $\text{Na}^+$ , reflects a compensatory alkalosis concentration. We conclude that the homeostatic changes that occur before delivery appear in the fourth month of pregnancy and are mainly due to modifications in SID and albumin. The other independent variable  $p\text{CO}_2$ , only has an effect in the last fortnight, and both gave the same explanation: a respiratory compensatory mechanism to restore normal blood pH through an increased elimination of  $\text{CO}_2$ .

sheep; physiological periods; Fencl's acid-base approach

**ABSTRAKT:** Fenclovy rovnice vycházejí z proměnných řídících pH, jako je SID, proteiny (hlavně albumin) a  $p\text{CO}_2$ . Naším cílem bylo aplikovat tento nový přístup k acidobazické rovnováze během březosti u bahnic a vzít v úvahu změny, které se objevují v pozdní březosti. Výsledky ukázaly, že během pozdní březosti dochází ke zvýšení hladin neměřených aniontů a albuminu, které jsou primární příčinou metabolické acidózy. Tato skutečnost ovlivňuje rovnováhu vnitřního prostředí s poklesem pufrových bází. Fenclovy rovnice prokázaly, že odchylky pufrových bází byly způsobeny albuminem, neměřenými anionty a prostou vodou. Poslední uvedený parametr odráží spolu s  $\text{Na}^+$  kompenzační koncentrační alkalózu. Došli jsme k závěru, že homeostatické změny, vyskytující se před porodem v pátém měsíci březosti, jsou způsobené hlavně změnami SID a albuminu. Další nezávislá proměnná,  $p\text{CO}_2$ , měla vliv pouze v posledních dvou týdnech. Vysvětlením je respirační kompenzační mechanismus, směřující k obnovení normálního pH zvýšenou eliminací  $\text{CO}_2$ .

ovce; fyziologická období; Fenclovův acidobazický přístup

### INTRODUCTION

The pH of a solution is a measure of its acidity, and is equal to the negative decadic logarithm of hydrogen ion concentration ( $\text{H}^+$ ), being inversely proportional to it (Tasker, 1980).

The Henderson-Hasselbalch equation evaluates the acid-base status considering the interaction between pH,  $p\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ , but blood plasma is a very complex solution, containing strong ions ( $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ ), weak acids and  $\text{CO}_2$ , thus, there are more variables, apart from the forementioned ones that control  $\text{H}^+$  concentration.

Stewart's quantitative approach to acid-base chemistry provides a mathematical explanation for the relevant vari-

ables that control pH in body fluids and their interactions (Stewart, 1981). These studies show that the value of  $\text{H}^+$  is determined by, and only by, the difference between strong ions, mainly  $\text{Na}^+$  and  $\text{Cl}^-$ , proteins and  $p\text{CO}_2$ , which are, in turn, determined by the balance between tissue metabolism and respiration. Stewart introduces new concepts, like the classification of variables in a system, such as plasma, as independent or dependent. The first group is made up from strong ion difference (SID), proteins (mainly albumin) and  $p\text{CO}_2$ ; in the second group one can find  $\text{HCO}_3^-$ , among others. The first ones can be altered from outside the system without affecting each other, while the dependent variables are thought of as internal to the system; their

values depend on the values of the independent variables and reflect the behavior of the equilibrium reactions in the system.

Some authors have developed the clinical application of Stewart's method (Fencl and Leith, 1993), establishing equations based on physical chemistry and on data from human patients. According to the reports of Kowalchuk and Scheuermann (1994), Fencl's and Stewart's methods provide a good estimate of the  $H^+$  and  $HCO_3^-$  concentrations measured in plasma. However, these equations have not been critically evaluated in Veterinary Medicine.

With this aim Whitehair et al. (1995) and Fedde and Pieschl (1995) showed how these principles can be easily applied and showed the clinical usefulness of this approach in the evaluation of the acid-base balance in a variety of species (dog, cat, bovine and horse) disease statuses and physiological circumstances, like the exercise.

