ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

7. října 1999
Ústav zemědělských a potravinářských informací
Ústřední zemědělská a lesnická knihovna
Slezská 7, 120 56 Praha 2

10

VOLUME 44
PRAHA
OCTOBER 1999
ISSN 0375-8427

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

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

VETERINARY MEDICINE – CZECH

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 Hofírek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic
Prof. MUDr. Drahomír Horký, 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 Biological 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., Jílové 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 44 vychází v roce 1999.

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, Česká republika. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory jsou v redakci a na URL adrese http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm.

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 1999 je 696 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 44 appearing in 1999.

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, Czech Republic. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Detailed instructions for authors are available in the editorial office and at URL address http://www.clark.cz/vri/Pokynya.htm.

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 1999 is 159 USD (Europe), 167 USD (overseas).

© Institute of Agricultural and Food Information, Prague 1999

F 4884

CIRCULATION OF PORCINE REPRODUCTIVE AND RESPIRATORY SYNDROME VIRUS IN SWINE HERDS IN THE CZECH REPUBLIC*

CIRKULACE VIRU REPRODUKČNÍHO A RESPIRAČNÍHO SYNDROMU PRASAT V CHOVECH PRASAT V ČESKÉ REPUBLICE

L. Valíček, I. Pšikal, B. Šmíd, S. Indik, L. Rodák, E. Kosinová

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) was identified as the cause of health disorders in sows and losses in newborn piglets in three herds in 1998. In the herd B, the infection resulted in a marked decrease of pregnancy rate, and in the herds H and D in increased numbers of stillbirths and early deaths of piglets. Demonstration of antibodies to PRRS virus in nine sows of the herd B was followed by demonstration by reverse transcription and polymerase chain reaction of viral RNA in their blood sera as well as in blood sera of two of the twelve tested boars. PRRS virus was isolated in PLM culture from one of the two boars. In the herd H, antibodies to PRRS virus were demonstrated in blood serum of 15 of the 16 tested sows. Viral RNA was demonstrated in blood serum of two sows and in lung tissue of two dying piglets and two piglets killed soon after birth. PRRS virus was isolated in PLM culture from the lung suspension of one piglet. In the herd D, viral RNA was demonstrated in blood serum of four sows and three piglets aged 2 to 5 days. PRRS virus was isolated in PLM cultures from blood serum of one of the sows and lung tissue samples of two piglets. The results are an evidence that, following the first detection of PRRS in the Czech Republic in 1995, the causative virus circulated in swine herds and induced clinical disease in some swine herds in 1998.

swine; PRRS virus; antibodies; RT-PCR; virus isolation; PLM cultures

ABSTRAKT: Ve třech užitkových chovech prasat byl v roce 1998 identifikován jako původce zdravotních poruch prasnic a ztrát selat po narození virus PRRS. V prvním chovu (B) došlo k výraznému poklesu zabřezávání prasnic a v dalších dvou chovech (H a D) se infekce klinicky manifestovala zvýšenými úhyny selat brzy po narození spolu s vyššími počty mrtvě narozených selat. Po průkazu protilátek proti viru PRRS u devíti prasnic v prvním chovu (B) byla v séru všech prasnic prokázána metodou RT-PCR také virová RNK. Ve stejném chovu byla virová RNK prokázána také v séru dvou z dvanácti kanců, používaných k přirozené plemenitbě a navíc byl ze séra jednoho kance virus ještě izolován na buněčné kultuře PPM. V druhém chovu (H) byla po průkazu virově specifických protilátek u patnácti ze 16 vyšetřených prasnic prokázána virová RNK v séru dvou prasnic a dále v plicní suspenzi dvou uhynulých a dvou po narození utracených selat. Z plicní suspenze jednoho selete byl virus ještě izolován na buněčné kultuře PPM. Ve třetím chovu (D) byla virová RNK prokázána v séru čtyř prasnic a ze séra jedné z těchto prasnic byl virus izolován ještě na buněčných kulturách PPM. Dále byla virová RNK zjištěna metodou RT-PCR v séru tří selat a následně byl ze dvou těchto selat virus také izolován na buněčných kulturách PPM. Výsledky prokázaly, že po prvním zjištění viru PRRS v našich chovech v roce 1995 virus stále cirkuluje v řadě chovů prasat a v některých může být příčinou zdravotních poruch a ekonomických ztrát.

prasata; virus PRRS; protilátky; RT-PCR; izolace viru; buněčné kultury PPM

INTRODUCTION

Viral aetiology of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) was demonstrated for the first time in 1991 by Dutch authors who succeeded in the isolation of the causative agent in cell cultures (Wensvoort et al., 1991). In the Czech Republic (CR), the research of this emerging infection was initiated in 1995 and the first outbreak was confirmed not only serologically, but also by direct demonstration of the causative agent by reverse transcription followed by polymerase chain reaction (RT-PCR) in the same year (Valíček et al., 1995, 1996). Several strains of PRRS virus were isolated in CR in cell cultures (Valíček et al., 1997a).

Serological screening for PRRS in breeding herds and artificial insemination (A.I.) centres, in which the State Veterinary Administration of CR, the State Veterinary Institute Jihlava, and the Veterinary Research Institute Brno were involved, was started in 1996. The relatively low number of serologically positive herds (26%) detected in 1997 motivated the implementation of control measures in breeding herds and A.I. centres that were aimed particularly on the protection of healthy herds against introduction of the infection consisting in

* Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. EP 9186).

serological checks of all traded and transported animals. Virological (RT-PCR) examinations were done only in serologically positive animals, because it is known that the virus persists in the host and can be shed even by animals carrying specific antibodies (Meredith, 1995). In breeding boars, the virus can be present in semen (Swenson et al., 1994); therefore virological examinations of blood sera, done during the control of the infection in CR were in some boars completed by examination of semen samples. Partial results of the examinations of breeding boars have already been published (Valíček et al., 1997b), but investigations in selected A.I. centres are ongoing.

Although the control measures imposed in breeding herds and A.I. centres were updated by implementation of new diagnostic methods, they could only limit and slow the spread of infection. Numerous investigations carried out in the Czech Republic in 1998 confirmed continuing circulation of PRRS virus in some swine herds. Although the current course of the infection in the Czech Republic differs from the pattern observed during severe epizooties that caused serious economic losses in the USA in 1987 and in West European countries in 1990–1991 (Goyal, 1993), PRRS virus still causes reproductive disorders in sows and increases losses of piglets in some swine herds, as documented in this paper.

MATERIAL AND METHODS

Characteristics of tested herds

Etiologic investigations were done in several swine herds affected by health disorders in sows and increased death rates in piglets in 1998. PRRS virus was demonstrated in and isolated from three commercial herds characterised as follows:

Herd B is a herd with 380 sows. A marked impairment of fertility, manifested by a sharp decrease of non-return rate after 1st breeding from 90% in 1996 down to 56% in a certain period of 1997, was recorded in sows and gilts. The females were mated by 12 boars. Blood sera of 9 sows with impaired fertility were tested for antibodies to PRRS virus and by RT-PCR in 1998 (Tab. I). The same examinations were done in all the boars (Tab. II). Blood serum of the boar No. 5669, that was positive for viral RNA by RT-PCR, was also used as source material for an attempt to isolate PRRS virus in cultures of porcine lung macrophages (PLM).

Herd H is a commercial herd with 120 sows in which the number of stillbirths and of piglets dying soon after birth increased markedly in December 1997 and January 1998. The females were artificially inseminated with semen supplied by the A.I. centre R. Sixteen

I. Herd B: Serological and virological tests of sows

Serial No.	Sow No.	Sampling date	Antibodies (ELISA)*	Virus** RT-PCR
1.	8 754	20. 1. 1998	++	+
2.	7 647	20. 1. 1998	++	+
3.	9 242	20. 1. 1998	++	+
4.	8 698	20. 1. 1998	++	+
5.	8 812	20. 1. 1998	++	+
6.	7 465	20. 1. 1998	++	+
7.	9 219	20. 1. 1998	++	+
8.	8 721	20. 1. 1998	++	+
9.	7 969	20. 1. 1998	++	+

* = PRRS IgG ELISA (TEST-Line, Ltd.)
** = demonstration of viral RNA by RT-PCR
\+ = net absorbance (NA) 0.2–1
++ = NA 1.1–2

II. Herd B: Tests of blood sera of boars for antibodies to PRRS virus and demonstration of viral RNA by RT-PCR

Serial No.	Boar No.	Arrival date	Sampling date	Antibodies (ELISA)*	Virus	
					RT-PCR**	Isolation (PLM▲)
1.	5 669	18. 5. 1995	30. 1. 1998	+	+	+
2.	1 479	14. 7. 1995	30. 1. 1998	neg	neg	N
3.	2 499	23. 2. 1995	30. 1. 1998	+	neg	N
4.	3 010	22. 3. 1996	30. 1. 1998	++	neg	N
5.	617	11. 7. 1996	30. 1. 1998	++	neg	N
6.	4 504	6. 3. 1997	30. 1. 1998	+	+	N
7.	4 947	20. 7. 1997	30. 1. 1998	++	neg	N
8.	4 936	20. 7. 1997	30. 1. 1998	++	neg	N
9.	5 364	23. 9. 1997	30. 1. 1998	+	neg	N
10.	5 269	23. 9. 1997	30. 1. 1998	+	neg	N
11.	5 713	6. 2. 1997	30. 1. 1998	++	neg	N
12.	5 843	16. 12. 1997	30. 1. 1998	+	neg	N

* = PRRS IgG ELISA (TEST-Line, Ltd.)
** = virus demonstration by RT-PCR
\+ = net absorbance (NA) 0.2 to 1
++ = NA 1.1–2
▲ = in culture of porcine lung macrophages
neg = negative
N = not done

III. Herd H: Serological and virological tests of sows

Serial No.	Sow No.	Date of parturition	Number of piglets		Blood sampling[b]	Blood serum	
			total	dying		(ELISA)*	RT-PCR
1.	30	1. 11. 1997	15	7	108	++	N++
2.	272	4. 2. 1997	15	2	105	+	N
3.	68	10. 2. 1997	7	0	99	++	N
4.	23	11. 12. 1997	10	3	68	++	N
5.	81	28. 12. 1997	9	3	51	++	N
6.	9	31. 12. 1997	11	2	48	++	N
7.	83	3. 1. 1997	14	3	45	++	N
8.	57	8. 1. 1998	10	1	40	++	N
9.	162	18. 1. 1998	11	1	25	+++	N
10.	65	20. 1. 1998	13	8	23	+++	N
11.	67	21. 1. 1998	10	4	22	+	N
12.	55	23. 1. 1998	9	1	20	+	N
13.	51	27. 1. 1998	14	2	21	neg	N
14.	41	30. 1. 1998	9	3	13	+++	N
15.	74	10. 2. 1998	12	3	7	++	+
16.	73	12. 2. 1998	11	7	5	++	+

* = PRRS IgG ELISA (TEST-Line, Ltd.)
\+ = net absorbance (NA) 0.2 to 1
++ = NA 1.1–2
+++ = NA > 2
b = days after birth
neg = negative
N++ = not done

IV. Herd D: Serological and virological tests of sows

Serial No.	Sow No.	Number of piglets		Antibodies (ELISA)**	Virus in blood serum	
		born	reared		RT-PCR	Isolation (PLM)
1.	*	–		+	N	N
2.	*	–		+	N	N
3.	*	–		+	N	N
4.	*	–		+	N	N
5.	*	–		+	N	N
6.	*	–		+	N	N
7.	571	12	8	+	+	N
8.	417	11	9	+	+	+
9.	608	11	5	+	+	N
10.	519	11	?	+	+	N
11.	747	12	10	++	N	N
12.	597	7	0	+	N	N
13.	601	11	3	+	N	N

* = gilts 3 days after introduction in herd
** = PRRS IgG ELISA (TEST-Line, Ltd.)
PLM = cultures of porcine lung macrophages
N = not done
\+ = net absorbance(NA) 0.2–1
++ = NA 1.1–2
+++ = NA > 2

sows giving birth to litters with increased early death rates were tested for antibodies to PRRS in the second half of February. Blood serum samples collected from two of them (Nos. 73 and 74) on post-partum days 7 and 5, respectively, were also tested by RT-PCR (Tab. III). The serological and virological examinations were also done in 2 piglets immediately after death and another 2 piglets killed *in extremis*. Lungs of the piglets were used to prepare 10% suspensions in Eagle medium supplemented with antibiotics. Sediments of the suspensions were tested by RT-PCR and the suspensions were also used as inoculum in attempts to isolate PRRS virus in cultures of PLM.

Herd D is a herd with 220 sows. Health problems, characterised by an increase of early death rate and in some litters also by an increase of the number of still-

V. Herd "D": Tests of piglets aged 2 or 5 days

Serial No.	Born by sows No.*	Blood serum		PLM** RT-PCR	Isolation in PLM
		Antibodies (ELISA)	Virus RT-PCR		
1	747	+	+	N	N
2	601	+	+	N	+
3	597	++	+	+	+

* see Tab. IV
** = demonstration of viral RNA in porcine lung macrophages
N = not done

born piglets, became apparent in mid May 1998. Death losses reached 40% in July 1998. In the first examination, done in the same month, blood sera collected from ten sows were tested for antibodies to PRRS virus and four of them also by RT-PCR (Tab. IV). Another three sows were tested serologically after parturition and one piglet was collected from each of the three litters. Two 2-day-old piglets (Nos. 1 and 2) and one 5-day-old piglet (No. 3) were tested serologically and by RT-PCR. Moreover, PLM were obtained by pulmonary lavage from the 5-day-old piglet. The cells were cultured in the RPMI medium supplemented with 10% bovine foetal serum for four days; then the suspension was frozen-thawed for RT-PCR and also used in attempts to isolate PRRS virus in cultures of PLM (Tab. V). Serological tests were also done in the 7 boars used for mating.

Laboratory examinations

Serology

Antibodies to PRRS virus were assayed by ELISA using sets supplied by TEST-Line, Ltd, Brno (PRRS IgG ELISA kit). The results were interpreted as recommended by the manufacturer. Absorbance was measured at 450 nm and the results were expressed in terms of net absorbance (NA), i.e. difference in absorbance between the wells containing the viral and the control antigens, respectively.

Virus isolation

PLM cultures obtained by pulmonary lavage from piglets suspected of PRRS (Šmíd et al., 1976), or from healthy piglets aged 3 to 4 weeks and free of antibodies to PRRS were used in virus isolation attempts. PLM were cultured in the RPMI-1640 medium supplemented with antibiotics (400 IU penicillin, 0.4 mg streptomycin per 1 ml) and 10% bovine foetal serum.

RT-PCR

The technique of RT-PCR described in detail elsewhere (Valíček et al., 1996, 1997) was used for the demonstration of the ORF7 part of the PRRS virus genome in porcine blood sera, lung tissue suspensions and PLM cultures.

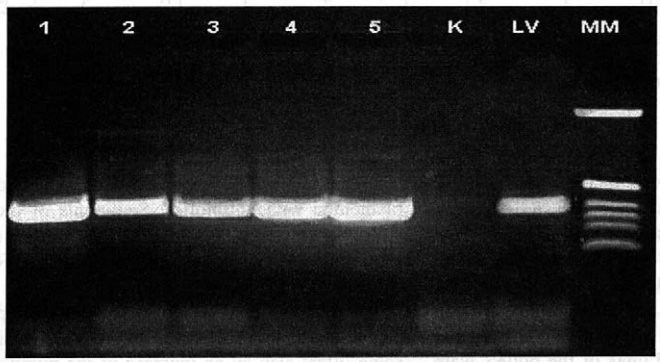
Indirect fluorescent antibody test (IFA)

Virus antigen was demonstrated in PLM cultures also by IFA. The cells were incubated for 12 to 72 h and fixed with cold acetone for 10 min. Then PRRS-positive porcine blood serum diluted 1 : 10 was added and the cells were incubated at 37 °C for another 45 min. Fluorescein-conjugated rabbit anti-porcine IgG was added after washing with phosphate buffered saline, pH 7.2, and the cells were incubated for another 45 min. Then the cells were washed again and viewed with a fluorescent microscope (Valíček et al., 1997).

RESULTS

Herd B

Antibodies to PRRS virus were demonstrated by ELISA in all the nine tested sows showing reproductive disorders (Tab. I). All the sera were also positive for viral RNA detected by RT-PCR. The search for possible sources of the infection included also examination



1. Virus isolation in PLM and demonstration of viral RNA by RT-PCR

MM = molecular standard pBR 322/Hinf I
LV = reference strain Lelystad
K = negative control
1–3 = herd D (1 = PLM from piglet No. 3;
2 = blood serum of piglet No. 2;
3 = blood serum of sow No. 417
4 = blood serum of boar No. 5669, herd B
5 = lung suspension of piglet No. 2, herd H

of all the 12 boars used for mating and living in the herd for various periods. Antibodies to PRRS were demonstrated in 11 boars and viral RNK in 2 of them (Tab. II). PRRS virus was demonstrated in the second passage of a PLM culture inoculated with blood serum of the boar No. 5669. The isolate was identified by RT-PCR (Fig. 1) and IFA. Electrophoresis in agarose gel identified a PCR product identical in size (394 bp) with that of the European reference strain Lelystad and of the products of further four strains isolated in the herds H and D.

Herd H

Antibodies to PRRS virus were demonstrated in blood sera of 15 of the 16 sows tested in February 1998 because of the high early death rates in their litters (Tab. III). Viral RNA was demonstrated in blood serum of two of them (Nos. 74 and 73) sampled 7 and 5 days after parturition, respectively. Moreover, four piglets, born by a sow other than those shown in Tab. III, were examined. Two of them were stillborn and two were killed *in extremis*. Viral RNA was demonstrated by RT-PCR in lung tissue samples of all the four piglets and PRRS virus was demonstrated in the third passage of the PLM culture inoculated with a lung suspension of one of the killed piglets. The isolate induced marked CPE in PLM cultures 48 h after inoculation and its identity was confirmed by RT-PCR (Fig. 1) and IFA.

Herd D

Increased early death rate and a high number of stillbirths were observed in this herd in May 1998. Serological examination of six gilts purchased from another farm and seven sows born in the herd revealed antibodies to PRRS in all of them (Tab. IV). Viral RNA was demonstrated in blood serum in four (Nos. 571, 417, 608, 519) of the seven sows. Moreover, PRRS virus was isolated in 1st passage of PLM from the sow No. 417 that yielded positive RT-PCR. The identity of the isolate was confirmed by RT-PCR (Fig. 1) and IFA.

Antibodies to PRRS virus and viral RNA were demonstrated in blood sera of the three piglets aged two to five days born by the sows Nos. 597, 601, and 741, respectively (Tab. V). PLM were obtained by lung lavage from the 5-day-old piglet and PRRS virus was isolated in a PLM culture inoculated with this material. The identity of this isolate was confirmed by RT-PCR (Fig. 1) and IFA. Moreover, PRRS virus was isolated from blood serum of the piglet No. 2 killed at the age of 2 days (Tab. V).

Extended serological examinations demonstrated antibodies to PRRS in 52 of the 56 tested sows. On the other hand, the antibodies were demonstrated in only one of the seven boars used in this herd.

DISCUSSION

PRRS was diagnosed in the Czech Republic by serological methods and RT-PCR for the first time in 1995, but the first successful isolation of the causative agent in cultures of PLM dates to 1996 (Valíček et al., 1997a). In addition to the four strains of PRRS isolated within the studies intended to control the spread of the infection, viral RNA was demonstrated in blood sera of 10 serologically positive of the 250 tested boars (Valíček et al., 1997b). In 1997, viral RNA was demonstrated in 150 of the 1 310 blood serum samples collected from sows and boars. RT-PCR was positive in blood serum of 68 and in semen of 7 of the 307 boars tested in 1998 (total positive 24.4%). PRRS virus was demonstrated in 13 of the 35 tested herds (Pšikal et al., unpublished data). The RT-PCR was based on the amplification of the conserved part of the ORF7 genome encoding viral nucleoprotein. Agarose gel identified 394 bp PCR products in all the positive blood sera and semen samples as well as in all the five new isolates. The size of the PCR products corresponded to that of the European reference strain Lelystad and agreed with our previous results (Valíček et al., 1996, 1997a). The rather high number of virologically positive animals is an alarming evidence that the virus is widespread and persists for long periods in swine herds. Viraemia in young animals was reported to last as long as 8 weeks (Rossow et al., 1998), and the virus was isolated from semen and from oropharyngeal swabs up to 92 and 157 days after infection, respectively (Christopher-Hennings et al., 1995; Wills et al., 1997).

