

ZDZISŁAW STARONIEWICZ

# Mechanizmy odpornościowe w przebiegu doświadczalnej yersiniozy u myszy

Katedra Mikrobiologii Weterynaryjnej Wydziału Weterynaryjnego AR,  
ul. Norwida 31, 50-375 Wrocław

## Summary

### Immunological mechanisms operating in mice in experimental yersiniosis

The objectives of the study were to examine immunological processes developing in mice in experimental *Yersinia enterocolitica* infection. The studies were performed on the BALB/c mice infected perorally with  $10^8$  live virulent cells of *Y. enterocolitica*. The activity of neutrophils, macrophages, lymphocytes T and B was evaluated in appropriate tests. The dynamics of anti *Y. enterocolitica* antibodies was determined by agglutination and by indirect immunofluorescence test. It was found that in mice in the course of experimental yersiniosis both cellular and humoral immunity play an important role in protection but in various periods after infection. Cellular immunity develops earlier after about 6–9 days since infection but humoral immunity appears by about 12–15 days since infection.

Mimo licznych badań nad doświadczalną yersiniozą zwierząt niewiele jak dotąd wiadomo na temat patogenyzy oraz odpowiedzi immunologicznej w przebiegu zakażenia wywołanego przez *Yersinia enterocolitica*. Ogólnie przyjmuje się, że w zakażeniach wirusowych i grzybiczych dużą rolę odgrywają mechanizmy obronne typu komórkowego, natomiast w większości zakażeń bakteryjnych przeważają mechanizmy typu humoralnego (6). Odporność komórkowa jako decydująca jest obserwowana przy zakażeniu bakteriami, które pasożytują wewnątrzkomórkowo, m.in. takie jak: *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella abortus*, *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* (1, 6). Z nelicznych badań wynika, że *Y. enterocolitica* może wytwarzać ziarniakowe zmiany i jest oporna na wewnątrzkomórkowe zabijanie fagocytów (2, cyt. 10). Chociaż zmiany te, charakterystyczne dla pasożytów wewnątrzkomórkowych (cyt. 10, 13), mogą świadczyć o obronności komórkowej, to jednak nie wykluczają udziału odporności humoralnej.

Celem pracy było badanie odporności humoralnej i komórkowej w przebiegu doświadczalnego zakażenia wywołanego pałeczkami *Y. enterocolitica* u myszy.

## Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 360 myszach szczepu BALB/c w wieku 4–5 miesięcy, pochodzących z hodowli własnej. Myszy zakażano doustnie szczepem wirulentnym 4/S/87 *Yersinia enterocolitica* serotyp 3, metodą opisaną w poprzedniej pracy (16). Wszystkie zwierzęta otrzymały dawkę  $0,15 \text{ cm}^3$  zawiesiny żywych bakterii o gęstości  $6,7 \times 10^8$  komórek/ $\text{cm}^3$ . Zwierzęta podzielono na 3 grupy po 70 myszy. W 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 i 27 dniu po zakażeniu zabijano po 5 zwierząt i badano. Myszy I grupy skrwawiano przez dekapitację i pobierano krew w celu wykonania testu cytoenzymatycznego. W dalszej kolejności wypreparowywano węzły chłonne krezkowe dla uzyskania komórek do odczynu zahamowania migracji makrofagów (ZMM). Myszy II grupy dekapitowano pobierając krew do badań serologicznych oraz makrofagi otrzewnowe do testu z czerwienią obojętną i fagocytozy. Od III grupy myszy pobierano krew do testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT), a węzły chłonne krezkowe dla otrzymania komórek limfatycznych do testu rozetkowego EAC.

Badania bakteriologiczne. Zakażenie myszy pałeczkami *Y. enterocolitica* sprawdzano za pomocą posiewów bakteriologicznych bezpośrednich i pośrednich, na podłożach stałych

(MacConcey agar-Merck, *Yersinia Selective Agar-Oxid*) oraz płynnych (SF, zbuforowany płyn fizjologiczny o pH 7,6). Do badań bakteriologicznych pobierano wycinki śledziony, wątroby, jelita biodrowego oraz węzłów chłonnych.