The purpose of this article is to apply these equations to sheep, considering their changes during pregnancy, and specially from the baseline status (anoestrus period) until the last days of this. Prior studies, carried out by us on this matter, and considering only the Henderson-Hasselbalch equation (Castillo, 1994), revealed that towards the end of pregnancy there are important changes in internal balance as a consequence of the modifications that the energetic metabolism shows. However, taking into account the new acid-base balance approach, showed by Stewart and Fencl, we are induced to think that there are more variables that could control  $H^+$  at such periods.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Acid-base and electrolyte measurements were performed on samples collected from 40 healthy ewe of Gallega breed, a native breed typical of Galicia (N. W. of Spain), ranging from 2 to 4 years of age. The diet of these grazing animals was based on fresh grass (*ad libitum*) from natural pasture without any other supplements and, during the last month of pregnancy, silage (4 kg/day/ewe; 20% dry matter) from the same pasture.

To establish similar physiological and nutritional conditions, the ewes were synchronized using a progestagen administered by intra-vaginal sponges, and PMSG, according to literature (Britten, 1989).

### Sample collection and analysis

Sampling began on the day we applied the intra-vaginal sponges and it was considered as a baseline sampling, another blood samples were taken in the fourth month of pregnancy and two weeks before parturition (the last one is reflected in the table as b.p.).

Samples were taken on selected ewes between 8.00 and 10.00 prior to the morning feeding. They had previously been separated from the flock the night before to minimize the effect of stress.

Blood samples were collected by jugular venipuncture taking into account all the precautions necessary for avoiding interferences in the measurements specially in the acid-base parameters (Zencic and Besser, 1990; Pruden et al., 1994). Whole blood was used to study the parameters related to acid-base balance (pH,  $pCO_2$ ,  $HCO_3^-$ , PCV, BE ( $BE_{observed}$ ),  $Na^+$ ,  $K^+$ ), all of them measured with a blood gas analyzer (BGE electrolytes, I.L.-1400); serum and plasma was used to measure the  $Cl^-$  and albumin concentrations, respectively, using an electrolyte analyzer (AVL 983-S, Scientific Corporation), and protein electrophoresis procedure with acetate plates and Ponceau-S staining (Helena Laboratories), in each case.

Calculated parameters were done using Fencl equations (Tab. I) and they were the following: change in BE due to free-water ( $BE_{fw}$ ), chlorine ion ( $BE_{Cl^-}$ ), unmeasured anions ( $BE_{ua}$ ) and albumin ( $BE_{alb}$ ) abnormalities. We preferred to use the albumin measurement rather than total protein determination because it is the only significant element, among the total proteins, that contributes to the variable negative charges in the acid-base equilibria in plasma (Figge et al., 1991). The SID and AG (anion gap) values were calculated by the formulas ( $Na^+ - Cl^-$ ) and  $[(Na^+ + K^+) - (Cl^- + HCO_3^-)]$ , respectively, and  $z$  value, necessary for the  $BE_{fw}$  determination, was calculated using the formula  $z = SID/Na^+$  normal for species (Whitehair et al., 1995). We employed, for calculated parameters, reference values which were obtained, monthly, for a year, from the blood of fifty healthy ewes of the same breed and environmental conditions, using the same analytical techniques. These mean values were:  $146.55 \pm 5.47$  mmol/l for  $Na^+$ ,  $112.36 \pm 0.80$  mmol/l for  $Cl^-$  and  $31.75 \pm 0.22$  g/l for albumin.

### Statistical procedure

The reported values are mean  $\pm$  standard error. A statistical test was performed using a one-way analysis of variance and statistical differences were established using Scheffe  $F$ -test ( $p < 0.05$ ) included in the statisti-

I. Fencl equations for evaluating acid-base status (Whitehair et al., 1995)

$$\begin{aligned} BE_{fw} &= z \text{ value for sheep } (Na^+_{measured} - Na^+_{normal \text{ for species}}) \\ BE_{Cl^-} &= Cl^-_{normal \text{ for species}} - Cl^-_{corrected} \\ BE_{alb} &= 3.7 (\text{albumin}_{normal} - \text{albumin}_{measured}) \\ BE_{ua} &= BE_{net} - (BE_{fw} + BE_{Cl^-} + BE_{alb}) \end{aligned}$$

Note:

$BE_{net}$  = observed base excess

$*Cl^-_{corrected} = Cl^-_{measured} (Na^+_{normal}/Na^+_{measured})$

## RESULTS

Results ( $\mu \pm$  std. error) are presented in Tab. II. In this table it can be appreciated that pregnancy modifies the evolution of several parameters, with ascending or descending behavior.