In 1998, we succeeded not only in the demonstration of PRRS viral RNA by RT-PCR, but also in repeated isolations of virus in PLM cultures from three herds. In the herd B, that was affected by a low pregnancy rate, the virus was isolated from blood serum of a PCR-positive boar. The isolation was successful as late as several months after the onset of signs of infertility at a time when the low pregnancy rate rate approached again the average for the previous years.

In the herds H and D, PRRS was manifested by a high neonatal death rate in piglets. The demonstration of specific virus antibodies by ELISA and of the viral RNA by RT-PCR was followed by virus isolation in cultures of PLM. The virus was isolated from blood serum of a sow and a piglet and from lung tissue collected from another two piglets. This isolation from the three piglets, killed immediately after birth and at the age of 2 and 5 days respectively, has confirmed viral aetiology of the losses and transplacental transmission of the causative agent reported earlier by Mengeling et al. (1994). The monitoring is continued and the efficacy of immunisation of gilts purchased from other herds and sows after parturition with a live attenuated vaccine is being tested in the herd D.

Positive results of the serological and virological examinations in swine herds have demonstrated that

PRRS virus was circulating in local swine herds and it was a cause of clinically inapparent infections and in some cases induced health disorders associated with economic losses.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Wensvoort for the supply of the reference strain Lelystad, Mrs. J. Mikulská for her technical assistance, and MVDr. P. Obrdlík, MVDr. Z. Morávek, MVDr. J. Vašák, and Ing. M. Široký for their help in sample collection.

REFERENCES

Goyal S. M. (1993): Porcine reproductive and respiratory syndrome. J. Vet. Diagn. Invest., *5*, 656–664.

Christopher-Hennings J., Nelson E. A., Hines R. J., Nelson J. K., Swenson S. L., Zimmerman J. J., Chase C. L., Yaeger M. J., Benfield D. A. (1995): Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. J. Vet. Diagn. Invest., *7*, 456–464.

Mengeling W. L., Lager K. L., Vorwald A. C. (1994): Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. Am. J. Vet. Res., *55*, 1391–1398.

Meredith M. S. (1995): Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). 1. European edition. Cambridge, Pig Disease and Information Centre.

Rossow K. D. (1998): Porcine reproductive and respiratory syndrome. (Review article.) Vet. Pathol., *35*, 1–20.

Swenson S. L., Hill H. T., Zimmerman J. J., Evans L. E., Landgraf-Wills, R. W., Sanderson T. P., McGinley M. J., Brevik A. K., Ciszewski D. K., Frey M. L. (1994): Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. J. Am. Vet. Med. Assoc., *204*, 1943–1948.

Šmíd B., Valíček L., Menšík J. (1976): Získávání prasečích plicních makrofágů pro kultivaci prasečího cytomegaloviru. Vet. Med. (Praha), *21*, 589–595.

Valíček L., Pšikal I., Šmíd B., Rodák L., Kubalíková R. (1995): First detection of PRRS in the Czech Republic. In: Abstr. 2nd Int. Symp. PRRS. Copenhagen, Denmark, p. 46.

Valíček L., Pšikal I., Barták P., Kubalíková R., Kosinová E., Šmíd B. (1996): Detection and epidemiology of PRRS in the Czech Republic. In: Proc. 14th IPVS Congr., Bologna, Italy, p. 87.

Valíček L., Pšikal I., Šmíd B., Rodák L., Kubalíková R., Kosinová E. (1997a): Isolation and identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures. Vet. Med. – Czech, *42*, 281–287

Valíček L., Pšikal I., Barták P., Kubalíková R., Kosinová E., Šmíd B., Rodák L. (1997b): Reprodukční a respirační syndrom prasat (PRRS). Úloha kanců v přenosu viru. Veterinářství, *47*, 158–160.

Wensvoort G., Terpstra C., Pol J. M. A., Laak E. A., Loemraad M., De Kluyver E. P., Kragten C., VanBuiten L., Den Besten A., Wagenaar F., Broekhuijsen J. M., Moonen P. L. J. M., Zetstra T., De Boer E. A., Tibben H. J., De Jong M. F., Vant Veld P., Groenland G. J. R., Van Gennep J. A., Voets M. T., Verheijden J. H. M., Braamskamp J. (1991): Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. Vet. Quart., *13*, 121–130.

Wills R. W., Zimmerman J. J., Yoon K. J., Swenson S. L., McGinley M. J., Hill H. T., Platt K. B., Christopher-Hennings J., Nelson E. A. (1997): Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: a persistent infection. Vet. Microbiol., *55*, 231–240.

Received: 99–05–31
Accepted: 99–06–15

Contact Address:

MVDr. Lubomír Valíček, DrSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: valicek@vri.cz

EVALUATION AND OCCURRENCE OF CARCINOGENIC POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs) IN ANIMAL FEED FACTORIES*

ZHODNOCENÍ VÝSKYTU KARCINOGENNÍCH POLYCYKLICKÝCH AROMATICKÝCH UHLOVODÍKŮ (PAH) VE VÝROBNÁCH KRMNÝCH SMĚSÍ

J. Raszyk[1], R. Ulrich[1], J. Salava[2], J. Palác[2]

[1]*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*
[2]*District Veterinary Administration, Hodonín, Czech Republic*

ABSTRACT: Concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (U.S. EPA priority pollutants PAHs) were studied in sedimented dust (n = 30) collected by an electric vacuum cleaner in two animal feed factories in the district of Hodonín in 1995 and 1996. Dust particles below 0.7 mm were analysed. Seven of the studied PAHs are considered to be 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 (DBahA) and indeno(1,2,3-cd)pyrene (IcdP). The average sum of 16 PAHs for sedimented dust was 752 µg/kg, the average sum of seven carcinogenic PAHs was 110 µg/kg (14.6% of the total sum of 16 PAHs), and average BaP concentration was 11 µg/kg (10% of the total sum of 7 carcinogenic PAHs). Of the carcinogenic PAHs chrysene (35.5 µg/kg), benzo(a)anthracene (20.6 µg/kg) and benzo(b)fluoranthene are prevalent in dust deposits. Of the other studied PAHs phenanthrene (198.5 µg/kg), anthracene (104.8 µg/kg) and pyrene are dominant. Significantly higher levels of the following five carcinogenic PAHs were found in animal feed factory K (n = 15) compared with animal feed factory R (n = 15): BaA (K 30.8 µg/kg; R 10.3 µg/kg; $p < 0.01$), Chry (K 50.2 µg/kg; R 20.8 µg/kg; $p < 0.01$), BbF (K 27.3 µg/kg; R 8.8 µg/kg; $p < 0.05$), BaP (K 15.6 µg/kg; R 5.7 µg/kg; $p < 0.05$), and DBahA (K 5.8 µg/kg; R 3.8 µg/kg; $p < 0.05$). In the other 11 studied PAHs no significant difference was found between the two animal feed factories. It would be desirable: (1) to perform additional detection and identification of the sources of carcinogenic PAHs in the animal feed factories; (2) to elaborate a proposal of hygienic limits of PAHs levels in feedstuffs for farm animals; (3) to offer the data on the levels of carcinogenic PAHs in sedimented dust of animal feed factories to medical service (preventive and occupational medicine). Most probably, this will be the first data obtained on the occurrence of carcinogenic PAHs in animal feed factories.

Hodonín district; animal feed factories; dust depositions; polycyclic aromatic hydrocarbons; carcinogens; sources; legislation; health hazard

ABSTRAKT: V průběhu let 1995 a 1996 byl na okrese Hodonín ve dvou výrobnách krmných směsí (VKS) sledován v sedimentovaném prachu (n = 30), odebraném elektrickým vysavačem z vnitřního zařízení, obsah 16 polycyklických aromatických uhlovodíků (U.S. EPA priority pollutant PAHs). Byly analyzovány prachové částice menší než 0,7 mm. 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 (DBahA) a indeno(1,2,3-cd)pyren (IcdP). V sedimentovaném prachu byla zjištěna průměrná suma 16 PAH 752 µg/kg, průměrná suma sedmi karcinogenních PAH činila 110 µg/kg (14,6 % z celkové sumy 16 PAH) a průměrná hladina BaP byla 11 µg/kg (10 % z celkové sumy sedmi karcinogenních PAH). V sedimentovaném prachu z karcinogenních PAH převládají chrysen (35,5 µg/kg), benzo(a)antracen (20,6 µg/kg) a benzo(b)fluoranten. Z ostatních sledovaných PAH dominují fenantren (198,5 µg/kg), antracen (104,8 µg/kg) a pyren (96,0 µg/kg). Ve VKS K. (n = 15), ve srovnání s VKS R. (n = 15), byly v sedimentovaném prachu zjištěny statisticky významně vyšší hladiny pěti karcinogenních PAH, a to BaA (K.: 30,8 µg/kg; R.: 10,3 µg/kg, $p < 0,01$), Chry (K.: 50,2 µg/kg; R.: 20,8 µg/kg; $p < 0,01$), BbF (K.: 27,3 µg/kg; R.: 8,8 µg/kg; $p < 0,05$), BaP (K.: 15,6 µg/kg; R.: 5,7 µg/kg; $p < 0,05$) a DBahA (K.: 5,8 µg/kg; R.: 3,8 µg/kg; $p < 0,05$). V ostatních 11 sledovaných PAH se dvě sledované VKS statisticky významně neodlišovaly. Je žádoucí: (1) dohledat a identifikovat zdroje karcinogenních PAH ve výrobnách krmných směsí; (2) vypracovat návrh hygienických limitů pro obsah PAH v krmivech pro hospodářská

* Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project RE 5564), the Ministry of Environment of the Czech Republic (Project GA/1650/93) and the Grant Agency of the Czech Republic (Grants No. 525/96/0924 and No. 525/99/0074).

zvířata; (3) předat poznatky o obsahu karcinogenních PAH v sedimentovaném prachu, odebraném ve výrobnách krmných směsí, lékařské službě (preventivní a pracovní lékařství). Pravděpodobně jde o první údaje o výskytu karcinogenních PAH ve výrobnách krmných směsí.

okres Hodonín; výrobny krmných směsí; sedimentovaný prach; polycyklické aromatické uhlovodíky; karcinogeny; zdroje; legislativa; zdravotní riziko

INTRODUCTION

The dynamics of hazardous pollutants in the environment and food chain has been monitored in the Hodonín district for more than 10 years. Part of the district surrounding the city of Hodonín is one of 17 regions with the most impaired environment in the Czech Republic.

In 1997 we evaluated our knowledge of the occurrence of heavy metals, chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in animal feed factories (Raszyk et al., 1997). Later we published the data on the contents of carcinogenic PAHs on pig and cattle farms (Raszyk et al., 1998).

Only very little data are available on the occurrence of PAHs in feedstuffs for farm animals (Dennis et al., 1991; Lusky et al., 1992; Zavadil and Bukovjan, 1998; Raszyk et al., 1998; Podlešáková, 1998).

Hygienic limits for PAHs contents in feedstuffs for farm animals have not yet been defined in the Czech Republic (Regulation No. 194/1996 by which Act No. 91/1996 on feedstuffs is implemented).

To date we have not found any data in the literature on the occurrence of carcinogenic PAHs in animal feed factories.

The object of our study was to assess the occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in dust depositions on indoor equipments of two animal feed factories in Hodonín district during 1995 and 1996.

MATERIAL AND METHODS

The occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons was monitored during 1995 and 1996 in two animal feed factories in the district of Hodonín. Analysis of the samples was performed immediately after their collection in 1995 and 1996 but the processing of results publication was completed as late as in January 1999.

Brief description of the monitored animal feed factories

Animal feed factory K (AFF K) has been in operation since 1975. Every year 47 000 tonnes of feed mixtures are produced, of which 59% is used for pigs, 30% for poultry, 10% for cattle and 1% for other farm and domestic animals.

Animal feed factory R (AFF R) has been in operation since 1967. Its annual production is 36 000 tonnes of feed mixtures, of which 50% is used for pigs, 44% for poultry, 5% for cattle and 1% for other farm and domestic animals.

Both monitored animal feed factories were equipped with similar production technology covering the following processes: intake, grinding, dosing, mixing, checking, granulating, and forwarding. All operations are regulated from a control centre. Hammer crushers and trough blenders (produced in Pardubice, Czech Republic) are used. Feed mixtures are produced in loose or granulated form according to the requirements of the customers. Granulation is produced by steam (and by water in AFF R). Fat adding equipment is used in AFF R only. Imported ingredients (such as soya and fish meal) represent 10 and 17% of feedstuffs used in factories K and R, respectively. 90% of the output of both factories is consumed by farm animals in the district of Hodonín.

Sampling

Samples of dust deposits were collected by an electric vacuum cleaner from the indoor equipments of both animal feed factories (including the production lines). Vacuum cleaner ETA 418 (produced by Elektro Praga, Hlinsko, Czech Republic) with electronic speed control was used. Its suction capacity is characterized as follows: maximum depression – 1 500 mm Vs, maximum volume of sucked air – 27 l/sec. Dust was sucked into a disposable paper bag and then sifted through a 0.7 mm mesh sieve. Dust particles bellow 0.7 mm, which form in average 85% of the total collected dust, were used for analysis. Samples of dust were collected during 1995 and 1996 at approximately 50-day-intervals. Samples from both factories were always taken on the same day. A total of 30 samples of sedimented dust, 15 from each AFF, were examined.

The methods used

The method for qualitative and quantitative determination of 16 PAHs (U.S. EPA priority pollutants PAHs) in feed, drinking water, dust depositions, liquid manure, different soil types and sludge was described in our earlier paper (Raszyk et al., 1998). It included: usability, principle of the method; devices and chemicals; sample adjustment prior to analysis; procedures; conditions of GC-MS determination; conditions of QA/QC and parameters of the method. Therefore we will only briefly summarize: PAHs are extracted from modified samples by dichloromethane, coextracts are separated by gel permeation chromatography and PAHs

residues are detected by GC-MS technique. Gas chromatograph Varian, model 3 400 (Varian, U.S.A.) was used, connected with mass spectrometer Tracker (Finnigan MAT, U.S.A.) and data station with a Magnum System software version 2.4. (Finnigan, U.S.A.).

Evaluation of the results

The programme Stat Plus, version 1.01 (Matoušková et al., 1992) was used for evaluation of the obtained results. The following indices were used in the assessment: number of the examined samples (n), median, average, standard deviation, maximum value, and t-test was used for the assessment of statistical significance.

RESULTS

Contents of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sedimented dust collected in animal feed factories in the district of Hodonín are shown in Tabs. I, II and III. Average sum of 16 PAHs in sedimented dust was 752 μg/kg, average sum of 7 carcinogenic PAHs was 110 μg/kg and average level of BaP was 11 μg/kg. Significantly higher levels of the following five carcinogenic PAHs were found in sedimented dust of the animal feed factory K (n = 15) compared with the factory R (n = 15):

BaA	AFF K	30.8 μg/kg	AFF R	10.3 μg/kg	$p < 0.01$
Chry	AFF K	50.2 μg/kg	AFF R	20.8 μg/kg	$p < 0.01$
BbF	AFF K	27.3 μg/kg	AFF R	8.8 μg/kg	$p < 0.05$
BaP	AFF K	15.6 μg/kg	AFF R	5.7 μg/kg	$p < 0.05$
DBahA	AFF K	5.8 μg/kg	AFF R	3.8 μg/kg	$p < 0.05$

In the other 11 monitored PAHs the difference between the two animal feed factories was not significant.

DISCUSSION

The current vacuum cleaner ETA 418, the specification of which is described in Material and Methods, performed well in collecting dust samples. Similar results were obtained by Colt et al. (1998), who collected dust from carpets in 15 households by two methods – using a high-volume surface sampler (HVS) and a current vacuum cleaner. In the collected dust 26 pesticides, 10 polycyclic aromatic hydrocarbons and 6 PCB congeners were analysed. Data on the contents of the monitored pollutants, obtained by the two above methods, did not significantly differ. Colt et al. (1998) concluded that the use of a current household vacuum cleaner (which was cheap and easy to handle) was suitable for collecting sedimented dust from indoor surfaces, and for subsequent epidemiological research.

Hygienic limits for PAHs contents in feedstuffs have not yet been defined in the Czech Republic. In addition, the data on PAHs occurrence in animal feedstuffs are scarce.

Dennis et al. (1991) made examinations of 27 samples of rape seeds. Average sum of 12 PAHs was 6.0 μg/kg of dry matter. Fluoranthene, pyrene and benzo(a)pyrene are prevalent in rapeseed. Rape oil cake is used predominantly in cattle nutrition, and to a lesser extent for swine.

Lusky et al. (1992) monitored the levels of benzo(a)pyrene (BaP) in feeds from a region with PAHs burden (industrial area) and from an unpolluted area. They examined a total of 60 feed samples (cereals, roughages). Higher PAHs levels in feeds were recorded in the polluted area. BaP levels in feeds from this area were in the range 0.05–0.60 μg/kg of dry matter, 0.20–1.20 μg/kg, 0.10–1.20 μg/kg, and 0.10–4.20 μg/kg of dry matter in cereals, green fodder, silage, hay and straw, respectively.

Zavadil and Bukovjan (1998) evaluated the contents of 13 PAHs in hay collected from a locality flooded by the river Labe and from an unflooded locality. The authors did not mention the number of examined samples and PAH levels in hay. They only noted that hay from the flooded area contained more benzo(k)fluoranthene. However, hay from the unflooded area was more contaminated with most of the monitored PAHs.

Raszyk et al. (1998) examined 12 samples of feedstuffs for cattle and swine and recorded the contents of 16 PAHs. In feeds collected on farm in the district of Hodonín the average sum of 16 PAHs was 208.0 μg/kg; the average sum of 7 carcinogenic PAHs was 7.0 μg/kg and the average sum of benzo(a)pyrene was lower than 0.1 μg/kg. Of the 16 monitored PAHs phenanthrene, anthracene and pyrene were prevalent in feeds.

Podlešáková (1998) evaluated the contents of 12 PAHs in unspecified fodder plants collected in the Central Bohemian region. She examined a total of 83 fodder plant samples from three districts of the above region. The sum of 12 examined PAHs ranged between 36 and 76 μg/kg. The average content of benzo(a)pyrene in fodder plants ranged between 1.0 and 1.6 μg/kg. Phenanthrene, benzo(g,h,i)perylene and chrysene were the most widely represented in fodder plants of the 12 monitored PAHs.

The above mentioned facts suggest that different PAHs are dominant in feeds of plant origin collected in different regions.

Groups of PAHs from different types of environmental samples characterized by alkylated homologues, prevalence of low or high-molecular PAHs or ratios of selected pairs of PAHs can be used for differentiation of major PAHs sources (Štaffová et al., 1998).