Otrzymywanie komórek limfatycznych. Komórki limfatyczne do odczynu ZMW i testu rozetkowego uzyskiwano z węzłów chłonnych krezkowych. Węzły chłonne pobrane bezpośrednio po zabiciu zwierzęcia rozdrabniano i przecierano przez gęstą gazę nylonową. Uzyskane w ten sposób komórki płukano dwukrotnie w zimnym płynie Eagle'a z dodatkiem  $60 \mu\text{g}$  streptomycyny i  $70 \text{ j.m.}$  penicyliny w  $1 \text{ cm}^3$  płynu oraz  $10\%$  inaktywowanej surowicy cielęcej. Gęstość zawiesin obliczano przy użyciu hemocytometru Bürkera. Żywotność komórek wahała się w granicach 89–94% sprawdzana przy pomocy  $1\%$  roztworu błękitu trypanu.

Odczyn zahamowania migracji makrofagów (ZMW). Odczyn wykonano według metody opisanej przez Rajapakse i Glyna (15) oraz Marsmana i Van der Harta (8). Używano antygeny w postaci zabitych w autoklawie w  $121^\circ\text{C}$  przez 10 minut pałeczek *Y. enterocolitica*, a następnie rozbitych ultradźwiękami. Do odczynu antygen rozcieńczano płynem Parkera do koncentracji  $50 \mu\text{g}$  białka/ $1 \text{ cm}^3$ . Poziom białka w antygenie określano metodą Lowry'ego (7). Makrofagi uzyskiwano z jamy otrzewnowej myszy podając im 3 dni wcześniej  $2 \text{ cm}^3$  jałowego oleju parafinowego dootrzewnowo. Z komórek otrzymanych z węzła chłonnego krezkowego zakażonych myszy oraz z komórek uzyskanych z wysięku otrzewnowego myszy zdrowych sporządzano takie zawiesiny aby po połączeniu ich stosunek limfocytów do makrofagów wynosił 1 : 4 (obliczano w komorze Thoma-Zeissa). Następnie mieszaninę komórek napełniano kapilary, które po odwirowaniu i obciążeniu na granicy osadu komórek umieszczano na dnie komory Mackaness'a. Dla każdego zwierzęcia doświadczalnego napełniano po dwie komory płynem Parkera z antygenem i bez antygeny. Po 24 godz. inkubacji w  $37^\circ\text{C}$  obliczano procent migracji w obecności antygeny, a średnie powierzchnie pól migracji odczytywano z 4 kapilar.

Test rozetkowy EAC (3). Z erytrocytów barana przemytych trzykrotnie zbuforowanym płynem fizjologicznym (PBS) sporządzano  $5\%$  zawiesinę, z której  $1 \text{ cm}^3$  inkubowano przez 30 minut w  $37^\circ\text{C}$  z równą objętością surowicy hemolizacyjnej przeciwko erytrocytom barana rozcieńczonej do miana subaglutynacyjnego. Uczulone krwinki (EA) po przemyciu zawieszono w  $1 \text{ cm}^3$  PBS i inkubowano z równą objętością rozcieńczonej surowicy mysiej przez 30 minut w  $37^\circ\text{C}$ . Utworzone kompleksy EAC przemywano i inkubowano z limfocytami przez 30 minut w temp.  $37^\circ\text{C}$ . Odsetek limfocytów (barwionych  $1\%$  błękitem metylenowym) tworzących rozety określano po przeliczeniu 300 komórek. Za rozetę uznawano przyleganie co najmniej 3 erytrocytów do limfocyta.

Oznaczanie limfocytów esterazododatnich. Zastosowano metodę cytoenzymatyczną Muellera i wsp. (9), w której limfocyty esterazododatnie utożsamiane są u myszy z limfocytami T, zaś esterazoujemne z limfocytami B. Test wykonano z rozmazów krwi myszy. W preparatach obliczano procent komórek zawierających wybarwione ziarnistości świadczące o obecności w cytoplazmie esterazy.

Oznaczanie ilości makrofagów czerwienią obojętną. W próbie wykorzystano zdolność przyżyciowego barwienia makrofagów czerwienią obojętną. Makrofagi uzyskiwano przemywając jamę otrzewnową  $1 \text{ cm}^3$  PBS. Do  $0,2 \text{ cm}^3$  płucznicy z jamy otrzewnowej dodawano kroplę  $1\%$  czerwieni obojętnej w płynie fizjologicznym i liczone makrofagi w komorze Bürkera, obliczając ilość w  $1 \text{ cm}^3$ .

