

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

8

VOLUME 45
PRAHA
AUGUST 2000
ISSN 0375-8427

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

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

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

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

Members – Členové

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

Arnost Cepica, DVM., Ph.D., 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 Kovář, 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., Jilové u Prahy, Czech Republic

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

World Wide Web (URL): <http://www.vri.cz> or <http://www.uzpi.cz>

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: Agriis, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus.

Periodicita: Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 45 vychází v roce 2000.

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: edit@uzpi.cz. Podrobné pokyny pro autory jsou v redakci a na URL adrese <http://www.vri.cz> nebo <http://www.uzpi.cz>

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 2000 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: Agriis, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus.

Periodicity: The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 45 appearing in 2000.

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: edit@uzpi.cz. Detailed instructions for authors are available in the editorial office and at URL address <http://www.vri.cz> or <http://www.uzpi.cz>

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 2000 is 159 USD (Europe), 167 USD (overseas).

POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHs, NITRO-PAHs, OXY-PAHs), POLYCHLORINATED BIPHENYLS (PCBs) AND ORGANIC CHLORINATED PESTICIDES (OCPs) IN THE INDOOR AND OUTDOOR AIR OF PIG AND CATTLE HOUSES*

POLYCYKlickÉ AROMATICKÉ UHLOVODÍKY (PAH, NITRO-PAH, OXY-PAH), POLYCHLOROVANÉ BIFENYLY (PCB) A CHLOROVANÉ PESTICIDY VE VNITŘNÍM A VNĚJŠÍM OVZDUŠÍ STÁJÍ PRASAT A SKOTU

M. Ciganek¹, J. Raszyk¹, J. Kohoutek², A. Ansorgová³, J. Salava⁴, J. Palác⁴

¹*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

²*TOCOEN, Ltd., Brno, Czech Republic*

³*Faculty of Sciences, Masaryk University, Brno, Czech Republic*

⁴*District Veterinary Administration, Hodonín, Czech Republic*

ABSTRACT: Forty five semivolatile gaseous-phase and solid-phase organic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-substituted PAHs (nitro-PAHs), oxygenated PAHs (oxy-PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and organic chlorinated pesticides (OCPs) were quantified in samples of indoor and outdoor air collected on pig and cattle farms. Excepting oxy-PAHs, the concentrations of all the contaminants were higher in the indoor than in the outdoor samples. The air of the cattle houses contained higher concentrations of PAHs (40.1 to 71.5 ng/m³) (outdoor concentration 8.4 ng/m³) and that of the pig houses higher concentrations of PCBs (0.30 to 1.15 ng/m³) (outdoor concentration 0.10 ng/m³) and hexachlorocyclohexanes (HCHs; 0.41 to 4.33 ng/m³) (outdoor concentration 0.29 ng/m³). The congeners 28 and 153 predominated among PCBs in the cattle and the pig houses, respectively. p,p'-DDE predominated among DDT metabolites and HCH γ -isomer (lindane) among HCHs in both the cattle and the pig houses. Of the nitro-PAHs, only 1-nitronaphthalene, 2-nitrofluorene, and 1-nitropyrene (0.04 to 0.21 ng/m³) were identified, these contaminants were present mostly in the gaseous phase. The solid phase contained mainly carcinogenic PAHs among which chrysene dominated (up to 0.69 ng/m³). In all the samples, the highest concentrations were found for phenanthrene reaching the values of 4.1 and 33.2 ng/m³ in the outdoor and indoor samples, respectively.

swine; cattle; farm; air; indoor; outdoor; pollution; PAHs; nitro-PAHs; oxy-PAHs; PCBs; chlorinated pesticides