Atmospheric fall-out of dust particles (on which PAHs are bound) on plants in the vegetative period is considered to be the major contamination source of feeds of plant origin. Our findings also support this fact. The highest total sum of 16 PAHs in feeds (1 091 μg/kg) was found in lucerne hay harvested from a field in the vicinity of a thermal power plant at Hodonín, where lignite and brown coal are used as a fuel (Raszyk et al., 1998). Coal-fired power stations in the Czech Republic especially those which burn brown coal and lignite con-

I. Concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (μg/kg)) in dust depositions (n = 30) sampled from the indoor equipment of two animal feed factories in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyte	Median	Average	Standard deviation	Minimum	Maximum
Na	4.5	29.4	57.2	2.3	218.0
Acy	5.0	3.6	2.1	0.1	5.0
Ace	6.5	35.9	69.3	0.4	329.0
Fl	16.8	36.7	46.1	0.4	208.0
Phe	177.5	198.5	153.1	5.0	556.0
An	63.1	104.8	110.0	5.0	399.5
Fa	117.5	123.2	96.0	0.2	335.0
Pyr	61.8	96.0	118.5	5.0	570.0
BaA*	16.1	20.6	24.2	0.2	107.0
Chry*	31.5	35.5	31.4	0.2	124.0
BbF*	7.0	18.1	24.3	0.3	114.6
BkF*	5.0	8.5	16.0	0.3	90.1
BaP*	5.0	10.6	12.2	0.3	49.2
DBahA*	4.9	4.8	3.4	0.5	17.0
BghiP	5.1	13.7	16.4	0.5	62.6
IcdP*	5.2	12.3	15.3	0.5	63.0

Symbols and abbreviations used for Tabs. I, II and III:
* animal carcinogens

Na = naphthalene	Phe = phenanthrene	BaA = benzo(a)anthracene	BaP = benzo(a)pyrene
Acy = acenaphthylene	An = anthracene	Chry = chrysene	DBahA = dibenzo(a,h)anthracene
Ace = acenaphthene	Fa = fluoranthene	BbF = benzo(b)fluoranthene	BghiP = benzo(g,h,i)perylene
Fl = fluorene	Pyr = pyrene	BkF = benzo(k)fluoranthene	IcdP = indeno(1,2,3-cd)pyrene

II. Concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (μg/kg) in dust depositions (n = 15) sampled from the indoor equipment of animal feed factory K. in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyte	Median	Average	Standard deviation	Minimum	Maximum
Na	5.0	44.7	76.9	3.1	218.0
Acy	4.8	3.5	2.1	0.1	5.0
Ace	5.5	23.9	39.1	0.9	117.0
Fl	14.0	33.6	37.8	0.8	106.0
Phe	194.5	231.4	149.4	44.6	556.0
An	88.5	135.0	124.2	5.0	399.5
Fa	134.0	150.3	91.0	0.2	335.0
Pyr	67.8	86.4	63.2	11.6	259.0
BaA*	24.0	30.8	30.5	0.2	107.0
Chry*	42.0	50.2	34.2	4.1	124.0
BbF*	18.6	27.3	31.2	0.3	114.6
BkF*	5.0	11.6	22.2	0.3	90.1
BaP*	8.2	15.6	15.5	0.3	49.2
DBahA*	4.8	5.8	4.2	0.5	17.0
BghiP	8.2	18.5	21.2	0.5	62.6
IcdP*	12.0	18.6	19.4	0.5	63.0

tribute to the essential PAH sources in the atmosphere (Šrám et al., 1996).

PAHs emitted in the gaseous phase can be absorbed from the atmosphere into the surface tissues of the above-ground plant structures, especially when they contain waxes (Simmleit et al., 1989).

Direct transmission of PAHs from contaminated soil into plants via the root system was found to be negligible (Goodin and Weber, 1995).

However, we do yet not know how other components of feed mixtures (products of animal origin, organic and inorganic substances, supplements and premixes, etc.) are contaminated by PAHs.

According to PAHs levels in sedimented dust from animal feed factories, we can suggest that these locations also produce their own "on-site" PAHs sources (e.g. the use of asphalt as an insulating and jointing material, wood preservation substances, car transporta-

III. Concentrations of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons (μg/kg)) in dust depositions (n = 15) sampled from the indoor equipment of animal feed factory R in Hodonín district in 1995 and 1996

Analyte	Median	Average	Standard deviation	Minimum	Maximum
Na	5.0	14.1	19.2	2.3	68.0
Acy	4.9	3.7	2.1	0.2	5.0
Ace	10.3	47.8	90.1	0.4	329.0
Fl	16.5	39.9	54.4	0.4	208.0
Phe	127.0	165.5	154.6	5.0	492.0
An	33.6	74.7	87.7	5.0	304.0
Fa	52.1	96.2	96.1	0.2	318.0
Pyr	36.7	105.6	157.8	5.0	570.0
BaA*	7.2	10.3	7.5	0.2	25.0
Chry*	10.6	20.8	20.3	0.2	66.0
BbF*	5.0	8.8	7.0	0.3	24.0
BkF*	5.2	5.4	3.8	0.3	15.6
BaP*	4.9	5.7	3.9	0.3	13.0
DBahA*	4.8	3.8	1.9	0.5	5.0
BghiP	5.4	8.9	9.7	0.5	38.0
IcdP*	5.1	6.1	3.7	0.5	12.0

tion of feed mixture components into the factory and forwarding of the produced feeds, emissions formed at combustion of coal in the animal feed factories, etc.).

Comparison made between the data on the contents of 16 PAHs in sedimented dust from animal feed factories (752 μg/kg) and the data on PAHs in stable sedimented dust (2 148 μg/kg) and road sedimented dust (13 143 μg/kg) on pig and cattle farm (Raszyk et al., 1998) shows that average PAHs concentrations are at the ratio 1 : 3 : 17. Major sources of PAHs in stable and road sedimented dust are mentioned in our previous paper (Raszyk et al., 1998).

No data on the contents of carcinogenic PAHs in animal feed factories have been found in the literature to date. Most probably this is the first paper on the subject.

Data on the contents of carcinogenic PAHs in animal feed factories can be also used by medical services (preventive and occupational medicine). However, the relationship between PAHs contents in sedimented dust and the environment of animal feed factories remains to be elucidated. Dust particles below 2.5 μm, present in the indoor air, on which PAHs are predominantly bound, deserve particular attention (Šrám, 1998).

The data published by Binková et al. (1998) have allowed us to assess the relationship between the amount of PAH in dust particles inhaled by people living in the North Bohemian region and in the dust particles collected in animal feed factories. It can be concluded from a rough comparison that the content of PAH in the animal feed factories is relatively low and probably insignificant from the point of view of preventive and occupational medicine.

REFERENCES

Binková B., Leníček J., Beneš I., Vidová P., Gajdoš O., Fried M., Šrám R. J. (1998): Genotoxicity of coke-oven and urban air particulate matter in *in vitro* acellular assays coupled with ^{32}P-postlabeling and HPLC analysis of DNA adducts. Mutat. Res., *414*, 77–94.

Colt J. S., Zahm S. H., Camman D. E., Hartke P. (1998): Comparison of pesticides and other compounds in carpet dust samples collected from used vacuum cleaner bags and from a high-volume surface sampler. Environ. Hlth Perspect., *106*, 721–724.

Dennis M. J., Massey R. C., Gripps G., Venn I., Howarth N., Lee G. (1991): Factors affecting the polycyclic aromatic hydrocarbon content of cereals, fats and other food products. Food Addit. Contam., *8*, 517–530.

Goodin J. D., Webber M. D. (1995): Persistence and fate of anthracene and benzo(a)pyrene in municipal sludge treated soil. J. Environ. Qual., *24*, 271–278.

Matoušková O., Chalupa J., Cigler M., Hruška K. (1992): STAT-Plus Manual (in Czech). Brno, Veterinary Research Institute. 168 pp.

Lusky K., Stoyke M., Henke G. (1992): Untersuchungen zum Vorkommen von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstooffen (PAH) im Futter und bei landwirtschaftlichen Nutztieren. Arch. Lebens-Hyg., *43*, 67–68.

Podlešáková E. (1998): Soil and plant contamination in region of Central Bohemia (in Czech). In: Pivoňková A. (ed.): Report on the 1997 monitoring results-hazardous substances within food chains and influencing inputs. Prague, Ministry of Agriculture of the Czech Republic. 25–27.

Raszyk J., Ulrich R., Gajdůšková V., Nápravník A., Salava J., Palác J. (1997): Evaluation of hazardous pollutant occurrence in feed mixture plants (in Czech). Vet. Med. – Czech, *42*, 361–367.

Raszyk J., Ulrich R., Gajdůšková V., Salava J., Palác J. (1998): Occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in pig and cattle farms (in Czech). Vet. Med. – Czech, *43*, 17–25.

Simmleit N., Toth A., Szekely T., Schulten H. R. (1989): Characterization of particles absorbed on plant surfaces. Int. J. Environ. Anal. Chem., *36*, 7–11.

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.

Šrám R. (ed.) (1998): Teplice program II – results 1997 (in Czech). Prague, The Czech Environmental Institute. 112 pp.

Štaffová K., Holoubek I., Kohoutek J. (1998): Sources of air pollution by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Morava river basin (in Czech). Ochr. Ovzd., *10*, 2–16.

Zavadil J., Bukovjan K. (1998): Results of water-quality monitoring in the Elbe river below Pardubice (in Czech). Chem. Listy, *92*, 551–561.

Received: 99–05–31
Accepted after corrections: 99–07–07

Contact Address:

MVDr. Josef Raszyk, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: raszyk@vri.cz

MICROBIAL CONTAMINANTS OF MILK PROCESSED BY HIGH-TEMPERATURE SHORT-TIME PASTEURIZATION

MIKROBIÁLNÍ KONTAMINACE MLÉKA OŠETŘENÉHO ŠETRNOU PASTERACÍ

E. Binderová, D. Ryšánek

Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

ABSTRACT: The aim of the study was to determine whether the high temperature, short-time (next HTST) pasteurization method can be applied in the production of market milk and to assess the effects of this method on milk quality. Samples of raw and pasteurized milk were collected repeatedly from four pasteurization facilities in three dairies using the HTST method of heat processing for the production of curds and cheeses. One part of the samples was processed immediately after their delivery to the laboratory and the other was examined after 5 days of storage at +6 °C. The examinations included the determination of total count, psychrophilic and coliform bacteria, mould, yeast, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* counts and the detection of *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, and *Escherichia coli* serotype O157 : H7. Standard (ISO) methods were used. The rate of bacterial contamination of raw milk intended for HTST pasteurization, expressed in terms of total and coliform bacteria counts, is shown in Tab. IA. It is evident that total bacteria counts considerably exceeded the limits laid down in the EC Regulations No. 46/92 and in recommendations of the Czech Standard ČSN 57 0529. Rather surprising were also the unacceptably high counts of coliform bacteria. The rate of contamination of raw milk by psychrophilic bacteria, moulds and yeasts is shown in Tab. IB. The counts of psychrophilic bacteria exceeded the recommendations of Czech Standard (ČSN 57 0529) several times. The increased counts of mesophilic aerobic, facultatively anaerobic and psychrophilic bacteria in raw milk tested immediately after withdrawal indicate an unsatisfactory sanitation regime and varying hygienic conditions upon milk collection, transport and storage in dairies. No limits for mould and yeast counts have been laid down and therefore the respective data are only illustrative. Tab. IC shows the contamination of raw milk intended for pasteurization by the major causative agents of foodborne infections. Of great importance is particularly the contamination by *Escherichia coli* including the serotype O157 : H7. Salmonellae were undetectable in all the samples under examination. The contamination by the other pathogenic agents cannot be regarded as dangerous. Data on bacterial contamination of milk after the mild pasteurization is shown in Tabs. IIA–IIC. Unacceptable psychrophilic and coliform bacteria counts were found in 14 and 20% of the samples respectively. As can be seen in Tab. IIC, the unacceptable samples included also those contaminated by *Escherichia coli* incl. the serotype O157 : H7. Owing to the bacterial contamination, the HTST pasteurization is not suitable for the production of market milk. Tab. IIA also shows marked differences among the dairies and individual samplings indicating the possibility to reduce the contamination rate by observation of technological rules during the transport, take-over and handling of milk prior to heat processing. Considering the high rate of bacterial contamination of raw milk immediately before pasteurization, the HTST method of pasteurization cannot be recommended for the production of market milk in the Czech Republic. A high rate of contamination of raw milk intended for the HTST method of pasteurization was found, although, in general, the quality of milk purchased from farmers in the Czech Republic is very good. The HTST method of pasteurization would increase the hazard of foodborne infections and intoxications, particularly those for which *Listeria monocytogenes* and strains of serotype O157 : H7 *Escherichia coli* are responsible. Shelf life of HTST pasteurized milk would be very short and its sensoric properties unacceptable. Therefore, the HTST method of pasteurization is not currently used in the production of market milk in the Czech Republic.

milk; pasteurization; microbial contaminants; total count; psychrophilic and coliform bacteria; mould; yeast; *Bacillus cereus*; *Staphylococcus aureus*; *Salmonella* sp.; *Listeria monocytogenes*; *Escherichia coli*; *Escherichia coli* serotype O157 : H7

ABSTRAKT: Předmětem studie bylo ověřit, zda je v současné době možné v České republice použít režim šetrné pasterace k produkci konzumního mléka a jak by tento režim ovlivňoval trvanlivost pasterovaného mléka. Vzorky syrového a pasterovaného mléka byly získány opakovaným odběrem ve třech mlékárnách, na čtyřech pasteračních stanicích, využívajících režim šetrné pasterace při výrobě tvarohu a sýrů. Odebrané vzorky byly rozděleny na dvě části. Jedna část vzorků byla zpracována ihned po jejich dopravě do laboratoře. Druhá část vzorků byla testována po skladování při teplotě +6 °C po dobu pěti dní. Mikrobiologické rozbory byly zaměřeny na stanovení celkových počtů mikroorganismů, počtů psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií, plísní, kvasinek, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus* a na průkaz bakterií rodu *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a *Escherichia coli* sérotypu O157 : H7. Vzhledem ke zjištěné vysoké bakteriální

kontaminaci syrového mléka bezprostředně před pasterací nelze v současné době doporučit šetrnou pasteraci při výrobě konzumního mléka. Vysoká kontaminace syrového mléka určeného k šetrné pasteraci byla zaznamenána přesto, že jakost mléka vykupovaného z farem je velmi dobrá. Pokud by se šetrná pasterace použila, vznikalo by riziko alimentárních infekcí a intoxikací zejména *Listeria monocytogenes* a sérotypem O157 : H7 *Escherichia coli*. Úchovnost šetrně pasterovaného mléka by byla velmi krátkodobá a organoleptické vlastnosti finálního produktu nepřijatelné. Proto se v současné době šetrná pasterace k produkci konzumního mléka v České republice nepoužívá.

mléko,; pasterace; mikrobiální kontaminace; celkové počty; psychrofilní a koliformní baktérie; plísně; kvasinky

ÚVOD

Mléko je vhodným substrátem pro růst mnoha patogenních i nepatogenních mikroorganismů. Patogenní mikroorganismy přítomné v syrovém nebo nevhodně pasterovaném mléce mohou být příčinou alimentárních infekcí a intoxikací, schopných ohrozit a poškodit zdraví spotřebitelů. To se týká obzvláště imunosuprimovaných jedinců a dětí (CAST, 1994).

Jakost syrového mléka určeného pro mlékárenské ošetření a zpracování v České republice se stále zvyšuje. V nejvyšších třídách jakosti (Q a I) bylo v prvním čtvrtletí 1998 vyprodukováno 97,5 % syrového mléka (Anonym, 1998). Nicméně i syrové mléko s nízkými celkovými počty mikroorganismů a nízkým počtem somatických buněk může obsahovat patogenní mikroorganismy a stát se zdrojem alimentárních infekcí a intoxikací lidí (Steele aj., 1997).

Podle stávající české legislativy neexistují závazné limity mikrobiologických znaků pro syrové mléko určené k mlékárenskému ošetření a zpracování. Česká státní norma (57 0529) má pouze charakter doporučení. Pro pasterované tekuté mléčné výrobky jsou závaznými sledovanými ukazateli celkový počet psychrofilních mikroorganismů 5.10^4/ml (m), 5.10^5/ml (M) a počet koliformních bakterií 1.10^2/ml (m), 5.10^2/ml (M) (MZ ČR, 1997).

Legislativa Evropské unie stanoví pro syrové mléko k mlékárenskému ošetření a zpracování maximální limity pro obsah mikroorganismů při teplotě 30 °C ≤ 100.10^3/ml a obsah somatických buněk ≤ 400.10^3/ml. Syrové mléko, pokud nebylo ošetřeno do 36 hodin po přijetí k mlékárenskému ošetření a zpracování, nemá mít před pasterací vyšší počet mikroorganismů při teplotě 30 °C než 300.10^3 /ml. V mikrobiologických znacích legislativa Evropské unie uvádí pro konzumní mléko v okamžiku výstupu ze zpracovatelského závodu obsah mikroorganismů při teplotě 30 °C ≤ 50.10^3/ml, *Staphylococcus aureus* 100/ml (m), resp. 500/ml (M), *Salmonella* – nulový obsah v 25 g. Patogenní organismy a jejich toxiny nesmí být přítomny v množstvích, která by poškozovala zdraví konzumentů.

V posledním desetiletí se klade důraz na *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a *Bacillus cereus*, neboť se uplatňují jako příčina hromadných nemocí způsobených potravinami. Velkou hrozbu pro lidské zdraví představuje alimentární onemocnění listeriózou (Begot aj., 1997). V průmyslově rozvinutých zemích jsou listeriózy příčinou jen asi 0,5 až 1 % všech hromadných alimentárních infekcí a intoxikací mikrobiálního původu, mají však mezi těmito onemocněními prvenství v procentu mortality, které se odhaduje až na 30 % úmrtí z celkového počtu onemocnění (WHO, 1988). Mezi psychrotrofní mikroorganismy, které mohou vyvolat onemocnění z potravin, patří *Bacillus cereus* (Meer aj., 1991). Velkou závažnost má průkaz *Bacillus cereus*, neboť produkuje toxiny během růstu v mléce při teplotách 6 až 8 °C (Christiansson aj., 1989). Byla zaznamenána alimentární onemocnění po konzumaci syrového mléka kontaminovaného sérotypem O157 : H7 *Escherichia coli* (Anonym, 1993).

Zlepšená úroveň chlazení mléka na farmách a v mlékárenských závodech přináší zlepšení kvality mléka, omezuje růst patogenních bakterií a působí inhibičně na mikroorganismy způsobující kysnutí. Dlouhodobým chlazením se však mění složení mikroflóry mléka a dominantní nad ostatními rody se stává alkaligenní, převážně psychrotrofní mikroflóra, včetně psychrotrofních patogenních mikroorganismů. Tato mikroflóra produkcí termostabilních proteáz a lipáz je závažnou příčinou organoleptických vad konzumního mléka (Shah, 1994).

Významným prostředkem pro omezení rizik souvisejících s kontaminací syrového mléka patogenními mikroorganismy je pasterace. Pasterace minimalizuje možné ohrožení zdraví konzumentů, aniž by působila závažné změny chemických, fyzikálních a organoleptických vlastností produktu. Tento proces však pouze částečně destruuje mikroorganismy významné pro jakost konzumního mléka a pro jeho úchovnost (Cerf, 1986). S ohledem na biologickou hodnotu pasterizovaných mléčných produktů se v posledních letech preferuje šetrný režim pasterace (EHS, 1993).

Proto předmětem této práce bylo ověřit, zda je v současné době v České republice možné použít režim šetrné pasterace k produkci konzumního mléka. Dále pak, jak tento režim ovlivňuje trvanlivost pasterovaného mléka.

MATERIÁL A METODY

Vzorky syrového a pasterovaného mléka byly získány opakovaným odběrem (v týdenních intervalech) v mlékárnách, využívajících režim šetrné pasterace (IDF, 1984; Burton, 1986) při výrobě tvarohu a sýrů. Odebrané vzorky byly rozděleny na dvě části. Jedna část vzorků byla zpracována ihned po jejich dopravě do laboratoře, nejdéle do tří hodin po odběru. Druhá část vzorků byla testována po skladování při teplotě +6 °C po dobu pěti dní za účelem posouzení trvanlivosti mléka. Vzorky

byly do laboratoře transportovány v termobrašně, v chladovém režimu.