Towards the end of gestation, and specially two weeks before parturition, the ewe shows a metabolic acidosis status, according to pH,  $p\text{CO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$  and BE evolution, accompanied by a significant increase in blood

## DISCUSSION

Acid-base balance and electrolyte evolution during pregnancy have been studied by us in previous reports (Castillo, 1994; Castillo et al., 1996). In them we established a relationship between these and energy metabolism concluding that in late pregnancy, specially the last days, lipid mobilisation is the source of an overproduction of metabolic strong acids and, as a consequence, the organism tends to divert the acid-base balance towards a metabolic acidosis status. At the same time, respiratory system acts by compensating with a hyperventilatory response to remove excessive metabolic acids and causing a decrease in  $p\text{CO}_2$  values.

II. Mean values ( $\mu \pm$  std error) obtained using Fencel equations on sheep

Parameter	Baseline	4th month	15 days b.p.
Venous pH	7.41 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	7.39 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	7.36 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup>
$p\text{CO}_2$ (kPa)	5.52 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>	5.34 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	5.09 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>
$\text{HCO}_3^-$ (mmol/l)	26.75 $\pm$ 0.76 <sup>a</sup>	24.68 $\pm$ 0.48 <sup>b</sup>	22.91 $\pm$ 0.67 <sup>c</sup>
B.E. (mmol/l)	2.47 $\pm$ 0.96 <sup>a</sup>	0.03 $\pm$ 0.60 <sup>b</sup>	-1.63 $\pm$ 0.95 <sup>b</sup>
PCV (%)	45.97 $\pm$ 1.11 <sup>a</sup>	43.30 $\pm$ 1.10 <sup>a</sup>	39.45 $\pm$ 1.01 <sup>b</sup>
$\text{Na}^+$ (mmol/l)	144.25 $\pm$ 1.04 <sup>a</sup>	146.29 $\pm$ 0.50 <sup>b</sup>	148.60 $\pm$ 0.68 <sup>c</sup>
$\text{K}^+$ (mmol/l)	5.53 $\pm$ 0.24 <sup>a</sup>	5.33 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	5.71 $\pm$ 0.22 <sup>a</sup>
$\text{Cl}^-$ (mmol/l)	112.0 $\pm$ 1.12 <sup>a</sup>	111.93 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	113.48 $\pm$ 0.99 <sup>a</sup>
Albumin (g/l)	30.73 $\pm$ 0.84 <sup>a</sup>	32.13 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>	32.82 $\pm$ 0.77 <sup>b</sup>
SID	32.25 $\pm$ 1.67 <sup>a</sup>	34.36 $\pm$ 0.83 <sup>b</sup>	35.11 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>
$\text{BE}_{\text{fw}}$	-0.26 $\pm$ 0.21 <sup>a</sup>	0.07 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	0.62 $\pm$ 0.15 <sup>b</sup>
AG (mmol/l)	11.03 $\pm$ 2.22 <sup>a</sup>	15.01 $\pm$ 0.91 <sup>b</sup>	17.92 $\pm$ 0.94 <sup>b</sup>
$\text{BE}_{\text{CF}}$	-1.09 $\pm$ 1.52 <sup>a</sup>	0.66 $\pm$ 0.83 <sup>a</sup>	0.87 $\pm$ 0.65 <sup>a</sup>
$\text{BE}_{\text{ua}}$	0.78 $\pm$ 0.92 <sup>a</sup>	0.46 $\pm$ 1.77 <sup>a</sup>	0.10 $\pm$ 0.63 <sup>b</sup>
$\text{BE}_{\text{alb}}$	3.04 $\pm$ 3.72 <sup>a</sup>	-1.16 $\pm$ 1.90 <sup>a</sup>	-3.23 $\pm$ 2.32 <sup>b</sup>
$z$ value	0.22 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.23 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>	0.24 $\pm$ 0.01 <sup>a</sup>

Note: The characters a, b and c within the same row indicate different statistical groups ( $p < 0.05$ )

volume, reflected by the PCV behavior. In relation to the calculated parameters, we appreciated a descending evolution in  $\text{BE}_{\text{ua}}$  and  $\text{BE}_{\text{alb}}$ , reaching the lowest values a fortnight before parturition, indicating that at that moment there are the major levels of unmeasured anions and weak acids in the blood, respectively.

On the other hand, the highest levels in sodium and albumin concentrations appear two weeks before parturition, parallel to SID and AG evolution. The  $\text{BE}_{\text{fw}}$  behavior is a consequence of  $\text{Na}^+$  evolution reflecting a decrease in blood free-water, specially towards the end of pregnancy.