Test redukcji błękitu nitroterazoliowego (NBT). Badanie wykonano metodą cytochemiczną według Parkera i wsp. (12). Krew heparynowaną w ilości  $0,1 \text{ cm}^3$  mieszano w równej objętości z mieszaniną PBS i  $0,2\%$  roztworu błękitu nitrotetrazoliowego. Próbkę inkubowano przez 15 minut w  $37^\circ\text{C}$  i 15 minut w temp. pokojowej. Następnie wykonywano rozmazy na szkiełkach podstawowych, które utrwalano zimnym metanolem i dobarwiano  $0,2\%$  roztwo-

rem safraniny w 2% kwasie octowym. Preparaty oglądano pod mikroskopem, obliczając odsetek granulocytów zawierających wewnątrzkomórkowe wyraźne złoże formazanu.

Badanie fagocytozy przy użyciu makrofagów otrzewnowych. Makrofagi uzyskiwano przemywając jamę otrzewnową 1 cm<sup>3</sup> PBS. Odczyn wykonano na szkiełkach podstawowych, na powierzchni których rozprowadzano 0,2 cm<sup>3</sup> popłuczyn z jamy otrzewnowej. Preparat inkubowano w komorze wilgotnej zawierającej 5% CO<sub>2</sub> przez 30 minut w 37°C w celu przytwierdzenia się makrofagów do powierzchni szkiełka. Po 3-krotnym przemyciu preparatów płynem Hanksa o temp. 37°C działano na nie zawieszoną pałeczek *Y. enterocolitica* w ilości 0,2 cm<sup>3</sup> z dodatkiem surowicy mysiej i inkubowano przez 30 minut w komorze wilgotnej zawierającej 5% CO<sub>2</sub>. Następnie po przemyciu preparatów barwiono je metodą Pappenheima i obliczano procent makrofagów zawierających pochłonięte bakterie.

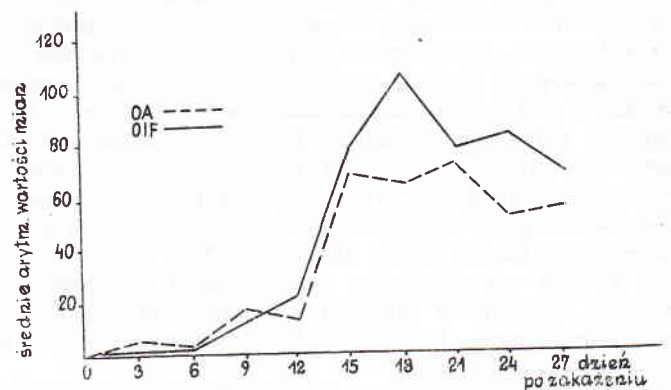
Badania serologiczne. Do oznaczania poziomu przeciwciał anti-*Y. enterocolitica* zastosowano odczyn aglutynacji (OA) i immunofluorescencji pośredniej (OIF). Odczyny te wykonano z antygenem O uzyskanym z tego samego szczepu, którym zakażono zwierzęta (szczep 4/S/87). Antygen przygotowano z zabitych w autoklawie pałeczek *Y. enterocolitica* o gęstości 10<sup>8</sup>/cm<sup>3</sup>. OA wykonano (5) rozcieńczając płynem fizjologicznym badaną surowicę (uprzednio inaktywowaną w 56°C przez 30 minut) od 1:10. Następnie dodawano po kropli antygeny i inkubowano 18 godz. w temp. 50°C, po czym odczytywano. OIF wykonywano według ogólnie przyjętych metod. Do odczynu używano znakowanych surowic antyglobulinowych firmy Difco.

#### Wyniki i omówienie

Wyniki badań immunologicznych u myszy zakażonych doustnie pałeczkami *Y. enterocolitica* serotyp 3 przedstawia tab. 1. Uwalnianie czynnika migracji (MIF) obserwowano wyraźnie już 6 dnia po zakażeniu. Najwyższe zahamowanie makrofagów w obecności antygeny notowano w 12 dniu po infekcji i wynosiło 56,8%. Począwszy od 15 dnia trwania zakażenia następował powolny spadek uwalniania czynnika MIF. Zahamowanie migracji makrofagów utrzymywało się aż do końca doświadczenia, a różnice między wynikami przed i w 27 dni po zakończeniu były jeszcze wyraźne. Z tab. 1 wynika, że u myszy zakażonych obserwowano również zmiany ilościowe makrofagów otrzewnowych. Już w trzecim dniu trwania zakażenia notowano wzrost liczby makrofagów, który utrzymywał się aż do 18 dnia. Największą średnią liczbę komórek u myszy stwierdzono w 9 dniu infekcji i wynosiła ona 6,5 × 10<sup>6</sup> makrofagów. Od 21 dnia po zakażeniu obserwowano wyraźne zmniejszenie liczby makrofagów otrzewnowych. Dynamikę zmian ilościowych limfocytów B u myszy zakażonych wykazano za pomocą testu rozetkowego EAC. Po 6 dniach od zakażenia liczba komórek rozetkujących wzrosła do 32,0%, podczas gdy u zwierząt nie zakażonych wartość ta wynosiła 22,5%. W kolejnych badaniach