ABSTRAKT: Na farmách prasat a krav bylo v plynné a pevné fázi vnitřního a vnějšího ovzduší analyzováno 45 organických kontaminantů: polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH), nitrované PAH (nitro-PAH), oxidované PAH (oxy-PAH), polychlorované bifenylly (PCB) a organické chlorované pesticidy (OCP). Koncentrace všech kontaminantů, s výjimkou oxy-PAH, byly vyšší ve vzorcích vnitřního ovzduší. Vnitřní ovzduší kravínů obsahovalo nejvyšší koncentrace PAH (40,1 až 71,5 ng/m³) (vnější ovzduší 8,4 ng/m³), vnitřní ovzduší vepřinů nejvyšší koncentrace PCB (0,30 až 1,15 ng/m³) (vnější ovzduší 0,10 ng/m³) a hexachlorcyklohexanů (HCH; 0,41 až 4,33 ng/m³) (vnější ovzduší 0,29 ng/m³). V kravinech a vepřinech byly dominantními PCB kongenery 28 a 153. Z metabolitů DDT dominoval v ovzduší kravínů a vepřinů p,p'-DDE a z metabolitů HCH γ -isomer (lindan). Z nitro-PAH byl stanoven pouze 1-nitronaftalen, 2-nitrofluoren a 1-nitropyren (0,04 až 0,21 ng/m³). Tyto kontaminanty byly přítomny hlavně v plynné fázi ovzduší. Prachové částice přítomné v ovzduší obsahovaly hlavně karcinogenní PAH, z kterých byl v nejvyšší koncentraci stanoven chryzen (až do koncentrace 0,69 ng/m³). Fenantren byl přítomen ve všech vzorcích v nejvyšších koncentracích (4,1 ng/m³ ve vnějším ovzduší a 33,2 ng/m³ ve vnitřním ovzduší).

prasata; krávy; farmy; vzduch; vnitřní; vnější; znečištění; PAH; nitro-PAH; oxy-PAH; PCB; chlorované pesticidy

*Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 525/99/0074).

INTRODUCTION

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), nitro-substituted PAHs (nitro-PAHs), and oxygenated PAHs (oxy-PAHs) rank with ubiquitous air pollutants. Airborne PAHs result from incomplete combustion of organic matter and include also emissions from internal combustion engines. Nitro-PAHs and oxy-PAHs are believed to be products of reactions of PAHs with reactive compounds, such as nitrogen oxides, and ozone, in the post-flame region of combustion and in the atmosphere (Pitts et al., 1978; Harada et al., 1984; Pitts, 1987). It has been well established that many of the airborne PAHs, nitro-PAHs, and oxy-PAHs are mutagenic and/or carcinogenic (Tokita and Ohnishi, 1986; Durant et al., 1996).

The concentrations of atmospheric PAHs typically range from $< 1 \text{ ng/m}^3$ in rural areas to 1 to 10 ng/m^3 in urban areas and can exceed 1000 ng/m^3 in certain industrial settings. The concentrations of nitro-PAHs are generally 10 to 1000 times lower than those of PAHs. The concentrations of oxy-PAHs have been reported to range between 0.05 and 4.0 ng/m^3 in the urban air (König et al., 1983).

Although the atmospheric concentrations of polychlorinated biphenyls (PCBs) and organic chlorinated pesticides (OCPs) are steadily decreasing, the chemicals still rank among relevant contaminants and their presence in the indoor air can pose a risk to human and farm animal health.

Our earlier studies of the farm environment included investigations of mutagenic activity as related to the contamination by PAHs (Raszyk et al., 1995), of the presence of PAHs on swine and cattle farms (Raszyk et al., 1998a) and in feed mills (Raszyk et al., 1999a), and assessment of the 1-hydroxypyrene concentration in the urine of swine and cows as a biomarker of exposure to PAHs (Raszyk et al., 1999b). Since 1984, we have systematically been monitoring the occurrence of PCBs and OCPs in the human feed chain (Raszyk et al., 1996, 1998b).

The present study concentrated on the determination of the concentrations of PAHs, nitro-PAHs, oxy-PAHs, PCBs, and OCPs in the gaseous and the solid phases of the indoor and outdoor air on three pig and two cattle farms in the district of Hodonín in the eastern part of the Czech Republic in the summer 1999. The aim of the study was a) to compare concentrations of selected contaminant groups in the indoor and outdoor air; b) to establish possible differences in the occurrence and concentrations of the selected contaminants in the indoor air of pig and cattle houses; c) to determine proportions of the individual contaminants in the gaseous and the solid phases of the atmosphere. As far as we know, this is the first comprehensive information on the occurrence of the hazardous contaminants in the indoor and outdoor air of pig and cattle farms.