Mikrobiologické rozbory byly zaměřeny na stanovení celkových počtů mikroorganismů, počty psychrotrofních mikroorganismů, koliformních bakterií, plísní, kvasinek, *Bacillus cereus* a *Staphylococcus aureus* a na průkaz bakterií rodu *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* a *Escherichia coli* O157 : H7.

Celkový počet mikroorganismů a počet psychrotrofních mikroorganismů byl stanoven v souladu s ČSN ISO 6610 a dle ČSN ISO 6730. K zalévání inokula byla použita půda GTK agar (Merck, Německo).

Stanovení počtu koliformních bakterií a průkaz *Escherichia coli* byl proveden podle ČSN ISO 5541. Byla použita chromogenní média Chromocult (Merck, Německo). Dále byl použit krevní agar, Endo agar a pro zalévání inokula při stavení počtu koliformních bakterií agar VRBL (Merck, Německo). Při identifikaci *Escherichia coli* byl využit Oxitest (Lachema, Česká republika) a pro *Escherichia coli* O157 Latex test DR 620 H (Oxoid, Velká Británie).

Stanovení počtu plísní a kvasinek bylo provedeno v souladu s ČSN ISO 6611. Inokulum bylo zaléváno půdou s kvasničným extraktem, glukózou a chloramfenikolem (Merck, Německo).

Ke stanovení počtu *Bacillus cereus* byla použita ČSN ISO 7932. Objem zkušebního vzorku byl očkován na povrch plotnové agarové půdy MYP (Merck, Německo).

K průkazu *Staphylococcus aureus* byl použit Columbia agar (Oxoid, Velká Británie), krevní agar (Hi media, Indie) a Baird-Parker Agar (Merck, Německo). Kvantitativní vyšetření bylo provedeno podle ČSN ISO 6888. Objem (0,1 ml) zkouseného vzorku byl očkován na povrch tuhé kultivační půdy Baird-Parker Agar (Merck, Německo).

Kvalitativní vyšetření na přítomnost bakterií rodu *Salmonella* bylo prováděno dle ČSN ISO 6579. Pro neselektivní předpomnožení a výchozí suspenzi byla použita tekutá půda, tlumivá peptonová voda (Merck, Německo). Kultura získaná neselektivním pomnožením byla inokulována do dvou selektivních tekutých půd, a to do půdy s chloridem hořečnatým a malachitovou zelení podle Rappaporta a Vassiliadise a do půdy se seleničitanem a cystinem. Kultury byly vyočkovány na pevné selektivní půdy Agar s fenolovou červení a brilantovou zelení (Merck, Německo) a XLD agar (Merck, Německo).

Kultivace *Listeria monocytogenes* byla prováděna dle ČSN ISO 10560. Vzorek byl inokulován do pomnožovací půdy LEB (Merck, Německo) a po pomnožení vyočkován na povrch selektivní agarové půdy Palcam (Merck, Německo). K rychlému průkazu *Listeria monocytogenes* ve vzorcích byly použity komerční imunologické testy Elisa Unique™ Listeria (R-Biopharm, Německo).

U všech vzorků byla provedena i přímá kultivace na krevní agar (Hi media, Indie), Columbia agar (Oxoid, Velká Britanie), Endo agar (Hi media, Indie), Baird-Parker agar a Edwards medium (Oxoid, Velká Britanie).

Podezřelé kolonie získané při kvantitativním a kvalitativním vyšetření byly izolovány a podrobeny biochemické typizaci a sérologické konfirmaci. Z komerčních testů byly využívány API (bioMerieux, Rakousko), Staphytest (Lachema, Česká republika), Staphytec plus test DR 850 (Oxoid, Velká Británie), Streptotest (Lachema, Česká republika), Strep plus kit DR 575 M (Oxoid, Velká Británie), Oxitest (Lachema, Česká republika), *E. coli* Latex test DR 620 H (Oxoid, Velká Británie), Enterotest (Lachema, Česká republika).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Stupeň bakteriální kontaminace syrového mléka určeného k šetrné pasteraci v celkovém počtu mikroorganismů a počtu koliformních bakterií dokumentuje tab. IA. Je z ní patrno, že celkový počet výrazně překročil limitní hodnotu, a to jak dle Směrnice 46/92 EHS, tak dle doporučení ČSN 57 0529. Překvapující je zcela nevyhovující počet koliformních bakterií.

Vzhledem k tomu, že jakost syrového mléka vykupovaného v prvovýrobě je velmi dobrá (Anonym, 1998), nabízí se vysvětlení, že k vysoké kontaminaci syrového mléka dochází při transportu mléka k mlékárenskému ošetření a zpracování.

Tab. IB dokumentuje kontaminaci syrového mléka určeného k pasteraci psychrofilními bakteriemi, plísněmi a kvasinkami. Kontaminace psychrofilními bakteriemi mnohonásobně překračuje doporučení ČSN (57 0529). Zvýšený počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních i psychrofilních mikroorganismů v syrovém mléce (vyšetřeném ihned po odběru) signalizuje nevyhovující sanitační režim a kolísavé hygienické podmínky při sběru, svozu a uchovávání mléka před pasterací. Údaje o kontaminaci plísněmi a kvasinkami mají ilustrativní charakter neboť limitní hodnoty nejsou pro syrové mléko kodifikovány.

Tab. IC dokumentuje kontaminaci syrového mléka určeného k pasteraci hlavními původci alimentárních infekcí. Za závažnou kontaminaci lze považovat kontaminaci *Escherichia coli*, zejména pak kontaminaci sérotypem O157 : H7. Z tabulky je zřejmé, že nebyla zaznamenána kontaminace bakteriemi rodu *Salmonella*. U ostatních patogenů nelze považovat zjištěnou kontaminaci za závažnou. Koliformní bakterie a *Escherichia coli*, považované dříve především za indikátor mikrobiálního znečistění nebo nedostatečné hygienické praxe, je dnes třeba hodnotit také jako potenciální zdroj enteropatogenních a enterotoxinogenních kmenů.

Syrové mléko, infikované *Escherichia coli*, je častou příčinou hromadných gastroenteritid i sporadických infekcí na farmách (Padhye a Doyle, 1992). Konzum syrového mléka na farmách a v mlékárenské výrobě přispívá k šíření infekcí i vzniku nových bacilonosičů. Ačkoli jsou absolutní počty těchto infekcí ve srovnání s ostatními alimentárními infekcemi lidí (*Salmonella, Campylobacter*) nižší, jedná se často o infekce ohrožující život pacientů (Coia, 1998). I potraviny s nízkými počty

I. Bakteriální kontaminace syrového mléka určeného k šetrné pasteraci – Microbial contamination of raw milk intended for HTST pasteurization

	Lokalita[1]	Počet odběrů[2]	Celkový počet mikroorganismů[3]			Celkový počet mikroorganismů			Koliformní bakterie[4]		
			CFU (.10⁴/ml)	nevyhovuje[5]		CFU (.10⁴/ml)	nevyhovuje[5]		CFU (.10⁴/ml)	nevyhovuje[5]	
				počet[6]	%		počet[6]	%		počet[6]	%
A	1	8	15–540	4	50	15–540	2	25	1,9–>27	8	100
	2	8	0,87–>540	3	38	0,87–>540	2	25	1,8–19	8	100
	3	5	44–460	5	100	44–460	1	20	1,4–>2,7	5	100
	4	5	37–>540	3	60	37–>540	1	20	7,8–>2,7	5	100
	Celkem[7]	26	0,87–>540	15	58	0,87–>540	6	23	1,4–>27	26	100
	Limitní hodnota[8]		30.10⁴			80.10⁴			1.10³		

	Paster[9]	Počet odběrů[2]	Psychrofilní bakterie[10] (CFU.10⁴/ml)	Plísně[11] (CFU.10¹/ml)	Kvasinky[12] (CFU.10³/ml)
B	1	8	5,2–>54	0–4,0	0–>1,4
	2	8	0,12–>54	0–8,2	0–>1,4
	3	5	3,5–440	0–6,4	0,1–>1,4
	4	5	37–>54	0–140	0,1–>1,4
	Celkem[7]	26	0,12–440	0–>140	0–>1,4

	Paster[9]	Počet odběrů[2]	*Bacillus cereus* (CFU.10¹/ml)	*Staphylococcus aureus*		*Salmonella* spp.		*Listeria monocytogenes*		*Escherichia coli*		*Escherichia coli* O157	
				pozitivní[13]		pozitivní[13]		pozitivní[13]		pozitivní[13]		pozitivní[13]	
				počet[6]	%	počet[6]	%	počet[6]	%	počet[6]	%	počet[6]	%
C	1	8	0–14	0	0	0	0	1	13	8	100	3	38
	2	8	0–3,2	3	38	0	0	3	38	8	100	2	25
	3	5	0–4,0	0	0	0	0	0	0	5	100	4	80
	4	5	0–4,0	1	20	0	0	2	40	5	100	4	80
	celkem[7]	26	0–14	4	15	0	0	5	19	26	100	13	50

[1]locality, [2]number of samples, [3]total count of microorganisms, [4]coliform bacteria, [5]not satisfactory, [6]number, [7]total, [8]limit value, [9]Pasteur, [10]psychrophylic bacteria, [11]moulds, [12]yeasts, [13]positive

Escherichia coli sérotyp O157 : H7 jsou příčinou hemoragické kolitidy, hemoragicko-uremického syndromu a trombocytopenie, které představují vážnou komplikaci infekcí člověka. Infekční dávka je velmi nízká, uvádí se dokonce dvě buňky na 25 g potraviny (Willshaw aj., 1994). Kmeny enterohemoragické *Escherichia coli*, jejichž hlavním epidemiologickým reprezentantem je v současné době sérotyp O157 : H7, jsou pro zdravotní nezávadnost mléka a mléčných výrobků ze všech *Escherichia coli* nejrizikovější, protože jejich přírodní rezervoár je skot (Jičínská a Havlová, 1995).

V syrovém mléce byly kromě *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* diagnostikovány i *Staphylococcus capitis* ssp. *ureolyticus*, *Staphylococcus hyicus*, *Staphylococcus simulans*, *Streptococcus mitior*, *Streptococcus milleri*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* a *Pseudomonas fluorescens*.

Bakteriální kontaminaci mléka po šetrné pasteraci dokumentují tab. IIA až IIC. Počtem psychrofilních bakterií nevyhovuje 14 % vzorků mléka, počtem koliformních 20 %. Jak dokumentuje tab. IIC, v nevyhovujících vzorcích kontaminace koliformními bakteriemi zahrnuje přítomnost *Escherichia coli* včetně sérotypu O157 : H7. Zjištěná bakteriální kontaminace vylučuje možnost použití šetrně pasterovaného mléka k produkci mléka konzumního. Z tab. IIA je patrno, že existují výrazné rozdíly mezi mlékárnami i mezi jednotlivými odběry. To nasvědčuje reálné možnosti dosáhnout nízké kontaminace dodržením technologické kázně při transportu, příjmu a uchovávání syrového mléka před pasterací.

Šetrná pasterace vedla k výraznému snížení počtu mikroorganismů. Ve srovnání s úrovní mikrobiální kontaminace syrového mléka byla prokázána redukce celkového počtu mikroorganismů, psychrofilních a koliformních bakterií o tři až čtyři řády.

Tab. IIB dokumentující bakteriální kontaminaci pasterovaného mléka v celkovém počtu mikroorganismů, plísní a kvasinek má pouze ilustrativní charakter, neboť limitní hodnoty nejsou stávající českou legislativou kodifikovány.

Tab. IIC dokumentuje stupeň bakteriální kontaminace pasterovaného mléka původci alimentárních infekcí a intoxikací. Kontaminaci *Listeria monocytogenes* lze považovat za nepřijatelnou, neboť je kodifikován nulový nález v 25 gramech. Za rizikový je třeba považovat i nález sérotypu O157 : H7 *Escherichia coli*. Ostatní nálezy jsou přijatelné.

Uchovávání pasterovaného mléka po dobu pěti dní v chladovém režimu vedlo k enormnímu nárůstu psych-

II. Bakteriální kontaminace šetrně pasterovaného mléka – Microbial contamination of milk after HTST pasteurization

	Paster[1]	Počet odběrů[2]	Psychrofilní bakterie[3] (CFU.10^4/ml)	nevyhovuje[5] počet[6]	nevyhovuje[5] %	Koliformní bakterie[4] CFU.10^2/ml)	nevyhovuje[5] počet	nevyhovuje[5] %
A	1	16	0–37	2	13	0–>270	3	19
	2	6	2,8-20	1	17	0–>270	2	33
	3	5	0–0,38	0	0	0	0	0
	4	8	0–>5,4	2	25	0–>270	2	25
	celkem[7]	35	0–37	5	14	0–>270	7	20
	limitní hodnota[8]		m 5.10^4 M 5.10^5			1.10^2 5.10^2		

	Paster[1]	Počet odběrů[2]	Celkový počet mikroorganismů[9] (CFU.10^3/ml)	Plísně[10] (CFU.10^1/ml)	Kvasinky[11] (CFU.10^3/ml)
B	1	16	0,2–>54	0–4,0	0–>1,4
	2	6	3,9–>240	0–4,5	0–>1,4
	3	5	0–>5,4	0–2,2	0,1–>1,4
	4	8	0,2–240	0–4,0	0,1–>1,4
	Celkem[7]	35	0–240	0–4,5	0–>1,4

	Paster[1]	Počet odběrů[2]	*Bacillus cereus* (CFU.10^2/ml)	*Salmonella* spp. pozitivní[12] počet[6]	*Salmonella* spp. pozitivní[12] %	*Staphylococcus aureus* pozitivní[12] počet	*Staphylococcus aureus* pozitivní[12] %	*Listeria monocytogenes* pozitivní[12] počet	*Listeria monocytogenes* pozitivní[12] %	*Escherichia coli* pozitivní[12] počet	*Escherichia coli* pozitivní[12] %	*Escherichia coli* O157 pozitivní[12] počet	*Escherichia coli* O157 pozitivní[12] %
C	1	16	0–2,0	0	0	0	0	2	13	4	25	1	6
	2	6	0–>14	0	0	0	0	0	0	2	33	1	17
	3	5	0–1,6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	4	8	0–2,5	0	0	0	0	1	13	2	25	1	13
	celkem[7]	35	0–>14	0	0	0	0	3	9	8	23	3	9

[1]Pasteur, [2]number of samples, [3]psychrophylic bacteria, [4]coliform bacteria, [5]not satisfactory, [6]number, [7]total, [8]limit value, [9]total counts of microorganisms, [10]moulds, [11]yeasts, [12]positive

rofilních i koliformních bakterií, jakož i celkového počtu mikroorganismů (tab. IIIA, B). Za závažné zjištění je třeba označit nárůst pozitivit *Escherichia coli* po pěti dnech skladování mléka. Výskyt sérotypu O157 : H7 a *Listeria monocytogenes* skladováním nebyl výrazně ovlivněn. Zbývající patogeny se po skladování mléka nevyskytovaly nebo v malém počtu (tab. IIIC). Nálezy některých sledovaných patogenních mikroorganismů *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* i *Escherichia coli* O157 : H7 nejen v mléce syrovém, ale i v mléce pasterovaném jsou závažným problémem. Přítomné kontaminanty mohou být příčinou alimentárních onemocnění s vážným až smrtelným průběhem.

Výsledky získané v několika sledovaných lokalitách ukázaly na možnost přežívání některých rizikových patogenů v podmínkách šetrné pasterace. Údaje k problematice rezistence patogenních mikroorganismů k vyšším teplotám jsou nedostatečné a výsledky některých dílčích studií se liší. Fleming aj. (1985) uvádějí, že po konzumaci pasterovaného mléka může *Listeria monocytogenes* vyvolat onemocnění. *Listeria monocytogenes* je intracelulární parazit, shromažďuje se a může růst uvnitř fagocytů (Lukášová, 1991). To vedlo některé pracovníky k názoru, že intracelulárně lokalizované listerie jsou chráněny vůči účinku pasteračních teplot (Doyle aj., 1987). Rizikem je také skutečnost, že i malá množství *Listeria monocytogenes* se mohou v pasterovaném mléce v krátké době pomnožit (Lukášová, 1991).

Výsledky získané ve sledovaných lokalitách dokumentují závislost mikrobiální kontaminace finálního produktu i jeho trvanlivosti na mikrobiologické kvalitě vstupní suroviny. Použití režimu šetrné pasterace při produkci konzumního mléka je podmíněno zpracováním syrového mléka lepší mikrobiologické kvality, nekontaminovaného patogenními mikroorganismy. Závislost mezi výskytem některých patogenních mikroorganismů a počty mezofilních bakterií neexistuje. Mléko je tím vhodnější substrát pro růst patogenních bakterií a produkci toxinů, čím nižší je celkový počet kontaminující nepatogenní mikroflóry. V silně kontaminovaném mléce jsou patogenní mikroorganismy inhibovány nebo usmrcovány metabolickými produkty, bakteriociny, antibiotiky, lytickými enzymy nepatogenních mikroorganismů aj. (Jičínská a Havlová, 1995). Při hodnocení výsledků mikrobiologického vyšetření syrového mléka jako vstupní suroviny určené k šetrné pasteraci lze konstatovat,

III. Bakteriální kontaminace šetrně pasterovaného mléka po 5 dnech skladování – Microbial contamination of milk after HTST pasteurization and storage for 5 days

	Paster[1]	Počet odběrů[2]	Psychrofilní bakterie[3]			Koliformní bakterie[4]		
			(CFU.10^4/ml)	nevyhovuje[5]		CFU.10^2/ml)	nevyhovuje[5]	
				počet[6]	%		počet[6]	%
A	1	16	0–>540	13	81	0–>270	10	62
	2	6	2,8–>5 400	5	83	0–>270	5	83
	3	8	0,89–>540	6	75	0–>54 000	7	88
	celkem[7]	30	0–>5 400	24	80	0–>54 000	22	73

	Paster[1]	Počet odběrů[2]	Celkový počet mikroorganismů[8] (CFU.10^3/ml)	Plísně[9] (CFU.10^1/ml)	Kvasinky[10] (CFU.10^3/ml)
B	1	16	43–>5 400	0–8,2	0–>1,4
	2	6	34–>54 000	0	0–>1,4
	3	8	8,9–>5 400	0	0–>1,4
	celkem[7]	30	8,9–>54 000	0–8,2	0–>1,4

	Paster[1]	Počet odběrů[2]	*Bacillus cereus* (CFU.10^2/ml)	*Salmonella* spp.		*Staphylococcus aureus*		*Listeria monocytogenes*		*Escherichia coli*		*Escherichia coli* O157	
				pozitivní[11]		pozitivní[11]		pozitivní[11]		pozitivní[11]		pozitivní[11]	
				počet[6]	%	počet[6]	%	počet[6]	%	počet[6]	%	počet[6]	%
C	1	16	0–1,9	0	0	0	0	2	13	12	75	1	6
	2	6	0–6,6	0	0	0	0	0	0	4	66	1	17
	3	8	0–0,59	0	0	0	0	0	0	6	75	0	0
	celkem[7]	30	0–6,6	0	0	0	0	2	7	22	73	2	7

[1]Pasteur, [2]number of samples, [3]psychrophylic bacteria, [4]coliform bacteria, [5]not satisfactory, [6]number, [7]total, [8]total counts of microorganisms, [9]moulds, [10]yeasts, [11]positive

že ve většině případů se jednalo o mléko horší mikrobiologické kvality (vysoký počet běžné kontaminující mikroflory i výskyt některých patogenních mikroorganismů), s následným negativním vlivem na mikrobiologický nález a trvanlivost finálního produktu.

Současný vzrůstající trend výskytu patogenních mikroorganismů v mléce i rostoucí počet hromadných alimentárních infekcí a enterotoxikóz v průmyslově vyspělých státech je spojen s nedostatečnou prevencí proti běžně se vyskytujícím patogenům i se stoupajícím procentem starých a nemocných lidí se sníženou rezistencí k infekcím.