Finally there are three parameters that have not shown significant changes during the experiment; they are  $\text{Cl}^-$  and  $\text{K}^+$  ions and  $z$  value. In relation to last one, the mean  $z$  value for the sheep was  $0.23 \pm 0.01$ , but in this report we have considered  $z$  values for each physiological condition.

We can establish that homeostatic changes, which become more evident a fortnight before parturition, begin in the fourth month of pregnancy. The clearest factor is a venous pH decrease, reflecting an increase in blood  $\text{H}^+$  concentration. The Henderson-Hasselbalch approach to acid-base analysis considers only the effect of  $\text{HCO}_3^-$  and  $p\text{CO}_2$ ; according to this approach the decrease in  $\text{HCO}_3^-$  values results from its buffer activity of  $\text{H}^+$  and it is parallel to BE decrease. The  $p\text{CO}_2$  behavior shows that the respiratory system contributes to remove the  $\text{H}^+$  excess through a hyperventilatory response. Really, the acid-base abnormality at this moment, interpreted by the conventional approach, is a metabolic acidosis and a compensatory respiratory alkalosis.

But the application of Fencel equations, based on Stewart's principles, allowed us to detect which metabolic element it was that influenced this blood  $\text{H}^+$  increase, and to estimate the magnitude of it.

Firstly, the evolution shown by  $BE_{ua}$  and  $BE_{alb}$  reflects that there is a progressive increase in unmeasured anions (which includes organic acids) and weak acids (like albumin) and they are the primary causes of the metabolic acidosis shown in the last days of pregnancy. The increase in unmeasured anions is a consequence of endocrine changes that occur during pregnancy and which promote gluconeogenesis, ketogenesis, and fatty acids mobilisation (Herdt, 1988) and are the source of an overproduction of metabolic strong acids (Herdt, 1988; Clarenburg, 1992). The increase in albumin concentrations has been reported in pregnant ewes by other authors (Pieragostini et al., 1991; Henshaw, 1995).

The rise in blood  $H^+$  concentration will affect the internal balance through a consumption of buffer bases, reaching BE parameter negative values in the last days of pregnancy. This data, calculated by the analyzer, is a measure of the deviation of buffer bases from their normal values, and develops from  $pCO_2$  and  $HCO_3^-$  (IL, 1991; Tietz et al., 1994) and does not reflect the specific component which is involved.

Using Fencl's method we found that metabolic acidosis was connected with significant changes in plasma osmolality too, reflected in  $BE_{fw}$  evolution. This parameter, combined with an  $Na^+$  increase, shows that there is a concentration alkalosis, because the free-water deficit (reflected in a positive  $BE_{fw}$ ) will increase the  $Na^+$  concentration (Whitehair et al., 1995). Tietz et al. (1994) show that during metabolic acidosis the kidneys attempt to restore the normal blood pH by increased excretion of acids and preservation of bases and thus, in the renal tubules hydrogen ions from the tubular cells can be exchanged for sodium from the tubular fluid (Tietz et al., 1994). Also the decrease in the PCV percentage indicates a hemodilution state which means an increase in plasmatic volume. This is the sum of free-water and water bound to  $Na^+$ ; thus, sodium behavior is the main cause of SID changes because chlorine did not show significant modifications.

For these reasons, we conclude that the components that affect the buffer base deviation in late pregnancy are albumin, unmeasured anions and free-water.

According to Figge et al. (1991) the value of calculated AG correlates well with the serum albumin concentration; also AG rises because of the  $HCO_3^-$  changes, a dependent variable that is used in the calculation of AG; although AG has demonstrated to possess a limited usefulness in our study as it did not give information about the unmeasured anions that affected to venous pH. This coincided with previous reports on this matter (Whitehair et al., 1995).

The effect of the other independent variable,  $pCO_2$ , only appears in the final days, and the conventional and the Fencl approach give us the same explanation: the respiratory mechanism contributes to the restoration of normal blood pH through increased elimination of  $CO_2$  which can also contribute to the decrease in  $HCO_3^-$  values (Tietz et al., 1994).

## Acknowledgements

The authors want to thank Saavedra Farm for providing the ewes and facilities to conduct this study. Also authors are thankful to Dr. Kuiper, from the Department of Large Animal Medicine and Nutrition (Utrecht University) for his advices in this matter.