MATERIAL AND METHODS

Chemicals

PAHs (naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, indeno-[123-c,d]pyrene, dibenz[a,h]anthracene, benzo[ghi]perylene), alpha-HCH, beta-HCH, gama-HCH, delta-HCH, hexachlorobenzene, p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT were supplied by Supelco (Bellefonte, USA) and PCBs congeners (IUPAC Nos. 28, 52, 101, 118, 138, 153, 155, 180 and decafluorobiphenyl) by J.T. Baker (Deventer, Holland). 1-Nitronaphthalene, 2-nitronaphthalene, 2-nitrofluorene, 9-nitroanthracene, and 1-nitropyrene were supplied by Aldrich (USA), and 9-nitrophenanthrene, 3-nitrofluoranthene, 6-nitrochrysene, and 6-nitrobenzo[a]pyrene by Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, FRG). Fluorenone (9H-fluorenone), anthraquinone (anthracen-9,10-dione), benzanthrone (7H-benz[de]anthracene-7-one) and benz[a]anthracene-7,12-dione were supplied by Aldrich (Milwaukee, USA), and anthrone (10H-anthracene-9-one) by Sigma (St. Louis, USA).

The organic solvents used were for organic trace analysis. All the other chemicals used were of the highest purity available.

Outdoor and indoor air sampling

Solid particles were captured in a series of glass fibre filter (GF) and gaseous components were adsorbed in polyurethane foam filter (PUF). Air was sucked at a defined volume velocity through the filters placed in a large-volume pump for 24 h.

Indoor air samples were collected on three pig (D, M, T) and on two cattle farms (Na, Ne). Outdoor air samples were collected on one pig (D) and on one cattle (Ne) farms. One sample (cca 400 m^3) was collected from one sampling site.

All the samples were collected in the summer months of 1999 always on Wednesday using a large-volume pump with an output of approx. $20 \text{ m}^3/\text{h}$ (PS-1 Graseby-Andersen, USA) and the following sampling materials: glass microfibre filters Z-5 (Filpap, Štětí, Czech Republic) with a diameter of 102 mm and thickness of $350 \mu\text{m}$; polyurethane foam filters of the polyether type N 2227 (Gumotex, Břeclav, Czech Republic) with a density of 0.022 g/cm^3 put into glass thimbles with a supporting noncorrosive grid (Graseby-Andersen, USA)

Polyurethane foam filters (PUF) were treated in a Soxhlet apparatus with acetone for 9 h and with dichloromethane for 8 h before use. The cleaned filters, wrapped in aluminium foil and sealed in polyethylene bags, were stored at $-22 \text{ }^\circ\text{C}$. Glass fiber filters (GF) were treated with dichloromethane for 8 h and packed and stored as given above.

Extraction, fractionation and GC/MS analyses

The GF and PUF were extracted with 220 ml of dichloromethane in a Soxhlet apparatus for 8 h. The sample aliquote intended for the determination of PAHs was fractionated in an activated silicagel column. The first fraction, eluted with 15 ml of hexane, was removed and the second fraction, eluted with 15 ml of dichloromethane, was analysed for PAHs. Decafluorobiphenyl was used as the internal standard. The samples were analysed by GC/MS using the HP 6890 chromatograph (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) and the capillary column DB5-MS, 60 m, I.D. 0.25 mm (J. & W. Scientific, Folsom, USA). PAHs were detected by monitoring selected ions and quantified using the internal standard method. A total of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons, all ranking with the U.S. EPA priority pollutant PAHs, were determined.

The extracts intended for the determination of PCBs and OCPs were transferred onto columns packed with silicagel pretreated with concentrated sulphuric acid (44 w%), and eluted with 25 ml of 5% dichloromethane in hexane. PCB 155 was used as the internal standard. The samples were analysed by GC/ECD using the chromatograph HP 5890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) and the capillary column HP-5, 50 m, I.D. 0.20 mm (Hewlett-Packard, Palo Alto, USA) for 7 PCB congeners (28, 52, 101, 118, 153, 138, 180), hexachlorobenzene (HCB), 4 hexachlorocyclohexane isomers (α , β , γ , δ), and p,p'-DDT and its metabolites (p,p'-DDE, p,p'-DDD) using the internal calibration method.