Mikrobiální kontaminace finálního výrobku může být negativně ovlivněna i rekontaminací tepelně ošetřeného mléka, distribucí, skladováním i způsobem zacházení s mlékem v domácnosti. Z hlediska prevence alimentárních nákaz je nutné vzít na zřetel tyto skutečnosti při zavádění nových technologických postupů, posuzování jejich bezpečnosti i při stanovování doby trvanlivosti výrobku.

Výsledky vyšetření, zaměřené na posouzení trvanlivosti mléka po šetrné pasteraci, dokumentují výrazný nárůst počtu mikroorganismů po pěti dnech. Vzrůstá riziko i v důsledku přežívání a pomnožování patogenních mikroorganismů. Prodloužená pětidenní trvanlivost šetrně pasterovaného mléka se jeví z hlediska zdravotní nezávadnosti v dané situaci jako zcela nepřijatelná.

O použití režimu šetrné pasterace k produkci konzumního mléka lze perspektivně uvažovat pouze v lokalitách a mlékárnách se zavedeným a důsledně uplatňovaným systémem HACCP. K zabezpečení zdravotní nezávadnosti by bylo třeba rozšířit rozsah laboratorního vyšetření na rizikové patogenní mikroorganismy. Sledovat nejen finální výrobky, ale i surovinu a celý výrobní proces včetně svozu. Problémem je také adaptace a selekce psychrotrofních variant mikroorganismů, včetně patogenních, vlivem dlouhodobého chlazení.

Závěrem konstatujeme, že při zjištěné vysoké bakteriální kontaminaci a nálezu patogenních mikroorganismů v syrovém mléce nelze za dané situace doporučit šetrnou pasteraci při výrobě konzumního mléka. Vysoká kontaminace syrového mléka určeného k šetrné pasteraci byla zaznamenána přesto, že jakost vykupovaného mléka je v České republice velmi dobrá. Pokud by se šetrná pasterace za stávající situace použila, vznikalo by riziko alimentárních infekcí a intoxikací zejména *Listeria monocytogenes* a sérotypem O157 : H7 *Escherichia coli*. Úchovnost šetrně pasterovaného mléka by byla velmi krátkodobá a organoleptické vlastnosti finálního produktu nepřijatelné. Proto se v současné době šetrná pasterace k produkci konzumního mléka v České republice nepoužívá.

LITERATURA

Anonym (1993): Raw milk implicated in latest Oregon *E. coli* cases. Food Chem. News, *26*, 54–55.

Anonym (1998): Mléko. Situační a výhledová zpráva. Praha, MZe ČR. 43 s.

Begot C., Lebert I., Lebert A. (1997): Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiol., *14*, 403–412.

Burton H. (1986): Microbial aspects. In: Monograph on pasteurized milk. IDF Bull., *200*, 9–14.

Cerf O. (1986): Introduction. In: Monograph on pasteurized milk. IDF Bull., *200*, 2–3.

Coia J. E. (1998): Clinical microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection. FEMS Immunol. Med. Mic., *20*, 1–9.

Christiansson A., Naidu A. S., Nilsson I., Wadstrom T., Pettersson H. E. (1989): Toxin production by *Bacillus cereus* dairy isolates in milk at low temperatures. Appl. Environ. Microb., *55*, 2595–2600.

Doyle M. P., Glass K. A., Berry J. T., Garcia G. A., Pollard D. J., Schultz R. D. (1987): Survival of *Listeria monocytogenes* in milk during high-temperature, short-time pasteurization. Appl. Environ. Microb., *53*, 1433–1438.

Fleming D. W., Cochi S. L., Mac Donald K. L., Brondum J., Hayes P. S., Plikaytis B. D., Holmes M. B., Audurier A., Broome C. V., Reingold A. L. (1985): Pasterized milk as vehicle of infection in an outbreak of listeriosis. New Engl. J. Med., *312*, 404–407.

Jičínská E., Havlová J. (1995): Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích. Praha. 107 s.

Lukášová J. (1991): *Listeria monocytogenes* v potravinách. Čs. Hyg., *36*, 218– 221.

Meer R. R., Baker J., Bodyfelt F. W., Griffiths M. W. (1991): Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: a review. J. Food Protect., *54*, 969–979.

Padhye N. V., Doyle M. P. (1992): *Escherichia coli* O157 : H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food. J. Food Protect., *55*, 555–565.

Shah N. P. (1994): Psychrotrophs in milk: a review. Milchwissenschaft, *49*, 432–437.

Steele M. L., McNab W. B., Poppe C., Griffiths M. W., Chen S., Degrandis S. A., Fruhner L. C., Larkin A. C., Lynch J. A., Odumeru J. A. (1997): Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. J. Food Protect., *60*, 1341–1346.

Willshaw G. A., Thirwell J., Jones A. P., Parry S., Samson R. L., Hickey M. (1994): Verotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in beefburgers linked to outbreak of diarrhoea, haemorrhagic colitis and haemolytic ureamic syndrome in Britain. Lett. Appl. Microbiol., *19*, 304–307.

CAST (1994): Foodborne pathogens: risks and consequences. Task Force Report, No. 122, 25–26.

ČSN 57 0529 Syrové kravské mléko pro mlékárenské ošetření a zpracování. 1993.

ČSN ISO 5541 Mikrobiologie. Stanovení počtu koliformních bakterií – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C – Mléko a mléčné výrobky. 1996.

ČSN ISO 6579 Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro metody průkazu bakterií rodu *Salmonella*. 1995.

ČSN ISO 6610 Mikrobiologie. Stanovení počtu jednotek mikroorganismů tvořících kolonie – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Mléko a mléčné výrobky. 1996.

ČSN ISO 6611 Stanovení počtu jednotek kvasinek a plísní tvořících kolonie – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C – Mléko a mléčné výrobky. 1996.

ČSN ISO 6730 Mikrobiologie. Stanovení počtu jednotek tvořících kolonie psychrotrofních mikroorganismů – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 6,5 °C. 1996.

ČSN ISO 6888 Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus* – Technika počítání kolonií. 1994.

ČSN ISO 7932 Mikrobiologie. Všeobecné pokyny pro stanovení počtu *Bacillus cereus* – Technika počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. 1995.

ČSN ISO 10560 Mikrobiologie. Průkaz *Listeria monocytogenes* – Mléko a mléčné výrobky. 1996.

EHS (1993): Směrnice 92/46/ EHS Rady ze 16. června 1992. Pardubice, 48 s.

IDF (1984): Definitions of heat treatment as applied to milk and fluid milk products. CE Doc. 1. Brussels. (From: Burton, 1986).

MZ ČR (1997): Vyhláška č. 294/1997 Sb., o mikrobiologických požadavcích na potraviny, způsobu jejich kontroly a hodnocení. Sbírka zákonů. Částka 98, 5428–5461.

WHO (1988): Report of the WHO Informal Working Group on Foodborn Listeriosis. Geneva. 5 pp.

Received: 99–06–11
Accepted: 99–07–16

Kontaktní adresa:

MVDr. Eva Binderová, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: binderova@vri.cz

Upozornění pro autory vědeckých časopisů

Z důvodu rychlejšího a kvalitnějšího zpracování grafických příloh (grafů, schémat apod.) příspěvků zasílaných do redakce Vás žádáme o jejich dodání kromě tištěné formy i na disketách.

Pérovky mohou být zpracovány jako předloha pro skenování nebo mohou být dodány též jako bitmapa ve formátu ***.TIF** (600 DPI). Pro skenování by grafy neměly obsahovat šedivé plochy. Místo šedí se mohou použít různé typy černobílého šrafování.

Grafy je třeba dodat **včetně zdrojových dat** (jako tabulku) v programu EXCEL.

Prosíme **nezasílejte** obrázky ve formátu **Harvard Graphics**, nýbrž vyexportované do některého z výše uvedených formátů.

Redakce časopisu

APOPTOSIS OF POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

APOPTÓZA POLYMORFONUKLEÁRNÍCH LEUKOCYTŮ

Z. Sládek[1] **D. Ryšánek**[2]

[1]*Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno, Czech Republic*
[2]*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

ABSTRACT: Polymorphonuclear leukocytes play the major role in the phagocytary system of defence against bacterial infection. Their life span is the shortest among all leukocytes. After leaving the blood circulation, they are predestined for programmed cell death – apoptosis. Unlike necrosis, apoptosis does not induce damage to tissues due to the histotoxic potential of granules of the polymorphonuclear leukocytes. The review summarizes principal opinions and results of experimental work on basic morphological, biochemical and genetic aspects of this type of cell death in polymorphonuclear leukocytes, as well as on factors controlling this process.

programmed cell death – apoptosis; polymorphonuclear leukocyte

ABSTRAKT: Polymorfonukleární leukocyty hrají hlavní roli ve fagocytárním obranném systému jedince proti bakteriálním infekcím. Jejich životnost je nejkratší ze všech leukocytů, přičemž jsou po opuštění krevního řečiště predisponovány k programované buněčné smrti – apoptóze. Apoptóza oproti nekróze zabraňuje poškození tkáně histotoxickým potenciálem granulí samotných polymorfonukleárních leukocytů. Review shrnuje zásadní názory a výsledky experimentálních prací o základních morfologických, biochemických a genetických aspektech tohoto typu buněčné smrti u polymorfonukleárních leukocytů i o činitelích regulace tohoto procesu.

programovaná buněčná smrt – apoptóza; polymorfonukleární leukocyty

Seznam použitých zkratek: PMN – polymorfonukleární leukocyty; **PCD** – programovaná buněčná smrt; **PS** – fosfatidylserin; **DNA** – deoxyribonukleová kyselina; **tTG** – tkáňová transglutamináza; **ICE** – interleukin-1β-konvertující enzym; **ER** – endoplazmatické retikulum; **GM-CSF** – granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; **G-CSF** – granulocyte colony-stimulating factor; **NGF** – nerve growth factor; **TNF-α** – tumor necrosis factor alpha

CONTENTS

1. Introduction
2. Programmed cell death and apoptosis
3. Morphological characteristic of apoptosis
   3.1. The first phase
   3.2. The second phase
   3.3. The third phase
4. Biochemical characteristic of apoptosis
   4.1. Phosphatidylserine translocation
   4.2. DNA fragmentation
   4.3. Terminal biochemical marks of apoptosis
5. Genetic regulation of apoptosis
6. The fate of extravasated PMN
7. Removal of apoptotic PMN
8. Modulation of PMN apoptosis
   8.1. Inhibition of PMN apoptosis
   8.2. Induction of PMN apoptosis
9. Conclusion
10. References

OBSAH

1. Úvod
2. Programovaná buněčná smrt a apoptóza
3. Morfologická charakteristika apoptózy
   3.1. První fáze
   3.2. Druhá fáze
   3.3. Třetí fáze
4. Biochemická charakteristika apoptózy
   4.1. Translokace fosfatidylserinu
   4.2. Fragmentace DNA
   4.3. Konečné biochemické znaky apoptózy
5. Genetická regulace apoptózy
6. Osud extravazálních PMN
7. Odstranění apoptotických PMN makrofágy
8. Modulace apoptózy PMN
   8.1. Inhibice apoptózy PMN
   8.2. Indukce apoptózy PMN
9. Závěr
10. Literatura

1. ÚVOD

Mnohé buňky hemopoetického systému, například polymorfonukleární leukocyty, makrofágy a lymfocyty, mají relativně krátkou životnost. Ta se pohybuje od méně než několika dnů u krevních polymorfonukleárních leukocytů až po několik týdnů či měsíců u krevních monocytů. Vývoj těchto buněk je pozoruhodný tím, že jsou produkovány ve větším měřítku po celou dobu života jedince. V této souvislosti je důležité si uvědomit, že má-li být zachována homeostáza, musí být produkce buněk přesně vyrovnaná s jejich destrukcí. Proto z hlediska buňky jako jednotlivce je buněčná smrt stejně významná jako samotný vznik buňky (Squier aj., 1995).

Polymorfonukleární leukocyty (dále PMN) jsou odpovědné především za obranu těla proti pronikajícím mikroorganismům a jsou hlavním druhem buněk ve většině forem akutních zánětů, zejména v jejich počátečních stadiích (Stites a Terr, 1994). Zároveň představují nejhojnější granulocyty s nejkratším poločasem životnosti ze všech leukocytů. Jejich životní cykly probíhají ve třech regionech: v kostní dřeni (kde dozrávají), v krvi (kde probíhá transport) a ve tkáních (kde se uplatňuje jejich funkce).

PMN se vyvíjejí z myeloidních prekurzorů a zrají v kostní dřeni přibližně dva týdny. Asi dva dny po dosažení morfologie zralé buňky opouštějí diapedezí cévy hemopoetické tkáně a cirkulují v periferní krvi. Jejich doba cirkulace je 6 až 7 hodin (Stites a Terr, 1994) nebo 6 až 10 hodin (Homburg a Roos, 1996). Poté po aktivaci a expresi membránových adhezivních molekul adherují k endotelu kapilár a vystupují diapedezí přes endotel do alterované tkáně. Vlivem chemotaktických látek migrují do místa jejich produkce, kde uplatňují svoji fagocytární funkci.

Délka přežívání PMN ve tkáni není zcela známa a pravděpodobně se pohybuje kolem jednoho dne (Squier aj., 1999). To platí za fyziologicky normální situace, v případě infekcí se tato doba snižuje. PMN po opuštění krevního řečiště migrují v různých orgánech a tkáních. V orgánech se slizničním povrchem, například v plících, ústní dutině, gastrointestinálním traktu, jsou ze slizničních povrchů mechanicky odstraňovány (Williams aj., 1990). V místě zánětu podléhají nekrotickému rozpadu vlivem negativního působení toxického prostředí, které vzniká mimo jiné následkem uvolňování histotoxického obsahu granulí PMN. Naopak ve zdravé tkáni podléhají programované buněčné smrti – apoptóze, a to bez uvolnění toxického obsahu svých granulí. Tímto mechanismem se omezuje následná devastace okolní zdravé tkáně (Cooter aj., 1994; Haanen a Vermes, 1995).

Je tedy zřejmé, že se v souvislosti se zmíněnou smrtí PMN setkáváme se dvěma základními formami zániku těchto buněk: programovaná (fyziologická) smrt – apoptóza a neprogramovaná (patologická) smrt – nekróza. Vzhledem k tomu, že se toto review týká především prvního z nich, programované buněčné smrti a apoptózy, je užitečné nejprve vymezit jejich význam a vzájemný vztah.

2. PROGRAMOVANÁ BUNĚČNÁ SMRT A APOPTÓZA

Idea, že může být smrt programovaná je starší, než zaznamenaná historie člověka. Již v samotné Bibli (Žalm 90) byla člověku stanovena délka života 70 let (Squier aj., 1995). Poprvé byl termín programovaná smrt, popřípadě programovaná buněčná smrt (dále PCD), použit a zaveden autory Lockshin a Williams (1964) u hmyzu, kde je hormonálně řízená destrukce intersegmentálních svalů podmínkou realizace vývojové dráhy larva-kukla-imago. Ačkoliv je v současné době s pojmy programovaná buněčná smrt a apoptóza zacházeno jako se synonymy, každý z nich má svůj specifický význam.

PCD zahrnuje genetický program, který je fixovaný, a tento typ buněčné smrti je tedy rovněž geneticky řízený a neprobíhá náhodně. PCD nastává v průběhu vývoje organismů, například při eliminaci buněk ocásku během vývoje pulce v žábu nebo při likvidaci rudimentárních žaber v průběhu vývoje lidského embrya.

Nejprostším příkladem PCD je proces vývoje nematody *Ceanorhabditis elegans*, o niž vznikl v posledních letech mimořádný zájem (Yuan a Horvitz, 1990; Ellis aj., 1991; Miura aj., 1993; Yuan aj., 1993; Fernandes-Alnemri aj., 1994; Hengartner a Horvitz, 1994; Gumienny aj., 1999, aj.). Na tomto druhu primitivního červa je zajímavé to, že jeho tělo obsahuje 1 090 buněk, z nichž přesně 131 umírá během jeho vývoje. PCD podléhají pouze určité buňky, které umírají pouze v určitém pořadí, u každého jedince stejně (Ellis aj., 1991). Smrt těchto buněk je tedy precizně determinována v daném místě a v určitém čase a celý proces je geneticky řízen (Yuan a Horvitz, 1990). PCD zahrnuje specifické geny a proteiny, které hrají hlavní roli u umírajících buněk (Horvitz, 1999). Na druhé straně jsou však v PCD potřebné i specifické geny k protekci buněk před samotnou smrtí (Metzstein aj., 1998).

U mnohobuněčných organismů probíhá PCD většinou jako apoptóza. Apoptóza je rovněž programovaná buněčná smrt. Představuje geneticky řízenou sekvenci morfologických a biochemických pochodů. Apoptóza však na rozdíl od PCD může být vyvolávána nejen regulátory vývoje organismu, ale také působením toxických faktorů a vnějšími a vnitřními signály (Alison a Sarraf, 1992; Squier aj., 1995).

Shrnuto, PCD představuje oproti apoptóze nesporně fenomén širší, už z toho důvodu, že nemusí probíhat jako apoptóza.

3. MORFOLOGICKÁ CHARAKTERISTIKA APOPTÓZY

Morfologické vlastnosti apoptózy buněk popsali jako první Kerr aj. (1972), kteří se rovněž stali autory jejího pojmenování. Morfologicky představuje apoptó-

za proces, který je u většiny buněk charakterizován sérií specifických, strukturálních změn. Mezi tyto změny patří svraštění buněk, zpěnění cytoplazmatické membrány (zeiosis), kondenzace cytoplazmy a chromatinu jádra (karyopyknóza) a nakonec fragmentace buněk do apoptotických tělísek (Kerr aj., 1972; Wyllie aj., 1980; Wyllie, 1981).

Pohlédneme-li na proces apoptózy detailněji (zvláště v obraze elektronové mikroskopie), dá se konstatovat, že morfologické změny při apoptóze většiny buněk probíhají ve třech na sebe navazujících fázích (Kerr aj., 1972; Wyllie aj., 1980; Wyllie, 1981, 1987, 1992; Savill aj., 1989a; Yamamoto aj., 1993; Kerr aj., 1994; Payne aj., 1994; Sasaki aj., 1995; Hiramine, 1997; Hussain aj., 1998).

3.1. První fáze

U buněk se nejprve objevuje redukce velikosti jádra. Chromatin kondenzuje do prstenčitých nebo do půlměsičitých čepiček, které jsou nejčastěji umístěny na periferii jádra. Transkripční komplexy fibrilárních center podléhají rozkladu. Objem buněk se snižuje a buňky se svrašťují přibližně o 30 % buněčného objemu a o 10 % průměru buňky (Beauvais aj., 1995). Takto změněné buňky jeví ve světelném mikroskopu intenzivní eosinofilii s pyknotickým jádrem (Allen aj., 1997). Apoptotické buňky ztrácejí speciální povrchové struktury, pseudopodia, a získávají tak sférický tvar s hladkým povrchem. Mimo to dochází k přerušení buněčných kontaktů u apoptotických buněk v kultuře *in vitro*. Cytoplazmatické organely však zůstávají kompaktní a jen cisterny endoplazmatického retikula (dále ER) se mohou dilatovat. Dilatované cisterny ER splývají s cytoplazmatickou membránou až ve druhé fázi, kdy se vytváří zpěnění buněčného povrchu. Dilatované cisterny ER mohou splývat mezi sebou navzájem a vytvářejí tak malé až středně velké vakuoly v cytoplazmě (Savill aj., 1989a; Payne aj., 1994). Stupeň vakuolizace může dosahovat různé šíře, velikost vakuol není konstantní. Například u apoptotických PMN *in vitro* byly popsány megavakuoly, které zabíraly téměř celou cytoplazmu buňky (Payne aj., 1994). Geneze těchto megavakuol spočívá nejpravděpodobněji v přímém splynutí oddělených vezikul pocházejících z částí ER. Napovídá tomu fakt, že mezi četností výskytu megavakuol a četností výskytu dilatovaných cisteren ER byl pozorován inverzní vztah. Megavakuoly nebyly pozorovány u apoptotických PMN *in vivo*, ale pouze *in vitro*. Neznamená to však, že u apoptotických PMN *in vivo* megavakuoly nevznikají, neboť rychlá fagocytóza apoptotických buněk makrofágy může vytvoření megavakuol zabránit (Payne aj., 1994). Další změnou ultrastruktury apoptotické buňky je shromažďování cytoskeletárních filament do seskupených svazků, často umístěných paralelně s buněčným povrchem. Ribozomální partikule vytvářejí polokrystalické formace. Ostatní buněčné organely zůstávají stále intaktní. Mitochondrie nevykazují žádné změny a cytoplazmatická membrána není propustná pro vitální barviva (Wyllie, 1981).