## REFERENCES

- BRITT, J. H. (1989): Inducción y sincronización de la ovulación. In: HAFEZ, E. S. E. (ed.): Reproducción e inseminación artificial en animales domésticos. 5th edn. Interamericana, Mexico, pp. 547-557.
- CASTILLO, C. (1994): Estudio fisiopatológico de la homeostasis del equilibrio ácido-base y electrolítico e interacciones con la hematología y perfil metabólico en hembras de ganado ovino durante la gestación, parto y puerperio. DVSc Thesis. Universidad de Santiago de Compostela.
- CASTILLO, C. – HERNÁNDEZ, J. – AYALA, I. – CANO, M. J. – LOPEZ, M. – GUINARTE, E. – BENEDITO, J. (1996): El incremento del metabolismo lipídico como causante de las variaciones en el equilibrio ácido-base en hembras ovinas de gestación gemelar. In: Proceedings of the IV Congreso de la Federación Mediterránea de Sanidad y Producción de Rumiantes. Murcia, pp. 143-146.
- CLARENBURG, R. (1992): Physical chemistry of domestic animals. Mosby Year Book, St. Louis, pp. 154-331.
- COLES, E. H. (1989): Diagnóstico y Patología en Veterinaria. Interamericana, Mexico, pp. 207-221.
- FEDDE, M. R. – PIESCHL, R. L. (1995): Extreme derangements of acid-base balance in exercise: advantages and limitations of the Stewart analysis. *Can. J. Appl. Physiol.*, 20 (3), 369-379.
- FENCL, V. – LEITH, V. E. (1993): Frontiers in respiratory physiology: Stewart's quantitative acid-base chemistry: applications in biology and medicine. *Resp. Physiol.*, 91, 1-16.
- FIGGE, J. – ROSSING, T. H. – FENCL, V. (1991): The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J. Lab. Clin. Med.*, 117, 453-467.
- HENSHAW, C. J. (1995): Serum protein concentrations in chronic ill thrift conditions of adult sheep. *Sheep. Vet. Soc.*, 75-78.
- HERDT, T. H. (1988): Fuel homeostasis in the ruminant. *Vet. Clin. North. Am.: Food Anim. Pract.*, 4 (2), 213-231.
- INSTRUMENTATION LABORATORY (1991): Operator's Manual. Milan.
- KOWALCHUCK, J. M. – SCHEUERMANN, B. W. (1994): Acid-base regulation: a comparison of quantitative methods. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 72 (7), 818-826.
- PIERAGOSTINI, E. F. – PETAZZI, F. – DARIO, C. – SATRIANI, A. (1991): Proteine totale sieriche e protidogramma nella pecora leccese. In: Atti della Federazione Mediterranea de Sanità e Produzione de Rumianti, pp. 187-193.
- PRUDEN, E. L. – SIGGAARD-ANDERSEN, O. – TIETZ, N. W. (1994): Blood gases and pH. In: BURTIS, C. A. – ASHWOOD, E. R. (eds.): Textbook of clinical chemistry. Philadelphia, WB Saunders Company, 1375-1410.

STEWART, P. A. (1981): Modern quantitative acid-base chemistry. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 61, 1444–1461.  
SZENCI, O. – TAVERNE, M. A. M. – BAKONY, S. – ERKÓDI, A. (1988): Comparison between pre- and postnatal acid-base status of calves and their perinatal mortality. *Vet. Quart.*, 10 (2), 140–144.  
TASKER, J. B. (1980): Fluids, electrolytes and acid-base balance. In: KANEKO, J. J. (ed.): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Orlando, Academic Press, pp. 402–444.  
TIETZ, N. W. – SIGGAARD-ANDERSEN, O. – PRUDEN, E. L. (1994): Acid-base balance and acid-base disorders. In:

BURTIS, C. A. – ASHWOOD, E. R. (ed.): *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia, WB Saunders Company, pp. 1412–1448.

WHITEHAIR, K. A. – HASKINS, S. C. – WHITEHAIR, J. G. – PASCOE, P. J. (1995): Clinical applications of quantitative acid-base chemistry. *J. Vet. Int. Med.*, 9, 1–11.

WILLIAMS, B. (1994): *Biostatistics: concepts and applications for biologists*. London, Chapman and Hall.