Dichloromethane of the sample extract aliquot was replaced with 500 μ l of isooctane and the sample was analysed by GC/MS (GC – Varian, San Fernando, USA and MS – Finnigan, Austin, USA, respectively) without further preparation. GC separation of nitro-PAHs and oxy-PAHs was done in a DB 5 ms fused silica capillary column (15 x 0.25 mm i.d., 0.1 μ m, J. & W. Scientific, Folsom, USA). Helium at a column head pressure of 70 kPa was used as the carrier gas. The temperature programme of the GC oven was set as follows: 1 min hold at 70 °C, to 150 °C at 20 °C/min, to 260 °C at 5 °C/min, and to the final temperature of 280 °C at 3 °C/min followed by a 2.5 min hold. The splitless injection volume was 2 μ l of sample in isooctane with 0.5 μ l of solvent wash at the injector temperature of 230 °C.

An ion trap detector mass spectrometer was used for the detection and identification of the analytes. The transfer line and MS were kept at 235 °C and 220 °C, respectively. The mass spectrometer was operated in EI mode at an electron ionisation energy of 70 eV. A mass range of m/z 100-300 was scanned at a rate of 1 scan/s (7 μ Scans).

Quantification and quality assurance

Washed glassware was rinsed with acetone and hexane and, in some cases, heated in a muffle furnace (450 °C, 4 h)

to remove any traces of chemicals. Quality assurance samples included spiked matrices, spiked controls, procedure blanks and calibration standards in isooctane.

The following quantification limits were determined: 0.005 ng/m³ for naphthalene, acenaphthylene, acenaphthene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluorene, and pyrene; 0.010 ng/m³ for benz[a]anthracene, chrysene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene, benzo[a]pyrene, indeno[123cd]pyrene, dibenz[ah]anthracene, and benzo[ghi]perylene; 0.001 ng/m³ for the PCB congeners 28, 101, 118, 138, 153, and 180, α -HCH, β -HCH, δ -HCH, p,p'-DDE, and hexachlorobenzene; 0.002 ng/m³ for PCB 52, lindane, and p,p'-DDD; 0.007 ng/m³ for p,p'-DDT; 0.02 ng/m³ for 1-nitronaphthalene, 2-nitronaphthalene, and 2-nitrofluorene; 0.04 ng/m³ for 1-nitropyrene; 0.1 ng/m³ for the remaining nitro-PAHs; 0.001 ng/m³ for fluorenone; 0.003 ng/m³ for anthraquinone and benz[a]anthracene-7,12-dione; 0.008 ng/m³ for anthrone and benzanthrone.

RESULTS AND DISCUSSION

Tabs. I and II show the concentrations of the individual PAHs in the indoor and outdoor air, respectively, and Tabs. III and IV the concentrations of the individual PCBs and OCPs in the indoor and outdoor air, respectively. A survey of the occurrence of the contaminants under study in the indoor and outdoor atmosphere of the pig and cattle farms is presented in Tab. V. Tab. VI summarises differences in the indoor concentrations of the contaminants between the pig and the cattle farms. Tab. VII illustrates the distribution of the contaminants in the gaseous and the solid phases of the indoor air.

PAHs

Among all the contaminants, the highest indoor and outdoor concentrations were found for PAHs. The total indoor concentrations of the 16 PAHs (14.4 to 71.5 ng/m³) were three to eight times higher than the corresponding outdoor values (8.4 to 9.5 ng/m³). Among the PAHs, the highest indoor and outdoor concentrations were found for the three-ring compounds phenanthrene and fluoroanthrene. Their maximum outdoor concentrations reached 4.1 and 1.9 ng/m³, respectively, and indoor concentrations 33.2 and 9.0 ng/m³, respectively. The concentrations of the four-ring and higher airborne PAHs, which are mostly adsorbed onto solid particles, were much lower. Therefore, the sum of the 16 PAH concentrations was higher in the gaseous than in the solid phase (5 to 21fold and 9 to 28fold differences for pig and cattle houses, respectively) and the percentages of the seven carcinogenic PAHs were considerably higher in the solid phase (28.4 to 41.5% for pig houses; 37.4 and 52.3% for cow houses) than in the gaseous phase (0.10 to 0.33% for pig houses; 0.20 and 1.16% for cow houses). Among