3.2. Druhá fáze

Ve druhé fázi apoptotických změn (která se může částečně překrývat s první fází) se objevuje zeiosis buněčného povrchu. S postupující kondenzací chromatinu nastává zkroucení až stočení jaderné a cytoplazmatické membrány. Tento stav poskytuje buňkám pěnivý nebo bublinkový vzhled (blebbing, často zvaný vnější pěnění). Zpěnění cytoplazmatické membrány je nejlépe pozorováno v rastrovacím elektronovém mikroskopu, zvláště u buněk s bohatou cytoplazmou (Allen aj., 1997). U zkroucených a stočených apoptotických buněk, v místech, kde k sobě přiléhají membrány, dochází k jejich přerušení. Jádro se většinou rozděluje a vytváří samostatné fragmenty kryté dvojvrstevným obalem (bývalou karyolemou).

Nakonec se apoptotické buňky rozdělí do fragmentů různé velikosti, do tzv. apoptotických tělísek, která jsou promptně odstraňována fagocytózou. Například u epiteliální výstelky fagocytózou intraepiteliálními makrofágy (Kerr a Searle, 1973; Walker aj., 1989). U apoptózy volných buněk, například PMN, hrají dominantní roli při fagocytóze apoptotických tělísek lokální makrofágy (Walker, 1987; Walker a Gobé, 1987; Savill aj., 1989a; Yamamoto aj., 1993; Cox aj., 1995; Hussain aj., 1998, Ishii aj., 1998; Meszaros aj., 1999).

3.3. Třetí fáze

V této fázi *in vivo* se obvykle apoptotická tělíska vyskytují ve fagosomech a fagolyzosomech fagocytujících buněk, kde dochází k progresivní degradaci reziduálních jaderných a cytoplazmatických struktur. Membrány apoptotických tělísek se ztrácejí a buněčné organely se stávají nerozpoznatelnými. Svým vzhledem tak připomínají typická reziduální tělíska ve fagocytujících buňkách. Někdy můžeme v transmisním elektronovém mikroskopu spatřit kolem fagocytovaných apoptotických tělísek hladkou linii. Dřívější fáze apoptózy buněk se dají rozpoznat podle jejich sférické kontury a intenzivně hyperchromatického, často fragmentovaného jádra (Walker, 1987; Walker a Gobé, 1987). Většina apoptotických tělísek ve tkáni, která jsou pozorována světelným mikroskopem, se nachází právě v tomto stadiu apoptotických změn. V kultuře *in vitro* se tato fáze apoptózy manifestuje rupturou cytoplazmatické membrány, a tím také propustností vitálních barviv (Payne aj., 1994). Tato fáze apoptózy se pak označuje jako tzv. sekundární nekróza. Se sekundární nekrózou se setkáváme rovněž *in vivo* v případě, kdy nejsou apoptotická tělíska bezprostředně fagocytována makrofágy. Tělíska pak podléhají pozvolným změnám ultrastruktury, které se manifestují především zduřením buněk, ztrátou buněčné integrity a denzity, rozpadem jádra a cytoplazmatické membrány a prasknutím a rozptýlením organel

(Wyllie, 1985; Cummings aj., 1997), což má za následek uvolnění prozánětlivých mediátorů.

Rychlost realizace morfologických změn dokumentuje fakt, že apoptotické buňky jsou ve tkáni rozpoznatelné relativně krátkou dobu, a to přibližně čtyři až devět hodin. Důvodem je skutečnost, že dochází k jejich velmi rychlé fagocytóze a následné destrukci uvnitř fagolyzosomů makrofágů (Arends a Wyllie, 1991; Allen aj., 1997).

4. BIOCHEMICKÁ CHARAKTERISTIKA APOPTÓZY

V současné době existuje relativně málo informací o biochemických procesech, které se realizují během apoptózy buněk. Tato skutečnost by neměla být až tak překvapující vzhledem k tomu, že například o biochemických procesech mitózy (oproti genetickým) existuje rovněž velmi málo informací, navzdory mnohem delšímu období poznávání tohoto procesu.

Dalším nedostatkem je skutečnost, že mnoho biochemických kroků v procesu apoptózy může být shodných s těmi, které probíhají v jiných buněčných reakcích. Tyto kroky je obtížné od sebe odlišit, a to s přihlédnutím k jejich zcela jiným úlohám.

Vyslovuje se předpoklad, že apoptóza je charakterizovaná specifickými biochemickými kroky, které ji odlišují mimo jiné od druhého významného typu buněčné smrti – nekrózy (Wyllie aj., 1980; Trump aj., 1981). K specifickým biochemickým krokům patří bezesporu translokace fosfatidylserinu (Zhang aj., 1997; Krahling aj., 1999) a fragmentace DNA (Wyllie aj., 1980; Allen aj., 1997).

4.1. Translokace fosfatidylserinu

Jak již bylo uvedeno, osudem apoptotických buněk je promptní fagocytóza makrofágy a jejich degradace ve fagolyzosomech, přičemž jsou apoptotické buňky fagocytovány ještě před tím, než u nich dojde k ruptuře intaktní cytoplazmatické membrány. Vzhledem k tomuto faktu by měl program buněčné smrti provést na povrchu cytoplazmatické membrány takové změny, které by umožnily tyto buňky rychle rozpoznat a eliminovat. Samozřejmě, že se tak i děje a tyto změny se objevují u buněk podstupujících apoptózu již velmi časně (Andree aj., 1990; Fadok aj., 1992; Creutz, 1992; Zhang aj., 1997; Stuart aj., 1998; van England aj., 1998).

Nedávné studie naznačují, že rozhodující roli zde hraje fosfatidylserin (dále PS), základní složka cytoplazmatické membrány, umístěný na její vnitřní vrstvě (Fadok aj., 1992; Koopman aj., 1994; Martin aj., 1995). Přemístění (translokace) PS z vnitřní vrstvy na vnější vrstvu cytoplazmatické membrány lymfocytů, podstupujících apoptózu, umožňuje podle autorů Fadok aj. (1992) a Krahling aj. (1999) poznání těchto buněk makrofágy a jejich následné odstranění fagocytózou. Při studiu dynamiky apoptózy, zvláště u murinních a humánních buněk, představuje translokace PS relativně časný děj (Martin aj., 1995; Stuart aj., 1998). Tohoto faktu se využívá k detekci apoptózy *in vitro* pomocí fluorescein-konjugovaného annexinu V (Koopman aj., 1994; Zhang aj., 1997; Stuart aj., 1998; van England aj., 1998). Annexin V představuje protein, který má vysokou přirozenou afinitu k PS, a proto se váže s translokovaným PS, čímž umožňuje detekci raného stadia apoptózy buněk ve tkáni (Martin aj., 1995; Zhang aj., 1997).

Přesto, že translokace PS je v největší míře prostudována u transformovaných buněk, popřípadě u lymfocytů B (Koopman aj., 1994; Homburg aj., 1995; Krahling aj., 1999) a thymocytů, předpokládá se, že se realizuje rovněž i u ostatních druhů buněk (Stuart aj., 1998).

Kromě PS existují další povrchové molekuly, které jsou rovněž nepochybně důležité při rozpoznání a následné fagocytóze apoptotických buněk makrofágy (viz níže). Zvláště v případě PMN používají makrofágy na svém povrchu komplex trombospondin-$\alpha_v\beta_3$ (vitronectin receptor) CD36 (Savill aj., 1989a; Savill aj., 1990; Haslett aj., 1994). Identifikace, funkce a význam dalších povrchových molekul apoptotických buněk v procesu apoptózy je v současné době předmětem studia (Ren a Savill, 1998).

4.2. Fragmentace DNA

Jedna z nejčasnějších rozpoznatelných změn vedoucích k ireverzibilní apoptotické buněčné smrti je aktivace nelyzosomální kalcium-dependentní endonukleázy následované fragmentací DNA (Wyllie aj., 1980). Přesné načasování fragmentace DNA vzhledem k translokaci PS nebylo zpočátku známo. V současné době je zřejmé, že expozice PS se uskutečňuje ještě před samotnou fragmentací DNA (Zhang aj., 1997; Stuart aj., 1998).

Fragmentace DNA probíhá ve dvou na sebe navazujících krocích. Nejprve se DNA rozštěpí na páry fragmentů o velikosti 300 kilobazí, poté na 50 kilobazí zdvojených fragmentů, a tím se vytvoří úseky oligonukleosomální velikosti přerušené v lineárních úsecích DNA mezi nukleosomy (Oberhammer aj., 1993). Marginace chromatinu vůči obalu jádra pravděpodobně koreluje s tímto prvním krokem (Earnshaw, 1995) a kandidátní nukleázou se jeví topoisomeráza II (Earnshaw, 1995). Mezi nukleosomy těchto fragmentů dojde v druhém kroku k dalšímu ataku endonukleáz, deoxyribonukleázy I (Peitsch aj., 1993) a deoxyribonukleázy II (Barry a Eastman, 1993). To má za následek vznik formace DNA fragmentů o velikosti 180 až 200 párů bazí (Martin aj., 1994).

U PMN bylo oproti thymocytům prokázáno, že endonukleázy štěpící DNA jsou na Ca^{2+} a Mg^{2+} nezávislé, neboť fragmentace DNA *in vitro* probíhá v médiu i při nízké koncentraci těchto iontů (Fernandes a Cotter, 1993).

Jestliže je takto fragmentovaná DNA separována pomocí agarové gelové elektroforézy a obarvena etidium

bromidem, můžeme pozorovat v ultrafialovém záření charakteristický „žebříček" fragmentů o velikosti 180 až 200 párů bazí (Wyllie aj., 1980).

Rychlá, pravidelná fragmentace jaderné DNA je již dlouho považována za biochemický znak apoptózy (Wyllie aj., 1980). Nicméně tento znak neprovází apoptózu vždy (Collins aj., 1992). Fragmentace mitochondriální DNA nebyla u apoptotických buněk pozorována (Murgia aj., 1992).

Při nekróze buněk dochází rovněž ke štěpení jaderné DNA, ale probíhá na úrovni degradace histonů, a proto je výsledkem elektroforézy difuzní skvrna DNA. Dále jsou nekrotické DNA fragmenty větší, a proto je jich méně, než u apoptotického štěpení DNA (Afanas'ev aj., 1986; Duvall a Wyllie, 1986).

4.3. Konečné biochemické znaky apoptózy

U buněk podstupujících apoptózu jsou zaznamenány dramatické morfologické změny, které jsou odpovědné za alteraci cytoskeletárních elementů a rozsáhlou proteinázovou aktivitu v cytoplazmě (Fesus aj., 1987; Allen aj., 1997). Charakteristické buněčné svraštění není ještě zcela vysvětleno, ale zdá se, že souvisí se ztrátou osmoticky aktivního chloridu draselného. Nasvědčuje tomu skutečnost, že se po ztrátě buněčné tekutiny neobjevuje u apoptotických buněk žádné kompenzační prosáknutí. Další z možných vysvětlení představuje kontrakce cytoskeletárních elementů, která vede k vzestupu osmotického tlaku uvnitř buněk s následnou extruzí buněčné tekutiny do extracelulárního prostoru. Rovněž změny v uspořádání cytoskeletárních struktur apoptotické buňky se budou pravděpodobně podílet na zpěnění plazmalemy (Squier aj., 1995). Cotter aj. (1992) uvádějí, že k fragmentaci buněk do apoptotických tělísek je potřebný přesun mikrofilament, neboť inhibice přesunu aktinových filament zabraňuje u různých buněčných populací apoptóze (Martin a Cotter, 1990). Existují však i údaje, že inhibice přesunu aktinových filament naopak apoptózu způsobuje (Kolber aj., 1990).

Skutečnost, že apoptotická tělíska nelýzují *in vivo* má dvě hlavní příčiny. Za prvé udržení membránové integrity apoptotických tělísek a za druhé jejich rychlé rozpoznání a pohlcení makrofágy (Allen aj., 1997). Podle autorů Fesus aj. (1991a) hraje v udržení membránové integrity důležitou roli enzym tkáňová transglutamináza (dále tTG), která se účastní na formaci povrchových protuberancí a v udržení intracelulárních komponent v buňce. tTG je vlastně jedním z nástrojů apoptotického programu buňky. Důkazem je její zvyšující se hladina v buňkách podléhajících apoptóze (Fesus aj., 1987; Fesus a Thomazy, 1988; Piacentini aj., 1991a) a rovněž její nejvyšší koncentrace v apoptotických tělíscích (Piacentini aj., 1991b). Jakmile se u apoptotických buněk začnou formovat povrchové protuberance, vzestup tTG aktivity vede k formaci proteinových polymerů, které pak vytvářejí relativně pevnou strukturu apoptotických tělísek. Funkcí těchto polymerů je zachování integrity apoptotických tělísek a zabránění exocytózy jejich obsahu do extracelulárního prostoru až do okamžiku pohlcení makrofágy (Fesus aj., 1991a, b).

5. GENETICKÁ REGULACE APOPTÓZY

Apoptóza představuje program buněčné smrti, který je zahrnut v procesu programované buněčné smrti. Nasvědčuje tomu skutečnost, že apoptotické změny u mnoha rozdílných druhů buněk probíhají téměř stejně a zároveň existuje výrazná podobnost buněčných reakcí na mnoho odlišných iniciátorů apoptózy (Squier aj., 1995). Genetická regulace apoptózy je v současné době neúplně determinovaná (Matzstein aj., 1998; Horvitz, 1999). Avšak, při studiu biochemismu apoptózy na molekulární úrovni se genetickými analýzami prokázaly u hlístice *Ceanorhabditis elegans* pozitivní a negativní regulátory apoptózy (Ellis aj., 1991). Jedná se o geny: ced-3, ced-4 a ced-9, které kódují proteiny potřebné v hlavním apoptotickém programu *C. elegans*. Přitom apoptóza je inhibována produktem genu ced-9, zatímco proteiny kódované geny ced-3 a ced-4 jsou pro realizaci apoptotického programu nezbytné.

Gen ced-3 představuje nejdůležitější gen v procesu apoptózy a kóduje protein, který je homologní se savčím interleukin-1β-konvertujícím enzymem (dále ICE). Gen ced-9 kóduje protein, který je strukturálně a funkčně homologní s bcl-2, s genem, který hraje rovněž roli v regulaci apoptózy. Gen ced-4 kóduje protein, který je homologní s nedávno objeveným humánním proteinem Apaf-1 (Zou aj., 1997; Cecconi aj., 1998). Platí, že ICE negativně reguluje bcl-2, který inhibuje apoptózu. K inhibici apoptózy potřebuje bcl-2 další apoptózu podporující protein Apaf-1 (Wong, 1998).

K nejlépe poznaným savčím genům uplatňujícím se v procesu apoptózy v současné době patří zejména bcl-2, c-myc a p53.

Bcl-2 je jedním ze skupiny genů, které jsou zahrnuty v regulaci apoptózy, přičemž podporují přežití buněk, nikoliv jejich smrt (Korsmeyer, 1994). V poslední době byly identifikovámy bcl-2 příbuzné geny, například bax, bcl-xmcl1, E1B, LMW5-HL (u viru afrického moru prasat) a BHRF1 (u viru Epstein-Barrové) (Basu a Haldar, 1998). Bcl-2 protein formuje heterodimer s proteinem bax, který jako bcl-2 bax inhibuje apoptózu, zatímco homodimer bax-bax ji indukují (Oltvai aj., 1993). Dalším členem této skupiny je anti-apoptotický bcl-x1 (Boise aj., 1993). U PMN byla zaznamenána diferenciální exprese proteinů bcl-x1 a bax-α při indukci a prevenci apoptózy cytokiny. Zatímco indukce apoptózy PMN pomocí tumor necrosis factor-alfa (dále TNF-α) je spojena s redukcí apoptózy cytokiny. Zatímco indukce apoptózy PMN pomocí tumor necrosis factor -alfa (dále TNF-α je spojena s redukcí exprese anti--apoptotického bcl-x1 proteinu, prevence apoptózy PMN pomocí GM-CSF vede ke snížení exprese pro-apoptotického bax-α proteinu (Weinmann aj., 1999).

C-myc je spojen s buněčnou proliferací, neboť jeho expresi potlačují růstové faktory (Prendergarst, 1999). Ztráta těchto růstových faktorů je doprovázena zastave-

ním růstu a proliferace buněk a nebo indukcí apoptózy u buněk s vysokou expresí c-myc (Hoffmann a Liebermann, 1998; Prendergarst, 1999).

Dalším rozhodujícím důležitým genem v indukci apoptózy je p53. Tento gen má úzkou spojitost s poškozením DNA, zvláště u buněk vystavených ultrafialovému nebo gamma záření. V tomto případě se hromadí p53 protein a buněčná proliferace je zastavena v G1 fázi buněčného cyklu (Amundson aj., 1998; Choisy-Rossi aj., 1998). Tento mechanismus poskytuje buňkám čas pro opravu poškození DNA. Nedojde-li k realizaci zdařilé opravy DNA, buňky podstupují apoptózu (Steele aj., 1998; Mercer, 1998; Kaelin, 1999).

Stejný sled a funkce genů kódujících proteiny programované buněčné smrti u výše zmíněných nematod a savců naznačují, že apoptóza má evolučně velmi starý původ. Tomu rovněž odpovídá i skutečnost, že jak červi, tak savci používají podobný mechanismus selektivního odstraňování buněk (Kiechle a Zhang, 1998). Nicméně, mechanismus programované buněčné smrti savců je nepoměrně složitější než u nematod. Od doby poznání podobnosti mezi genem ced-3 a ICE, bylo navíc identifikováno devět proteáz vztahujících se k ICE (Wong, 1998). Celá tato skupina proteinů dostala triviální název: caspaza (Cohen, 1997); podrobněji referují Wong (1998), Porter a Janicke (1999) a Salvesen (1999).

6. OSUD EXTRAVAZÁLNÍCH PMN

Jak již bylo uvedeno v úvodu, k zachování rovnovážného stavu v krvi je denní vysoká produkce nových PMN vyvážena jejich migrací do tkání těla. Zralé PMN jsou například u člověka vyplavovány z kostní dřeně v relativně obrovském počtu, a to přibližně 10 miliónů za minutu (Cotter aj., 1990). Proto je nezbytné, aby z krve PMN vystoupily do tkání, a tak byl v relativně krátkém čase počet buněk v krvi vyrovnán (Fliedner aj., 1964; Aune aj., 1967).

PMN obsahují ve svých granulích velké množství činitelů, jež mají potenciál k ničení patogenů. Mezi tyto činitele patří lyzozym, laktoferin, defenziny, katepsin G, myeloperoxidáza, peroxid vodíku, superoxidový a hydroxylový radikál a další (Stites a Terr, 1994). Zároveň však uvedení činitelé ničí samotnou tkáň a podílejí se na tvorbě chemotaktických proteinů (Vartio aj., 1981).