obserwowano dalszy wzrost liczby limfocytów tworzących rozetki. Największy odsetek limfocytów tworzących rozetki stwierdzano 12 i 15 dnia (43,4% i 48%) po zakażeniu. Od 18 dnia trwania doświadczenia wystąpił nieznaczny spadek liczby komórek reagujących z krwinkami. Ocena funkcji granulocytów obojętnochłonnych dokonana za pomocą testu redukcji NBT wykazała, że już 3 dnia po zakażeniu nastąpił wzrost ich aktywności. Największy odsetek granulocytów redukujących notowano 6 dnia po zakażeniu i wynosił on 23,5%. Od 9 do 18 dnia po zakażeniu stwierdzano jeszcze dość wysoką liczbę komórek NBT dodatnich. Dopiero w dalszych badaniach obserwowano stopniowy spadek liczby granulocytów zawierających złoże formazanu. We krwi w kolejnych badaniach po zakażeniu za pomocą testu cytoenzymatycznego wykazano zmiany ilościowe limfocytów esterazododatnich (T). W 6 dniu doświadczenia notowano wyraźny wzrost ich liczby do 63,2%, podczas gdy u zwierząt nie zakażonych stwierdzano 58,8%. Od 9 dnia po zakażeniu, kiedy liczba limfocytów T była największa i wynosiła 69,2%, uległa w następnych badaniach zmniejszeniu, ale nie była niższa od wartości wyjściowej. U zakażonych myszy stwierdzano również wzrost aktywności fagocytarnej makrofagów otrzewnowych. Najwyższe odsetki makrofagów fagocytyjących obserwowano od 3 do 9 dnia po zakażeniu i wynosiły one kolejno 90,4%, 96,3%, 85,7%. Począwszy od 12 dnia notowano spadek liczby makrofagów fagocytyjących.

Zachowanie się przeciwciał wykrywalnych odczynem aglutynacji i immunofluorescencji pośredniej po zakażeniu myszy pałeczkami *Y. enterocolitica* przedstawia ryc. 1. Z wykresu wynika, że aglutyniny w niskich mianach (1:10—1:20) występowały u niektórych badanych zwierząt już 3 dnia po zakażeniu. Od 6 dnia po zakażeniu obserwowano już wzrost poziomu przeciwciał anti-*Y. entero-*



Ryc. 1. Miana swoistych przeciwciał wykrywalnych w odczynie aglutynacji (OA) i immunofluorescencji (OIF) u myszy zakażonych *Y. enterocolitica*

Tab. 1. Wyniki badań immunologicznych myszy po zakażeniu doustnym pałeczkami *Yersinia enterocolitica*

Dzień po zakażeniu	ZMM %	Limfocyty esterazododatnie %	Rozety EAC %	Test redukcji NBT %	Aktywność fagocytarne makrofagów %	Liczba makrofagów mln/cm <sup>3</sup>
0	94,6	58,8	22,5	8,7	64,2	1,9
3	85,7	61,3	21,2	13,4	90,4	3,0
6	70,2	63,2	32,0	23,5	96,3	4,4
9	68,4	69,2	24,7	18,6	85,7	6,5
12	56,8	62,5	43,4	19,8	72,5	6,2
15	74,3	63,0	48,0	14,3	83,2	3,9
18	65,5	62,8	37,3	17,5	73,0	2,2
21	71,3	58,5	41,3	11,5	64,7	1,6
24	84,7	60,7	38,7	9,7	72,5	2,5
27	78,2	61,1	40,0	12,3	65,8	2,1

*colitica*. Najwyższe wartości mian (1:20—1:160) stwierdzano między 15 a 21 dniem po zakażeniu. Chociaż od 24 dnia obserwowano spadek poziomu aglutynin, to jednak utrzymywały się do końca doświadczenia na znacznym poziomie. W OIF wykrywano przeciwciała po 9 dniach od zakażenia. Najwyższy poziom przeciwciał fluoryzujących (1:20—1:320) obserwowano między 15 a 24 dniem po zakażeniu. Wysokie wartości mian utrzymywały się do końca obserwacji.