I. PAH concentrations (ng/m³) in indoor air on the pig and cattle farms in the summer of 1999

Farm	D			M			T			Na			Ne		
	PUF	GF	SUM												
Naphthalene	0.39	0.27	0.65	0.58	0.24	0.83	0.28	0.17	0.45	0.24	0.19	0.43	1.34	0.23	1.57
Acenaphthylene	0.08	0.04	0.12	0.10	0.01	0.11	0.02	0.00	0.02	0.49	0.01	0.49	1.35	0.02	1.37
Acenaphthene	0.19	0.04	0.23	0.38	0.02	0.39	0.11	0.01	0.12	0.44	0.02	0.46	0.79	0.03	0.81
Fluorene	1.07	0.28	1.34	2.67	0.05	2.72	0.50	0.01	0.51	3.23	0.04	3.27	8.55	0.06	8.61
Phenanthrene	12.5	1.14	13.6	12.9	0.31	13.2	6.23	0.07	6.31	23.1	0.14	23.3	32.8	0.41	33.2
Anthracene	1.15	0.11	1.26	0.78	0.03	0.81	0.30	0.01	0.31	1.18	0.01	1.19	2.34	0.05	2.39
Fluoranthene	6.97	0.55	7.51	6.59	0.59	7.18	3.58	0.09	3.67	5.86	0.19	6.05	8.20	0.81	9.02
Pyrene	4.38	0.43	4.81	2.91	0.39	3.29	2.62	0.08	2.69	3.95	0.14	4.09	7.51	0.65	8.16
Benz[<i>a</i>]anthracene(*)	0.10	0.27	0.37	0.02	0.12	0.14	0.03	0.00	0.03	0.05	0.05	0.10	0.41	0.39	0.80
Chrysene(*)	0.16	0.46	0.62	0.06	0.31	0.37	0.09	0.06	0.14	0.13	0.12	0.25	0.58	0.65	1.22
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene(*)	0.05	0.38	0.44	0.02	0.22	0.23	0.01	0.06	0.07	0.02	0.08	0.10	0.13	0.77	0.90
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene(*)	0.02	0.32	0.34	nd	0.14	0.14	nd	0.02	0.02	nd	0.08	0.08	0.05	0.50	0.54
Benzo[<i>a</i>]pyrene(*)	nd	0.38	0.38	nd	0.13	0.13	nd	0.02	0.02	nd	0.08	0.08	nd	0.50	0.50
Indeno(123- <i>cd</i>)pyrene(*)	nd	0.48	0.48	nd	0.15	0.15	nd	0.03	0.03	nd	0.09	0.09	nd	1.04	1.04
Dibenz[<i>ah</i>]anthracene(*)	nd	0.06	0.06	nd	0.02	0.02	nd	nd	nd	nd	0.02	0.02	nd	0.07	0.07
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	nd	0.44	0.44	nd	0.18	0.18	nd	0.04	0.04	nd	0.11	0.11	nd	1.31	1.31
Σ PAHs	27.0	5.6	32.7	27.0	2.9	29.9	13.8	0.7	14.4	38.7	1.4	40.1	64.1	7.5	71.5
Σ carcinogenic PAHs	0.3	2.3	2.7	0.1	1.1	1.2	0.1	0.2	0.3	0.2	0.5	0.7	1.2	3.9	5.1

Legends: PUF – gaseous phase
 GF – particle phase
 SUM – sum of PUF and GF

(*) – animal carcinogens
 nd – not detected

II. PAH concentrations (ng/m³) in outdoor air samples on the pig farm D and the cattle farm Ne in the summer of 1999

Farm	D			Ne		
	PUF	GF	SUM	PUF	GF	SUM
Naphthalene	0.08	0.08	0.16	0.14	0.10	0.25
Acenaphthylene	0.01	0.01	0.01	0.05	nd	0.05
Acenaphthene	0.02	0.01	0.03	0.03	0.01	0.04
Fluorene	0.47	0.02	0.49	0.32	0.01	0.33
Phenanthrene	3.68	0.19	3.87	4.02	0.04	4.06
Anthracene	0.13	0.01	0.15	0.16	0.01	0.17
Fluoranthene	1.40	0.34	1.74	1.87	0.03	1.90
Pyrene	0.96	0.31	1.27	1.22	0.03	1.25
Benz[<i>a</i>]anthracene(*)	0.04	0.13	0.17	0.03	0.02	0.05
Chrysene(*)	0.07	0.25	0.32	0.04	0.03	0.07
Benzo[<i>b</i>]fluoranthene(*)	0.01	0.38	0.39	nd	0.05	0.05
Benzo[<i>k</i>]fluoranthene(*)	nd	0.23	0.23	nd	0.03	0.03
Benzo[<i>a</i>]pyrene(*)	nd	0.11	0.11	nd	0.04	0.04
Indeno(123- <i>cd</i>)pyrene(*)	nd	0.26	0.26	nd	0.05	0.05
Dibenz[<i>ah</i>]anthracene(*)	nd	0.01	0.01	nd	nd	nd
Benzo[<i>ghi</i>]perylene	nd	0.25	0.25	nd	0.06	0.06
Σ PAHs	6.9	2.6	9.5	7.9	0.5	8.4
Σ carcinogenic PAHs	0.1	1.4	1.5	0.1	0.2	0.3