Zejména ve zdravé tkáni podléhají PMN apoptóze provázené charakteristickými morfologickými a biochemickými vlastnostmi (Savill aj., 1989a; Grigg aj., 1991; Savill aj., 1992; Yamamoto aj., 1993; Cox aj., 1995; Hussain aj., 1998; Ishii aj., 1998). Přitom dochází u apoptotických PMN i ke snížení intenzity buněčných funkcí (Haslett aj., 1991; Whyte aj., 1993; Narayanan aj., 1997). Tato redukce funkce je významným činitelem regulace zánětlivého procesu, neboť apoptotické PMN ztrácejí kapacitu k vytváření a uvolňování histotoxických produktů. Existuje tedy přímá souvislost mezi apoptózou a ztrátou celé řady fundamentálních funkcí PMN jako jsou chemotaxe, fagocytóza, degranulace a respirační vzplanutí (Squier aj., 1995). Tyto morfologické a biochemické, pro apoptózu PMN specifické, vlastnosti byly *in vivo* u PMN poprvé pozorovány v průběhu akutního zánětu kloubu (Savill aj., 1989a), dále v plicích novorozenců (Grigg aj., 1991), při zánětech ledvin (Savill aj., 1992), při experimentálně indukované peritonitidě morčat (Yamamoto aj., 1993), při experimentálně indukované pneumonii potkanů (Cox aj., 1995; Hussain aj., 1998; Ishii aj., 1998), v modelu experimentálního poranění u potkanů (Meszaros aj., 1999) a rovněž v dutinovém systému juvenilní mléčné žlázy skotu (Sládek a Ryšánek, 1999).

7. ODSTRANĚNÍ APOPTOTICKÝCH PMN MAKROFÁGY

Odstraňování nepotřebných PMN ze zdravé tkáně i z místa zánětu bez uvolnění škodlivého obsahu granulí je přičítáno lokálním makrofágům. Na tento fakt upozornil před více než sto lety jako první Mečnikov (1891). V místě experimentálně indukovaného zánětu pozoroval makrofágy obsahující zbytky fagocytovaných PMN. Newman aj. (1982) rozšířili toto pozorování demonstrací, že z monocytů odvozené makrofágy a makrofágy zánětu rozpoznávají a pohlcují staré, nikoliv čerstvé krevní PMN. Následně Savill aj. (1989a) udávají, že fagocytóza starých PMN makrofágy vysoce koreluje s výskytem apoptózy u PMN.

Tyto skutečnosti vyvolávají zajímavou otázku, a to: jak poznají makrofágy, že PMN jsou apoptotické a proto jsou zralé pro fagocytózu? Rozpoznání a následná fagocytóza apoptotických PMN vyžaduje zapojení receptorů makrofágů k ligandám umístěným na cytoplazmatické membráně apoptotických PMN (Savill, 1992). Za rozpoznání a následnou fagocytózu apoptotických PMN se zdají být odpovědné víceré receptory umístěné na povrchu fagocytů (Savill, 1997). Pro rozpoznávání apoptotických PMN makrofágy a jejich párování s ligandami PMN byly popsány tři z těchto receptorů. Jsou to páry receptor-liganda: lektin, integrin, specifický lipidový receptor a „scavenger" receptor (Fadok aj., 1998). Ačkoliv nejsou v současné době plně charakterizovány, lektin demonstruje specifitu pro monosacharidy, zahrnující A-acetylglukosamin nebo glukosamin (Duvall aj., 1985; Savill aj., 1989b). Integrin prezentuje komplex podle všeho složený z CD36 (Puente-Navazo aj., 1996) a z $\alpha_v\beta_3$-integrinu specifického pro vitronektin (Savill aj., 1990). Lipidový receptor je specifický pro fosfatidylserin (Ramprasad aj., 1995). Proto po translokaci PS dochází ke ztrátě normální membránové asymetrie, což vede k rozpoznání apoptotických PMN specifickým PS receptorem; podrobně referuje Savill (1997).

8. MODULACE APOPTÓZY PMN

Apoptóza PMN je indukována stimuly, které spouštějí intracelulární reakce, jež pak rezultují v tento cha-

rakteristický typ buněčné smrti. Na druhé straně však existují inhibitory apoptózy, které alterují apoptotický program, a tím prodlužují PMN život. Je tedy zřejmé, že délka života PMN ve tkáni bude velmi úzce spjata s působením těchto faktorů.

Již zmíněná existence induktorů a inhibitorů apoptózy PMN naznačuje nejen možnost regulace délky života těchto buněk, ale rovněž i možnost regulace poměru obou typů smrti PMN ve tkáni. Pro závažnost využití regulace apoptózy PMN, zvláště v terapii zánětu, je v současné době velmi intenzivně studována.

8.1. Inhibice apoptózy PMN

Aktivní život PMN ve tkáni může být prodloužen (Lee aj., 1993). Tato prolongace životnosti například poskytuje čas pro rekrutované monocyty, které jsou neaktivované, a proto ještě neschopné fagocytovat apoptotické PMN, a to až do doby jejich diferenciace ve fagocytárně kompetentní makrofágy (Newman aj., 1982; Savill aj., 1990).

Mezi nejdůležitější inhibitory apoptózy PMN patří například růstové faktory, cytokiny, bakteriální produkty, změny mikroenvironmentu tkáně, imunitní komplexy aj.

Z růstových faktorů se na inhibici apoptózy PMN podílí zejména granulocyt-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), a to jak u spontánní apoptózy PMN (Brach aj., 1992; Colotta aj., 1992; Cox aj., 1992; Hu a Yasui, 1997; Tortorella aj., 1998), tak i u apoptózy PMN indukované ozářením (Sweeney aj., 1997, 1999). Mimo to inhibuje produkci reaktivního kyslíkového systému, který indukuje apoptózu PMN (Fanning aj., 1999).

Dalšími růstovými faktory s inhibičním účinkem na apoptózu PMN jsou granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) (Cox aj., 1992; Yamamoto aj., 1993; Hu a Yasui, 1997; Ertel aj., 1999; Fanning aj., 1999) a nerve growth factor (NGF) (Kanan aj., 1992).

Nejen růstové faktory kontrolují buněčnou proliferaci a maturaci, ale rovněž cytokiny se významně podílejí na prolongaci životnosti PMN. Mezi nejdůležitější z nich patří interleukin-2, interleukin-6, interleukin-8, interleukin-1β a γ-interferon (Colotta aj., 1992; Gomez aj., 1998; Leuenrot aj., 1998; Xing aj., 1998; Caswell aj., 1999).

Z bakteriálních produků byl zaznamenán inhibiční účinek lipopolysacharidu na spontánní apoptózu PMN *in vitro* (Haslett aj., 1991; Colotta aj., 1992; Yamamoto aj., 1993; Watson aj., 1997) a *in vivo* (Yamamoto aj., 1993; Watson aj., 1997), a rovněž na ozářením indukovanou apoptózu PMN *in vitro* (Sweeney aj., 1997).

Mikroenvironment tkáně, popřípadě zánětu, se významným podílem účastní na prodloužení života PMN. Například hemoragie nebo endotoxemie prokazatelně oddalují apoptózu PMN (Parsey aj., 1999), stejně tak jako přítomnost enterotoxinu *Staphylococcus aureus* ve tkáni (Moulding aj., 1999). Rovněž nižší pH oddaluje nástup apoptózy PMN (Leblebicioglu a Walters, 1999).

Yamamoto aj. (1992) uvádějí, že sérum (zvláště jeho frakce bohatá na globulin) potlačuje *in vitro* karyopyknózu PMN a jejich ingesci makrofágy u morčat. Gamberale aj. (1998) dále doplňují vliv některých druhů imunitních komplexů (například horkem agregovaný IgG a některé rozpustné imunitní komplexy) na oddálení apoptózy PMN.

8.2. Indukce apoptózy PMN

Jak již bylo uvedeno, v místě zánětu i ve zdravé tkáni musí dojít k odstraňování přebytečných PMN. Potlačení desintegrace PMN nekrózou je zprostředkováno apoptózou. Mezi nejdůležitější induktory apoptózy patří cytokiny, imunitní komplexy, některé bakterie a viry, podmínky pH mikroenvironmentu tkáně aj.

Cytokiny indukující apoptózu jsou zastoupeny zejména TNF-α (Colotta aj., 1992; Takeda aj., 1993; Yamashita aj., 1999) a interleukin-10 (Cox, 1996; Keel aj., 1997; Cassatella, 1998). TNF-α mimo jiné u PMN rovněž indukuje intracelulární produkci reaktivního kyslíkového systému (peroxid vodíku, kyslíkový anion a hydroxylový radikál), který indukuje apoptózu PMN (Oishi a Machida, 1997; Rollet-Labelle aj., 1988; Yamashita aj., 1999).

Sražené imunitní komplexy a antigenem pokryté erytrocyty stimulují apoptózu PMN (Gamberale aj., 1998).

Opsonizovaná a neopsonizovaná bakterie *Escherichia coli* akceleruje apoptózu PMN (Colamussi aj., 1999) v kontrastu s jejím produktem lipopolysacharidem, který naopak apoptózu PMN oddaluje (viz výše). Leukotoxin *Pasteurella haemolytica* indukuje apoptózu PMN *in vitro* (Stevens a Czuprynski, 1996) stejně jako *Haemophilus sommus* (Yang aj., 1998). *Mycobacterium leprae* akceleruje apoptózu PMN tak, že při stimulaci touto bakterií PMN secernují interleukin-8 a TNF-α (Oliveira aj., 1999). Z virů se na akceleraci apoptózy PMN podílejí například influenza A virus (Colamussi aj., 1999).

Změny pH mikroenvironmentu tkáně rovněž významně ovlivňují apoptózu PMN. Podle autorů Leblebicioglu a Walters (1999) podléhají po kultivaci *in vitro* PMN apoptóze v prokazatelně větší míře v zásaditém prostředí, než v kyselém prostředí. Kyselé prostředí však také negativně ovlivňuje fagocytózu apoptotických PMN makrofágy (Haslett aj., 1994).

Činitelé indukce a inhibice apoptózy, jejich četnost a vzájemné interakce vyvolávají představu složitého systému, který nelze jednoduše popsat. Proto informace shrnuté v této kapitole jsou jen ilustrativní.

9. ZÁVĚR

O apoptóze buněk myeloidní řady byly za posledních deset let publikovány stovky prací. Nejen počet, nýbrž i šíře studia tohoto významného biologického fenomenu neumožňují pojednat tuto problematiku v celém rozsahu. Proto toto review zaměřuje pozornost na apoptózu PMN. Apoptóza PMN *in vivo* byla dosud studována na klinickém materiálu člověka a experimentál-

ních modelech zvířat zejména se zaměřením na možnosti ovlivnění rezoluce zánětu. Tento aspekt je natolik závažný, že by měl být zahrnut do experimentálních prací zaměřených na patogenezi zánětu mléčné žlázy skotu.

10. LITERATURA

Afanas'ev V. N., Korol B. A., Mantsygin Y. A., Nelipovich P. A., Pechatnikov V. A., Umansky S. R. (1986): Flow cytometry and biochemical analysis of DNA degradation characteristic of two types of cell death. FEBS Lett., *194*, 347–350.

Alison M. R., Sarraf C. E. (1992): Apoptosis: a gene directed programme of cell death. J. Roy. Coll. Phys. Lond., *26*, 25–35.

Allen R. T., Hunter I. W. J., Argawal D. K. (1997): Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. J. Pharmacol. Toxicol., *37*, 215–228.

Amundson S. A., Myers T. G., Fornace A. J. (1998): Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. Oncogene, *17*, 3287–3299.

Andree H. A., Reutelingsperger C. P., Hauptmann R., Hemker H. C., Hermens W. T., Wilems G. M. (1990): Binding of vascular anticoagulant alpha (VAC-alpha) to planar phospholipid bilayers. J. Biol. Chem., *265*, 4923–4928.

Arends M. J., Wyllie A. H. (1991): Apoptosis: Mechanisms and roles in pathology. Int. Rev. Exp. Pathol., *32*, 223–254.

Aune J. M., Gantner G. E., Wade N. J. (1967): Sequence of events terminating in death of leukocytes. Brit. J. Haematol., *13*, 815–821.

Barry M. A., Eastman A. (1993): Identification of deoxyribonuclease II as an endonuclease involved apoptosis. Arch. Biochem. Biophys., *300*, 440–450.

Basu A., Haldar S. (1998): The relationship between bcl-2, bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. Mol. Hum. Reprod., *4*, 1099–1109.

Beauvais F., Michel L., Dubertret L. (1995): Human eosinophils in culture undergo a striking and rapid shrinkage during apoptosis. J. Leukoc. Biol., *57*, 851–855.

Boise L. H., Gonzáles-Garcia M., Postema C. E. (1993): Bcl-x, a bcl-2-regulated gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. Cell, *77*, 597–608.

Brach M. A., Devos S., Gruss H. J., Herrmann F. (1992): Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. Blood, *80*, 2920–2924.

Cassatella M. A. (1998): The neutrophil: one of the cellular targets of interleukin-10. Int. J. Clin. Lab. Res., *28*, 148–161.

Caswell J. L., Middleton D. M., Gordon J. R. (1999): Production and functional characterization of recombinant bovine interleukin-8 as a specific neutrophil activator and chemoattractant. Vet. Immunol. Immunopathol., *67*, 327–340.

Cecconi F., Alvarez-Bolado G., Meyer B. I., Roth K. A., Gruss P. (1998): Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. Cell, *18*, 727–737.

Choisy-Rossi C., Reisdorf P., Yonish-Rouach E. (1998): Mechanisms of p53-induced apoptosis: in search of genes which are regulated during p53-mediated cell death. Toxicol. Lett., 102–103, 491–496.

Cohen G. M. (1997): Caspases: the executiones of apoptosis. Biochem. J., *326*, 1–8.

Colamussi M. L., White M. R., Hartshorn K. L. (1999): Influenza A virus accelerates neutrophil apoptosis and markedly potentiates apoptotic effect of bacteria. Blood, *93*, 2395–2403.

Collins R. J., Harmon B. V., Gobé G. C., Kerr J. F. R. (1992): Internucleosomal DNA cleavage should not be the sole criterion for identifying apoptosis. Int. J. Radiat. Biol., *61*, 451–453.

Colotta F., Re F., Polentarutti N., Sozzani S., Mantovani A. (1992): Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokinines and bacterial products. Blood, *80*, 2012–2020.

Cotter T. G., Lennon S. V., Glynn J. M., Martin S. J. (1990): Cell death via apoptosis and its relationship to growth, developement and differentiation of both tumor and normal cell. Anticancer Res., *10*, 1153–1160.

Cotter T. G., Lennon S. V., Glynn J. M., Green D. R. (1992): Microfilament-disrupting agents prevent the formation of apoptotic bodies in tumor cell undergoing apoptosis. Cancer Res., *52*, 997–1005.

Cooter T. G., Fernandes R. S., Verhaegen S., McCarthy J. V (1994): Cell death in the myeloid lineage. Immunol. Rev., *142*, 93–112.

Cox G. (1996): IL-10 enhances resolution of pulmonary inflammation *in vivo* by promoting apoptosis of neutrophils. Am. J. Physiol., *271*, 566–571.

Cox G., Gauldie J., Jordana M. (1992): Bronchial epithelial cell-derived cytokinines (G-CSF and GM-CSF) promote the survival of peripheral blood neutrophils *in vitro*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., *7*, 507–513.

Cox G., Crossley J., Xing Z. (1995): Macrophage engulfement of apoptotic neutrophils contributes to the resolution of acute pulmonary inflammation *in vivo*. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., *12*, 232–237.

Creutz C. E. (1992): The annexins and exocytosis. Science, *258*, 924–931.

Duvall E., Wyllie A. H. (1986): Death and the cell. Immunol. Today, *7*, 115–119.

Duvall E., Wyllie A. H., Morris R. G. (1985): Macrophage recognition of cell undergoing apoptosis. Immunol. Today, *14*, 131–136.

Earnshaw W. C. (1995): Nuclear changes in apoptosis. Curr. Opin. Cell Biol., *7*, 337–343.

Ellis R. E., Yuan J. Y., Horvitz H. R. (1991): Mechanisms and function of cell death. Annu Rev. Cell Biol., *7*, 663–670.

Ertel W., Keel M., Buergi U., Hartung T., Imhof H. G., Trentz, O. (1999): Granulocyte colony-stimulating factor inhibits neutrophil apoptosis at the local site after severe head and thoracic injury. J. Trauma, *46*, 784–792.

Fadok V. A., Voelker D. R., Campbell P. A., Cohen J. J., Bratton D. L., Henson P. M. (1992): Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes

triggers specific recognition and removal by macrophages. J. Immunol., *148*, 2207–2216.

Fadok V. A., Warner M. L., Bratton D. L., Henson P. M. (1998): CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor (alpha v. beta 3). J. Immunol., *161*, 6250–6257.

Fanning N. F., Kell M. R., Shorten G. D., Kirwan W. O., Bouchier-Hayes D., Cotter T. G., Redmont H. P. (1999): Circulating granulocyte colony-stimulating factor in plasma of patients with the systemic inflammatory response syndrome delays neutrophil apoptosis through inhibition of spontaneus reactive oxygen species generation. Shock, *11*, 167–174.

Fernandes R. S., Cotter T. G. (1993): Activation of calcium magnesium independent endonuclease in human leukemic cell apoptosis. Anticancer Res., *13*, 1253–1259.

Fernandes-Alnemri T., Litwach G., Alnemri E. S. (1994): CPP32 a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein ced-3 and mammalian interleukin-1 β-converting enzyme. J. Biol. Chem., *269*, 30761–30764.

Fesus L., Thomazy V. (1988): Searching for the function of tissue transglutaminase: its possible involement in the biochemical pathway of programmed cell death. Adv. Exp. Med. Biol., *231*, 119–134.

Fesus L., Thomazy V., Falus A. (1987): Induction and activation of tissue transglutaminase during programmed cell death. FEBS Lett., *224*, 104–108.

Fesus L., Davies P. J. A., Piacentini M. (1991a): Apoptosis: molecular mechanismus in programmed cell death. Eur. J. Cell Biol., *56*, 170–177.

Fesus L., Tarcsa E., Kedei N., Autuori F., Piacentini M. (1991b): Degradation of cell dying by apoptosis led to accumulation of epsilon (gamma-glutamyl) lysine isodipeptide in culture fluid and blood. FEBS Lett., *284*, 109–112.

Fliedner T. M., Cronkite E. P., Robertson J. S. (1964): Granulocytopoiesis. I. Senescence and random loss of neutrophilic granulocytes in human beings. Blood, *24*, 402–414.

Gamberale R., Giordano M., Trevany A. S., Andonegui G., Geffner J. R. (1998): Modulation of human neutrophil apoptosis by immune complexes. J. Immun., *161*, 3666–3674.

Gomez J., Gonzalez A., Martinez A. C., Rebollo A. (1998): IL-2-induced cellular events. Crit. Rev. Immunol., *18*, 185–220.

Grigg J. M., Savill J. S., Sarraf C., Haslett C., Silverman M. (1991): Neutrophil apoptosis and clearance from neonatal lungs. Lancet, *338*, 720–722.

Gumienny T. L., Lambie E., Hartwieg E., Horvitz H. R., Hengartner M. O. (1999): Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. Development, *126*, 1011–1022.

Haanen C., Vermes I. (1995): Apoptosis and inflammation. Mediat. Inflamm., *4*, 5–15.

Haslett G., Lee A., Savill J. S., Meagher L., Whyte M. K. B. (1991): Apoptosis (programmed cell death) and functional changes in aging neutrophils: modulation by inflamatory mediators. Chest, *99*, 6.

Haslett G., Savill J. S., Whyte M. K. B., Stern M., Dransfield I., Meagher L. C. (1994): Granulocyte apoptosis and the control of inflammation. Philos. T. Roy. Soc. B, *345*, 327–333.

Hengartner M. O., Horvitz H. R. (1994): *C. elegans* cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. Cell, *76*, 665–676.