Received: 97–06–27

Accepted after corrections: 97–10–27

---

*Contact Address:*

DVM PhD Cristina Castillo, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España  
Fax: (34)82 25 21 95, e-mail: avebus@correo.lugo.usc.es

---

VERANSTALTUNGSZENTRUM ST. PÖLTEN

# Vet<sup>e</sup>rinaria

Ordermesse für  
Tiermedizin & Zubehör

28.-29. März '98

täglich von 10 - 17 Uhr

Änderungen vorbehalten

**VAZ** ST. PÖLTEN



VAZ ST. PÖLTEN

... da tut sich was!

A-3100 St.Pölten, Kelsengasse 9, Tel: (+43) 27 42/71400/3700, Fax: (+43) 27 42/71398

## POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurziv, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelkem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimitované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měřových jednotek SI.

**Rukopis** má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitá mezera). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořizovanou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

**Název práce** (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů a musí dát přesnou představu o obsahu práce. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

**Krátký souhrn (Abstrakt)** musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo v práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě.

**Rozšířený souhrn** prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné jej (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

**Literární přehled** má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Tato úvodní část přináší také informaci, proč byla práce provedena.

**Metoda** se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál a způsob hodnocení výsledků.

**Výsledky** tvoří hlavní část práce a při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

**Diskuse** obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostatcích a výsledky se konfrontují s údaji publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitulu spolu s výsledky.

**Literatura** citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů.

**Klíčová slova** mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich ovlivnění apod. Jako klíčová slova není vhodné používat termíny uvedené v nadpisu práce.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper. The editors accept papers approved to print by the head of the workplace or papers with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

**Manuscript** should be typed on standard paper (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The title of the paper shall not exceed 85 strokes and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

**Abstract.** It must present information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes and comprise base numerical data including statistical data.

**Introduction** has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

**Review of literature** should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

**Discussion** contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

**References** in the manuscript are given in form of citations of the author's name and year of publication. A list of references should contain publications cited in the manuscript only. References are listed alphabetically by the first author's name.

**Key words** should make it possible to retrieve the paper on the basis of the animal species investigated, characteristics of their health, husbandry conditions, applied substances, etc. The terms used in the paper title should not be used as keywords.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number, or e-mail.

# VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 43, No. 1, January 1998

## CONTENTS

Lehocký J., Nagy O., Kováč G.: Lysine-salicylate based antipyretic in clinical and laboratory evaluation of tolerance in calves.....	1
Trebichavský I., Valíček L.: Immunoreactivity of interleukin-8 and absence of interferon-alpha in porcine bronchoalveolar lavage cells infected with PRRS virus (in English).....	7
Alexa P., Salajka E., Hamřík J., Žižlavský M.: Oedema disease of swine: formation of antibodies neutralizing Shigella-like toxin IIv in piglets immunized with the toxoid SLTII (in English).....	11
Raszyk J., Ulrich R., Gajdůšková V., Salava J., Palác J.: Occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on pig and cattle farms.....	17
Castillo C., García-Partida P., Hernández J., Benedito J. L.: Applications of Fencel's equations in the acid-base balance changes related to pregnancy on ewe (in English).....	27
INFORMATION	
Hruška K.: Civil Corporation BIOTREND.....	16

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 43, č. 1, Leden 1998

## OBSAH

Lehocký J., Nagy O., Kováč G.: Antipyretikum na báze lyzín-salicylátu v klinickom a laboratórnem hodnotení znášanlivosti u teliat.....	1
Trebichavský I., Valíček L.: Imunoreaktivita interleukinu-8 a nepřítomnost interferonu alfa v prasečích buňkách bronchoalveolárních laváží infikovaných virem PRRS.....	7
Alexa P., Salajka E., Hamřík J., Žižlavský M.: Edémová nemoc prasat: protilátky neutralizující Shigella-like toxin IIv po imunizaci toxoidem SLTII.....	11
Raszyk J., Ulrich R., Gajdůšková V., Salava J., Palác J.: Výskyt karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) na farmách prasat a skotu.....	17
Castillo C., García-Partida P., Hernández J., Benedito J. L.: Použití Fenclových rovnic u změn acidobazické rovnováhy ve vztahu k březosti u bahnic.....	27
INFORMACE	
Hruška K.: Občanské sdružení BIOTREND.....	16

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1998

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha 2