Legends: PUF – gaseous phase (*) – animal carcinogens
 GF – particle phase nd – not detected
 SUM – sum of PUF and GF

them, the highest indoor concentrations were found for chrysene (0.14 to 0.65 ng/m³). Benzo[*a*]pyrene was found only in the solid phase and amounted only to 6 – 14% of the total indoor carcinogenic PAHs. The total indoor concentrations of the 16 PAHs were higher in cow houses than in pig houses (40.1 to 71.5 vs. 14.4 to 32.7 ng/m³). This difference was apparently due to the contribution of exhaust gases from the tractors passing along the cow houses. Another source of PAHs may have been feeds of plant origin contaminated by immissions (wet and dry deposits) during the vegetation period. The highest total indoor concentration of the 16 PAHs was found in the cow house of the farm Ne (71.5 ng/m³).

Significant sources of the outdoor PAHs include exhaust gases produced by tractors, other agricultural machines, lorries, and passenger cars, repair shops, asphalted roads, burning of straw stacks, burning off of grass, burning of communal waste, and atmospheric immissions (dry and wet deposits).

No binding limits for airborne carcinogenic PAHs have been issued in the Czech Republic. The National Reference Laboratory at the National Health Institute, Prague has recommended 1 ng/m³ as the permissible concentration for airborne benzo[*a*]pyrene for daily exposure. Our results indicate that both indoor and out-

door concentrations of this carcinogen (0.02 to 0.50 and 0.04 to 0.11 ng/m³, respectively) were fairly below this limit.

In some regions of the Czech Republic, such as the district of Karviná with a high concentration of coke and metallurgic plants, the mean annual concentration of outdoor airborne benzo[*a*]pyrene fluctuated around 5 ng/m³ (Anděl et al., 1999) and the indoor concentrations in metallurgic works varied between 2 and 62 ng/m³ during a 8-hour shift (Binková et al., 1998). No system of nation-wide monitoring of airborne PAHs has been implemented in the Czech Republic. Data obtained from one district within the Program Teplice, running since 1991, indicate only minor changes in the mean annual concentrations of airborne PAH during the period 1991–1998 (Šrám et al., 1999). The winter outdoor concentrations were several times higher than the summer values owing to the combustion of much larger amounts of fossil fuels.

Nitro-PAHs

Tab. V and VI shows the sum of concentrations of nitro-PAHs. Like oxy-PAHs, nitro-PAHs are secondary contaminants stemming from PAHs. Their occurrence and concentrations therefore depend on the amount of airborne PAHs.

Only 1-nitropyrene was identified in the outdoor air (pig farm D 0.02 ng/m³) and only low concentrations of 1-nitronaphthalene, 2-nitrofluorene, and 1-nitropyrene were found in the indoor air. The gaseous phase contained 1-nitronaphthalene (pig farm M 0.12 ng/m³) and 2-nitrofluorene (pig farm T 0.21 ng/m³; cattle farms Ne and Na 0.04 and 0.1 ng/m³, respectively). Only 1-nitropyrene was identified in the solid phase (pig farms M and D 0.04 and 0.05 ng/m³, respectively). The low concentrations of nitro-PAHs are apparently due to their low stability in the air and during sample processing (Tab. V and VI).

Oxy-PAHs

Tab. V and VI shows the sum of concentrations of oxy-PAHs. Unlike the other contaminant groups, the concentrations of oxy-PAHs were generally higher in the outdoor than in the indoor air in spite of the fact that the highest value was recorded for indoor air collected on the cattle farm Na (5.24 ng/m³). The highest outdoor concentration was 4.86 ng/m³ (pig farm D). The concentrations of oxy-PAHs were higher in the gaseous than in the solid phase (0.02 to 5.19 vs. 0.01 to 0.55 ng/m³).