Hiramine Ch. (1997): Definition and morphological features of apoptosis. Jpn. J. Clin. Pathol., *45*, 459–469.

Hoffman B., Liebermann D. A. (1998): The proto-oncogene c-myc and apoptosis. Oncogene, *17*, 3351–3357.

Homburg C. H. E., Roos D. (1996): Apoptosis of neutrophils. Curr. Opin. Hematol., *3*, 94–99.

Homburg C. H. E., de Haas M., von dem Borne A. E., Verhoeven A. J., Reutelingsperger C. P., Roos D. (1995): Human neutrophils lose their surface Fc gamma RIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis *in vitro*. Blood, *85*, 532–540.

Horvitz H. R. (1999): Genetic control of programmed cell death in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Cancer Res., *59*, 1701–1706.

Hu B., Yasui K. (1997): Effects of colony-stimulating factors (CSFs) on neutrophil apoptosis: possible roles at inflammation site. Int. J. Hematol., *66*, 179–188.

Hussain N., Wu F., Zhu L., Thrall R. S., Kresch M. J. (1998): Neutrophil apoptosis during the developement and resolution of oleic acid-induced acute lung injury in the rat. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., *19*, 867–874.

Ishii Y., Hashimoto K., Nomura A., Sakamoto T., Uchida Y., Ohtsuka M., Hasegawa S., Sagai M. (1998): Elimination of neutrophils by apoptosis during the resolution of acute pulmonary inflammation in rats. Lung, *176*, 89–98.

Kaelin W. G. (1999): The emerging p53 gene family. J. Natl. Cancer Inst., *91*, 594–98.

Kanan Y., Usami K., Okada M., Shimuzu S., Matsuda H. (1992): Nerve growth factor suppresses apoptosis of murine neutrophils. Biochem. Biophys. Res. Commun., *186*, 1050–1056.

Keel M., Ungethum U., Steckholzer U., Niederer E., Hartung T., Trentz O., Ertel W. (1997): Interleukin-10 counterregulates proinflammatory cytokine-induced inhibition of neutrophil apoptosis during severe sepsis. Blood, *90*, 3356–3363.

Kerr J. F. R., Searle J. (1973): Deletion of cells by apoptosis during castration-induced involution of the rat prostate. Virchows Arch. B, *13*, 87–102.

Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Brit. J. Cancer, *68*, 239–257.

Kerr J. F. R., Winterford C. M., Harmon B. V. (1994): Morphological criteria for identifying apoptosis. In: Celis J. E. (ed.): Cell Biology: a laboratory handbook. New York, Academic Press. 319–329.

Kiechle F. L., Zhang X. (1998): Apoptosis: a brief review. J. Clin. Lig. Ass., *21*, 58–61.

Kolber M. A., Broschat K. O., Landa-Gonzales B. (1990): Cytochalasin B induces cellular DNA fragmentation. FASEB J., *4*, 3021–3027.

Koopman G., Reutelingsperger C. P., Kuijten G. A., Keehnen R. M., Pals S. T., van Oers M. H. (1994): Annexin V for

flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood, *84*, 532–540.

Korsmeyer S. J. (1995): Regulators of cell death. T.I.G., *11*, 101–105.

Krahling S., Callahan M. K., Williamson P., Schlegel R. A. (1999): Exposure of phosphatidylserine is a general feature in the phagocytosis of apoptotic lymphocytes by macrophages. Cell Death Differ., *6*, 183–189.

Leblebicioglu B., Walters J. (1999): Alkaline conditions accelerate polymorphonuclear leukocyte apoptosis *in vitro*. Infect. Immun., *67*, 2019–2021.

Lee A., Whyte M. K. B., Haslett C. (1993): Inhibition of apoptosis and prolongation of neutrophil functional longevity by inflammatory mediators. J. Leukoc. Biol., *54*, 283–288.

Leuenrot S., Lee C., Grutkoski P., Keeping H., Simms H. H. (1998): Interleukin-8-induced suppression of polymorphonuclear leukocyte apoptosis is mediated by suppressing CD95 (Fas/Apo-1) Fas-1 interactions. Surgey, *124*, 409–417.

Lockshin R. A., Williams C. M. (1964): Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. J. Insect Physiol., *10*, 643–649.

Martin S. J., Cotter T. G. (1990): Disruption of microtubules induces an endogenous suicide pathway in human leukemia HL-60 cells. Cell Tissue Kinet., *23*, 545–559.

Martin S. J., Green D. R., Cotter T. G. (1994): Dicing with death: dissecting the components of the apoptotic machinery. Trends Biochem. Sci., *19*, 26–30.

Martin S. J., Reutelingsperger C. P., McGahon A. J., Radar A., Van Schie R. C., Laface D. M., Green D. R. (1995): Early distribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and Abl. J. Exp. Med., *182*, 1545–1556.

Mečnikov E. (1891): Lectures on the comparative pathology of inflammation. Lecture VII. Delivered at Pasteur Institute. Translated by Starling F. A. and Starling E. H.. New York, Dover, 1968.

Mercer W. E. (1998): Checking on the cell cycle. J. Cell Biochem. (Suppl.), 30–31, 50–54.

Meszaros A. J., Reichner J. S., Albina J. E. (1999): Macrophage phagocytosis of wound neutrophils. J. Leukoc. Biol., *65*, 35–42.

Metzstein M. M., Stanfield G. M., Horvitz, H. R. (1998): Genetics of programmed cell death in *C. elegans*: past, present and future. Trends Genet., *14*, 410–416.

Miura M., Zhu H., Rotello R., Hartwieg E. A., Yuan J. (1993): Induction of apoptosis in fibroblasts by IL-1 β-converting enzyme, a mammalian homology of the *C. elegans* cell death gene ced-3. Cell, *75*, 653–660.

Moulding D. A., Walter C., Hart C. A., Edwards S. W. (1999): Effects of staphylococcal enterotoxins on human neutrophil function and apoptosis. Infect. Immun., *67*, 2312–2318.

Murgia M., Pizzo P., Sandona D., Zanovello P., Rizzuto R., Di Virgilio F. (1992): Mitochondrial DNA is not fragmented during apoptosis. J. Biol. Chem., *267*, 10939–10941.

Narayanan P. K., Ragheb K., Lawriel G., Robinson J. P. (1997): Defect in intracellular oxidative metabolism of neutrophils undergoing apoptosis. J. Leukoc. Biol., *61*, 481–488.

Newman S. L., Henson J. E., Henson P. M. (1982): Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte-derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages. J. Exp. Med., *156*, 430–442.

Oberhammer F., Wilson J. W., Dive C. (1993): Apoptotic death in epithelial cells: cleavage of DNA to 300 and/or 50 kb fragments prior to or in the absence of internucleosomal fragmentation. EMBO J., *12*, 3679–3688.

Oishi K., Machida K. (1997): Inhibition of neutrophil apoptosis by antioxidant in culture medium. Scand. J. Immunol., *45*, 21–27.

Oliveira R. B., Moraes M. O., Oliveira E. B., Sarno E. N., Nery J. A., Sampaio E. P. (1999): Neutrophils isolated from leprosy patients release TNF-alpha and exhibit accelerated apoptosis *in vitro*. J. Leukoc. Biol., *65*, 364–371.

Oltvai Z. N., Millman C. L., Korsmeyer S. J. (1993): Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, bax, that accelerates programmed cell death. Cell, *74*, 609–619.

Parsey M. V., Kaneko D., Shenkar R., Abraham E. (1999): Neutrophil apoptosis in the lung after hemorrhage or endotoxemia: apoptosis and migration are independent of IL-1beta. Clin. Immunol., *91*, 219–225.

Payne C. L., Glasser L., Tischler M. E., Wyckoff D., Cromey D., Fiederlein R., Bohnert O. (1994): Programmed cell death of the normal human neutrophil: An *in vitro* model of senescence. Microsc. Res. Techniq., *28*, 327–344.

Peitsch M. C., Polzar B., Stephan H. (1993): Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). EMBO J., *12*, 371–377.

Piacentini M., Fesus L., Farrace M. G., Ghibelli L., Piredda L., Melino G. (1991a): The expression of "tissue" transglutaminase in two human cancer cell lines is related with programmed cell death (apoptosis). Eur. J. Cell Biol., *54*, 246–254.

Piacentini M., Autuori F., Dini L., Farrace M. G., Ghibelli L., Piredda L., Fesus L. (1991b): "Tissue" transglutaminase is specifically expressed in neonatal rat liver cells undergoing apoptosis upon epidermal growth factor-stimulation. Cell Tissue Res., *263*, 227–235.

Porter A. G., Janicke R. U. (1999): Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. Cell Death Differ., *6*, 99–104.

Prendergarst G. C. (1999): Mechanisms of apoptosis by c-myc. Oncogene, *18*, 2967–2987.

Puente-Navazo M. D., Daviet L., Savill J., Ren Y., Leung L. L. K., McGregor J. L. (1996): Identification of a domain (155–183) on CD36 implicated in the phagocytosis of apoptotic neutrophils. J. Biol. Chem., *271*, 15381–15385.

Ramprasad M. P., Fischer W., Witztum J. L., Sambrano G. R., Quehenberger O., Steinberg D. (1995): The 94- to 97-kDa mouse macrophage membrane protein that recognizes oxidized low density lipoprotein and phosphatidylserin-rich liposomes is identical to macrosialin, the mouse homologue of human CD68. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *92*, 9580–9584.

Ren Y., Savill J. (1998): Apoptosis: the importance of being eaten. Cell Death Differ., *5*, 563–568.

Rollet-Labelle E., Grange M. J., Elbim C., Marquetty C., Gougerot-Pocidalo M. A., Pasquier C. (1998): Hydroxyl radical as a potential intracellular mediator of polymorphonuclear neutrophil apoptosis. Free Rad. Biol. Med., *24*, 563–572.

Salvesen G. S. (1999): Programmed cell death and the caspases. APMIS, *107*, 73–79.

Sasaki K., Iwatsiki H., Suda M., Itano C. (1995): Accumulation and massive cell death of polymorphonuclear neutrophils in the developing bone marrow of the mouse: A histological study. Acta Anat., *153*, 111–118.

Savill J. S. (1992): Macrophage recognition of senescent neutrophils. Clin. Sci., *83*, 649–655.

Savill J. S. (1997): Recognition and phagocytosis of cell undergoing apoptosis. Br. Med. Bull., *53*, 491–508.

Savill J. S., Willie A. H., Henson J. E., Walport M. J., Henson P. M., Haslett C. (1989a): Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation. Programmed cell death in the neutrophil leads to its recognition by macrophages. J. Clin. Invest., *83*, 865–867.

Savill J. S., Henson P. M., Haslett C. (1989b): Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages is mediated by a novel "charge-sensitive" recognition mechanisms. J. Clin. Invest., *84*, 1518–1527.

Savill J. S., Dransfield I., Hogg N., Haslett C. (1990): Vitronectin receptor mediated phagocytosis of cell undergoing apoptosis. Nature, *343*, 170–173.

Savill J. S., Smith J., Sarraf C., Ren Y., Abbott F., Rees A. (1992): Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. Kidney Int., *42*, 924–936.

Savill J. S., Fadok V., Henson P., Haslett C. (1993): Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol. Today, *14*, 131–136.

Sládek Z., Ryšánek D. (1999): Morphological characteristic of somatic cells from mammary glands of unbred heifers. Vet. Med. – Czech, *44*, 205–214.

Squier M. T., Sehnert A. J., Cohen J. J. (1995): Apoptosis in leukocytes. J. Leukoc. Biol., *57*, 2–10.

Squier M. T., Sehnert A. J., Sellins K. S., Malkinson A. M., Takano E., Cohen J. J. (1999): Calpain and calpastain regulate neutrophil apoptosis. J. Cell Physiol., *178*, 311–319.

Steele R. J., Thompson A. M., Hall P. A., Lane D. P. (1998): The p53 tumour suppressor gene. Brit. J. Surg., *85*, 1460–1467.

Stevens P. K., Czuprynski C. J. (1996): *Pasteurella haemolytica* leukotoxin induces bovine leukocytes to undergo morphologic changes consistent with apoptosis *in vitro*. Infect. Immun., *64*, 2687–2694.

Stites D. P., Terr A. I. (1994): Základní a klinická imunologie. Praha, Victoria Publishing. 744 s.

Stuart M. C., Damoiseaux J. G., Frederik P. M., Arends J. W., Reutelingsperger C. P. (1998): Surface exposure of phosphatidylserine during apoptosis of rat thymocytes precedes nuclear changes. Eur. J. Cell Biol., *76*, 77–83.

Sweeney J. F., Nguyen P. K., Omann G. M., Hinshaw D. B. (1997): Ultraviolet irradiation accelerates apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: protection by LPS and GM-CSF. J. Leukoc. Biol., *62*, 517–523.

Sweeney J. F., Nguyen P. K., Omann G. M., Hinshaw D. B. (1999): Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor rescues human polymorphonuclear leukocytes from ultraviolet irradiation-accelerated apoptosis. J. Surg. Res., *81*, 108–112.

Takeda Y., Watanabe H., Yonehara S., Yamashita T., Saito, S., Sendo F. (1993): Rapid acceleration of neutrophil apoptosis by tumor necrosis factor-α. Int. Immunol., *5*, 691–694.

Tortorella C., Piazzolla G., Spaccavento F., Antonaci S. (1998): Effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and cyclic AMP interaction on human neutrophil apoptosis. Mediat. Inflamm., *7*, 391–396.

Trump B. F., Berezesky I. K., Osornio-Vargas A. R. (1981): Cell death and the disease process: the role of calcium. In: Bowen D., Lockshin R. A. (eds.): Cell Death in Biology and Pathology. London, Chapman and Hall. 209–242.

Van Engeland M., Nieland L. J., Ramaekers F. C., Schutte B., Reutelingsperger C. P. (1998): Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. Cytometry, *31*, 1–9,

Vartio T., Seppa H., Vaheri A. (1981): Susceptibility of soluble and matrix fibronectin to degradation by tissue proteinases, mast cell chymase and cathepsin G. J. Biol. Chem., *256*, 440–442.

Walker N. I. (1987): Ultrastructure of the rat pancreas after experimental duct ligation. I. The role of apoptosis and intraepithelial macrophages in acinar cell deletion. Am. J. Pathol., *126*, 439–451.

Walker N. I., Gobé G. C. (1987): Cell death and cell proliferation during atrophy of the rat parotid gland. Induced by duct obstruction. J. Pathol., *153*, 333–344.

Walker N. I., Bennett R. E., Kerr J. F. R. (1989): Cell death during involution of the lacting breast in mice and rat. Am. J. Anat., *185*, 19–32.

Watson R. W. G., Rotstein O. D., Nathens A. B., Parodo J., Marshall J. C. (1997): Neutrophil apoptosis is modulated by endothelial transmigration and adhesion molecule engagement. J. Immunol., *158*, 945–953.

Weinmannn P., Gaehtgens P., Walzog B. (1999): Bcl-x1- and bax-α-mediated regulation of apoptosis of human neutrophils via caspase-3. Blood, *93*, 3106–3115.

Whyte M. K. B., Meagher L. C., Macdermot J., Haslett C. (1993) Impairment of function in aging neutrophils is associated with apoptosis. J. Immunol., *150*, 5124–5134.

Wiliams W. J., Beutler E., Ersler A. J., Lichtman M. A. (1990): Hematology. 4th ed., New York, McGraw-Hill.

Wong W. W. (1998): ICE family proteases in inflammation and apoptosis. Agents Actions (Suppl.), *49*, 5–13.

Wyllie A. H. (1981): Cell death: a new classsification separating apoptosis from necrosis. In: Bovden D., Loskshin R. A. (eds.): Cell death in biology and pathology. London, Chapman and Hall. 9–34.

Wyllie A. H. (1985): The biology of cell death in tumors. Anticancer Res., *5*, 131–136.

Wyllie A. H. (1987): Cell death. Int. Rev. Cytol., *17*, 755–785.

Wyllie A. H. (1992): Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. Cancer Metast. Rev., *11*, 93–103.

Wyllie A. H., Kerr J. F. R., Currie A. R. (1980): Cell death: the significance of apoptosis. Int. Rev. Cytol., *68*, 251–306.

Yamamoto Ch., Yoshida S. I., Mizuguchi Y. (1992): Phagocytosis of polymorphonuclear leukocytes by guinea pig peritoneal macrophages: effect of serum and temperature *in vitro*. FEMS Microbiol. Immunol., *105*, 211–218.

Yamamoto Ch., Yoshida S. I., Taniguchi H., Qin M. H., Maymoto H., Mizuguchi Y. (1993): Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. Infect. Immun., *61*, 1972–1979.

Yamashita K., Takahashi A., Kobayashi S., Hirata H., Mesner P. W., Kaufmann S. H., Yonehara S., Yamamoto K., Uchiyama T., Sasada M. (1999): Caspases mediated tumor necrosis factor-alpha-induced neutrophil apoptosis and downregulation of reactive oxygen production. Blood, *93*, 674–685.

Yang Y. F., Sylte M. J., Czuprynski C. J. (1998): Apoptosis: a possible tactic of *Haemophilus somnus* for evasion of killing by bovine neutrophils? Microb. Pathogenesis, *24*, 351–359.

Yuan J., Horvitz H. R. (1990): The *Ceanorhabditis elegans* genes ced-3 and ced-4 act cell autonomously to cause programmed cell death. Dev. Biol., *138*, 33–41.

Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M., Horvitz H. R. (1993): The *C. elegans* cell death gene ced-3 encodes a protein similar to mammalian interleukin-1-beta-converting enzyme. Cell, *75*, 641–652.

Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordana M., Lei X. F., Achong M. K. (1998): IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. J. Clin. Invest., *101*, 311–320.

Zhang G., Gurtu V., Kain S. R., Yan G. (1997): Early detection of apoptosis using a fluorescent conjugate of annexin V. Biotechniques, *23*, 525–531.

Zou H., Henzel W. J., Lutschg A. (1997): Apaf1, a human protein homologous to *C. elegans* ced-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. Cell, *90*, 405–411.

Received: 99–05–31
Accepted after corrections: 99–07–16

Kontaktní adresa:

MVDr. Dušan Ryšánek, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 32 12 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: rysanek@vri.cz

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 kurzívy, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědni 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 zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimované 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 měrových jednotek SI.

Rukopis má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojité mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou 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 zkratek jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratek 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 kapitolu 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.

Úplné znění pokynů pro autory s dodatky najdete na URL adrese
http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm

For full text of instruction for authors see
http://www.clark.cz/vri/Pokynya.htm

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 44, No. 10, October 1999

CONTENTS

Valíček L., Pšikal I., Šmíd B., Indik S., Rodák L., Kosinová E.: Circulation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine herds in the Czech Republic (in English) 289

Raszyk J., Ulrich R., Salava J., Palác J.: Evaluation and occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in animal feed factories (in English) 295

Binderová E., Ryšánek D.: Microbial contaminants of milk processed by high-temperature short-time pasteurization 301

REVIEW ARTICLE

Sládek Z., Ryšánek D.: Apoptosis of polymorphonuclear leukocytes 309

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 44, č. 10, Říjen 1999

OBSAH

Valíček L., Pšikal I., Šmíd B., Indik S., Rodák L., Kosinová E.: Cirkulace viru reprodukčního a respiračního syndromu prasat v chovech prasat v České republice 289

Raszyk J., Ulrich R., Salava J., Palác J.: Zhodnocení výskytu karcinogenních polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) ve výrobnách krmných směsí 295

Binderová E., Ryšánek D.: Mikrobiální kontaminace mléka ošetřeného šetrnou pasterací 301

PŘEHLED

Sládek Z., Ryšánek D.: Apoptóza polymorfonukleárních leukocytů 309

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, e-mail: edit@uzpi.cz ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Plzeňská 145, 266 01 Beroun, tel.: 0311/62 29 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1999

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