W badaniach bakteriologicznych wycinków narządów zakażonych myszy stwierdzano obecność pałeczek *Y. enterocolitica* przez cały okres trwania doświadczenia. Szczególnie obfity wzrost *Y. enterocolitica* obserwowano między 6 a 12 dniem po zakażeniu. W tym okresie notowano także przypadki śmiertelne wśród zwierząt.

W procesach zachodzących w odpowiedzi immunologicznej uczestniczą m.in. takie komórki, jak: limfocyty, granulocyty, komórki plazmatyczne, makrofagi, monocyty (13). Bardzo istotną rolę w odporności odgrywają limfocyty T (grasiczo-zależne), które uczestniczą w reakcjach immunologicznych typu komórkowego oraz immunokompetentne limfocyty B (burso-zależne), które są odpowiedzialne za odporność humoralną, związaną z obecnością krążących przeciwciał (4, 6). Obok limfocytów ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej spełniają również makrofagi, które obok znanych właściwości żernych mają istotne znaczenie w regulacji rozpoznawania antygeny oraz jego „prezentacji” w odpowiednio przetworzonej formie komórkom T (14, 19). W badaniach własnych za pomocą odpowiednich testów poddano ocenie aktywność takich komórek, jak: limfocyty T i B, makrofagi oraz granulocyty obojętnochłonne. Już od 3 dnia po zakażeniu myszy pałeczkami *Y. enterocolitica* obserwowano nie tylko zwiększenie liczby makrofagów otrzewnowych, ale również wzrost ich właściwości fagocytyzujących. W tym okresie notowano także wzrost aktywności metabolicznej granulocytów krwi obwodowej. Najwyższy odsetek makrofagów fagocytyzujących, granulocytów redukujących, limfocytów T oraz największą średnią liczbę makrofagów obserwowano między 6 a 9 dniem trwania zakażenia. W kolejnych badaniach aktywność badanych komórek zmalała, jednak notowane wartości pozostawały znacznie wyższe w porównaniu do zwierząt nie zakażonych. Do wykazania odporności komórkowej (nadwrażliwości typu późnego) *in vitro* zastosowano odczyn ZMM. Uwalnianie MIF obserwowano już 6 dnia po zakażeniu, a największe zahamowanie migracji w obecności antygeny nastąpiło w 12 dniu trwania doświadczenia. Uwalnianie MIF obserwowano aż do końca obserwacji.

Zbliżone wyniki badań otrzymali Nakazawa i wsp. (10). Stwierdzili, że u myszy zakażonych dożylnie żywymi bakteriami *Y. enterocolitica* już 7 dnia po zakażeniu pojawiła się NTP badana testem opuszkowym i utrzymywała się aż do 21 dnia.

Dynamikę rozwoju odporności typu humoralnego badano z użyciem odczynu aglutynacji i immunofluorescencji oraz testu EAC pozwalającego identyfikować limfocyty B. W teście EAC zmiany ilościowe wykazano już po 6 dniach od zakażenia. Największy odsetek limfocytów tworzących rozetki notowano 12 i 15 dnia po zakażeniu. Natomiast najwyższe wartości mian w obu odczynach (OA i OIF) stwierdzono między 15 a 24 dniem trwania doświadczenia. W OA przeciwciała w niskich mianach pojawiły się już 3 dnia po zakażeniu, natomiast w OIF wykrywano je później i na ogół w wyższych wartościach. Przeciwciała zarówno w OA, jak i w OIF utrzymywały się do końca obserwacji. Z danych piśmiennictwa (10, 11, 17, 18) wynika, że w przebiegu doświadczalnej yersiniozy u zwierząt

przeciwciała anty-*Y. enterocolitica* pojawiają się w różnych okresach po zakażeniu. Nakazawa i wsp. (10) w swoich badaniach na myszach wykrywali aglutyniny anty-*Y. enterocolitica* od 4 do 30 dnia, a najwyższe miana (1:320) notowali 12 dnia po zakażeniu. Natomiast Ueno i wsp. (17, 18) u większości badanych myszy wykrywali przeciwciała na ogół od 3 do 5 tygodnia po zakażeniu, a najwyższe miano O aglutynin wynosiło 1:80. Uważają również, że miano  $\geq 20$  może być diagnostycznie pewnym wskaźnikiem zakażenia pałeczkami *Y. enterocolitica* myszy i szczurów w doświadczalnych warunkach. W badaniach eksperymentalnych przeprowadzonych na królikach (cyt. 18) przeciwciała były wykrywane między 1—4 tygodniem po zakażeniu w mianach 1:256 do 1:2048. Pal i wsp. (11) w swoich badaniach stwierdzali czterokrotny lub większy wzrost poziomu przeciwciał w surowicach 30 królików (71%) w okresie od 12 do 16 dnia po zakażeniu, a średnia geometryczna mian wynosiła 62.