The highest concentrations were found for fluorenone and anthraquinone (0.4 to 5.24 and 0.01 to 1.76 ng/m³, respectively). High concentrations of the former were also found in outdoor samples (farms Ne and D 1.3 and 2.9 ng/m³, respectively). In the indoor samples, the concentrations of fluorenone were lower than those of fluo-

III. PCB and chlorinated pesticide concentrations (ng/m³) in indoor air on the pig and cattle farms in the summer of 1999

Farm	D			M			T			Na			Ne		
	PUF	GF	SUM												
PCB 28	0.05	0.01	0.06	0.04	nd	0.05	0.10	nd	0.10	0.08	0.01	0.08	0.05	nd	0.05
PCB 52	0.04	nd	0.04	0.04	nd	0.04	0.11	nd	0.12	0.05	nd	0.06	0.03	nd	0.03
PCB 101	0.05	0.01	0.07	0.06	0.01	0.07	0.37	0.02	0.39	0.03	0.01	0.04	0.03	0.01	0.04
PCB 118	0.01	nd	0.01	0.01	nd	0.02	0.11	0.01	0.12	0.01	nd	0.01	nd	nd	0.01
PCB 153	0.05	0.02	0.07	0.06	0.02	0.08	0.37	0.04	0.41	0.04	0.01	0.05	0.03	0.01	0.04
PCB 138	0.03	0.02	0.04	0.04	0.02	0.05	0.28	0.04	0.32	0.03	0.01	0.04	0.02	0.01	0.02
PCB 180	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.02	0.07	0.03	0.09	0.02	0.01	0.02	0.01	0.01	0.01
Σ PCBs	0.23	0.07	0.30	0.26	0.06	0.32	1.40	0.14	1.55	0.26	0.04	0.30	0.16	0.04	0.20
alpha-HCH	0.08	0.02	0.11	0.02	0.01	0.03	0.06	0.03	0.08	0.05	0.02	0.07	0.06	0.03	0.09
beta-HCH	nd	0.01	0.01	nd	nd	nd	0.03	0.01	0.03	nd	0.01	0.01	nd	nd	nd
gama-HCH (lindane)	4.14	0.08	4.22	0.38	0.01	0.39	3.29	0.02	3.30	2.41	0.02	2.42	1.41	0.02	1.42
delta-HCH	nd														
Σ HCHs	4.22	0.11	4.33	0.40	0.01	0.41	3.37	0.05	3.42	2.45	0.05	2.50	1.46	0.05	1.51
p,p'-DDE	0.08	0.02	0.09	0.07	0.01	0.08	0.23	0.01	0.24	0.12	0.01	0.13	0.05	0.01	0.05
p,p'-DDD	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01	nd	nd	0.01	0.01	nd	0.01
p,p'-DDT	0.01	0.01	0.02	0.01	nd	0.01	0.13	0.01	0.14	0.01	nd	0.01	0.01	nd	0.01
Σ DDTs	0.09	0.03	0.12	0.08	0.01	0.10	0.37	0.02	0.39	0.14	0.01	0.15	0.06	0.01	0.07
Hexachlorobenzene	0.05	nd	0.05	0.04	nd	0.04	0.03	nd	0.04	0.09	nd	0.10	0.07	nd	0.07

Legends: PUF – gaseous phase nd – not detected
 GF – particle phase
 SUM – sum of PUF and GF

IV. PCB and chlorinated pesticide concentrations (ng/m³) in outdoor air samples on the pig farm D and the cattle farm Ne in the summer of 1999

Farm	D			Ne		
	PUF	GF	SUM	PUF	GF	SUM
PCB 28	0.02	nd	0.02	0.01	nd	0.01
PCB 52	0.01	nd	0.02	0.01	nd	0.01
PCB 101	0.01	nd	0.01	0.01	nd	0.02
PCB 118	nd	nd	nd	0.01	nd	0.01
PCB 153	0.02	0.01	0.02	0.02	0.01	0.03
PCB 138	0.01	nd	0.02	0.02	nd	0.02
PCB 180	0.01	nd	0.01	0.01	nd	0.01
Σ PCBs	0.08	0.02	0.10	0.08	0.02	0.10
alfa-HCH	0.02	0.01	0.03	0.01	0.01	0.02
beta-HCH	0.02	nd	0.02	0.01	nd	0.01
gama-HCH(Lindane)	0.07	0.01	0.08	0.04	0.02	0.06
delta-HCH	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Σ HCHs	0.11	0.02	0.13	0.06	0.03	0.09
p,p'-DDE	0.05	0.01	0.06	0.08	0.01	0.09
p,p'-DDD	0.01	nd	0.01	nd	nd	nd
p,p'-DDT	0.02	0.01	0.02	0.02	nd	0.02
Σ DDT	0.07	0.02	0.08	0.11	0.01	0.11
Hexachlorobenzene	0.02	nd	0.02	0.02	nd	0.02