W badaniach własnych wykazano, że w doświadczalnej yersiniozie u myszy obserwuje się wzajemne uzupełnianie w funkcjach makrofagów, granulocytów obojętnochłonnych oraz limfocytów T i B. Odporność typu komórkowego powstaje wcześniej około 6—9 dnia po zakażeniu myszy wirulentnym szczepem *Y. enterocolitica*, niż odporność humoralna około 12—15 dnia, która utrzymywała się do końca doświadczenia.

#### Piśmiennictwo

- Campbell P. A.: Bact. Rev. 40, 284, 1976.
- Carter P. B., Collins F. M.: Infect. Immun. 9, 851, 1974.
- Gościńska T.: Cwiczenia z immunologii, PWN, Warszawa 1979.
- Hartosińska A., Richter R.: Post. Hig. 33, 1, 1979.
- Jung M.: Serologic diagnosis of bacterial infections, Virion Edition, Cham 1983.
- Larski Z.: Medycyna Wet. 33, 67, 1977.
- Lowry O. H., Rosenbrough N. J., Farr A. L., Randall R. J.: J. Biol. Chem. 193, 265, 1951.
- Marsman A. J. W., Van der Hart M.: Int. Archs Allergy appl. Immun. 45, 322, 1973.
- Mueller J., Braun del Re G., Buerki H., Keller H.-U., Hess M. W., Cottier H.: Eur. J. Immunol. 5, 270, 1975.
- Nakazawa M., Tabuchi K., Hara M., Imai N.: Bull. Azabu vet. Coll. 3, 1, 1978.
- Pal C. H., Mors V., Seemaer T. A.: Infect. Immun. 28, 238, 1980.
- Park B. H., Fikring S. M., Smithwick E. M.: Lancet 2, 532, 1968.
- Ptak W.: Podstawy immunologii, PZWL, Warszawa 1987.
- Ptak W.: Immunol. Pol. 3, 53, 1978.
- Rajapakse D. A., Glynn L. E.: Nature 226, 857, 1970.
- Staroniewicz Z., Madej J. A.: Medycyna Wet. 1989 (w druku).
- Ueno H., Kaneko K., Hashimoto N.: Jap. J. vet. Res. 29, 67, 1981.
- Ueno H., Kaneko K., Hashimoto N.: Jap. J. vet. Res. 29, 73, 1981.
- Zembala M., Ptak W.: Post. Hig. 25, 699, 1971.

Adres autora: dr Zdzisław Staroniewicz, ul. Sopocka 21 m. 6, 50-344 Wrocław

**TAKLA P. G., MOHAMED H. A., WRIGHT J., FAHMY F.:** Stężenie ołowiu w pełnej krwi owiec z różnych terenów położonych w Delcie Nilu. (Lead levels in whole blood of sheep from different areas of the Nile Delta). Vet. Rec. 124, 300—302, 1989 (12)

Oznaczono stężenie ołowiu w pełnej krwi owiec wypasanych na pastwiskach usytuowanych w pobliżu autostrad lub w pobliżu zakładów przemysłowych zużywających duże ilości ropy naftowej. Wszystkie pastwiska były usytuowane w Delcie Nilu. Z każdego z trzech regionów pobierano krew od 117 do 200 owiec. Jedno z pastwisk było oddalone o 80, drugie o 100 m od ruchliwej autostrady, zaś trzecie pastwisko było usytuowane w odległości 0,5 km od elektrowni atomowej, gdzie pracowały silniki dieselskie. Poziom ołowiu we krwi owiec wynosił średnio 0,062; 0,067 i 0,087  $\mu\text{g/ml}$ . Ani wartości średnie stężenia ołowiu w pełnej krwi owiec, ani wartości maksymalne stężenia tego pierwiastka (200  $\mu\text{g/L}$ ) nie wskazują na silne zanieczyszczenie ołowiem okolicy, w której są wypasane owce.