Legends: PUF – gaseous phase nd – not detected
 GF – particle phase
 SUM – sum of PUF and GF

rene, while in the outdoor samples, the concentrations of the two analytes were approximately equal.

Anthrone was not identified in any of the samples; the apparent cause was its instability (data not shown here) resulting in losses during sample extraction.

The highest concentration of anthraquinone was found in an outdoor sample (farm D 1.8 ng/m³).

Benzanthrone was found only in one indoor sample (cattle farm Ne 0.03 ng/m³).

Benz[a]anthracene-7,12-dione was found at low concentrations in both indoor and outdoor samples (0.01 to 0.04 and 0.01 to 0.02 ng/m³, respectively).

PCBs

Although the production of PCBs (Delor, Delotherm, Hydeler) was discontinued in the former Czechoslovak Republic in 1984 their residues can still be detected in various environmental matrices.

The major sources of PCBs on pig and cattle farms are coating compositions containing Delor 106. Their use in the Czech Republic is prohibited since 1984. Another sources include capacitors and transformers containing Delor 103 in their fillings and hydraulic fluids containing

V. Indoor and outdoor contaminant concentrations (ng/m³) in selected pig and cattle houses

Contaminants	Pig farm D		Cattle farm Ne	
	Outdoor	indoor	outdoor	indoor
PAHs	9.50	32.7	8.40	71.5
Carcinogenic PAHs	1.5	2.7	0.3	5.1
Oxy-PAHs	4.86	0.03	1.44	0.09
Nitro-PAHs	0.20	0.05	nd	0.06
PCBs	0.10	0.30	0.10	0.20
HCHs	0.13	4.33	0.09	1.51
DDT	0.08	0.12	0.11	0.07
HCB	0.02	0.05	0.02	0.07

nd – not detected

VI. Differences in indoor contaminant concentrations (ng/m³) between pig and cattle farms

Contaminant	Pig farms	Cattle farms
PAHs	14.4–32.7	40.1–71.5
carcinogenic PAHs	0.30–2.70	0.70–5.10
oxy-PAHs	0.03–1.91	0.09–5.24
nitro-PAHs	0.05–0.21	0.06–0.10
PCBs	0.30–1.51	0.20–0.30
HCHs	0.41–4.33	1.51–2.50
DDTs	0.10–0.39	0.07–0.15
HCB	0.04–0.05	0.07–0.10

VII. Distribution of contaminant concentrations (ng/m³) in the gaseous and solid phases of the indoor air

Contaminant	Gaseous phase	Solid phase
PAHs	6.9–64.1	0.50–7.50
Oxy-PAHs	0.02–5.19	0.01–0.55
Nitro-PAHs	0.04–0.21	0.02–0.05
PCBs	0.08–1.40	0.02–0.14
HCHs	0.06–4.22	0.01–0.11
DDTs	0.06–0.37	0.01–0.03
HCB	0.02–0.10	nd

nd – not detected

Hydeler 103. A permanent source of PCBs are rendering plant products (fat, meat-and-bone meals) used as feed components.

Like PAHs, the concentrations of PCBs were higher in the gaseous phase than in the solid phase of the indoor air (3 to 10 times for pig houses and 5 to 6 times for cow houses). Unlike PAHs, the indoor concentrations of PCBs were higher in pig houses than in cow houses (0.30 to 1.55 vs. 0.20 to 0.30 ng/m³). Irrespective of the phase, the dominating congeners found in the indoor samples collected in the pig and cattle houses were PCB 28 and PCB153, respectively. The indoor concentrations

in both pig and cow houses were 2 to 15 times higher than the corresponding outdoor concentrations. The highest indoor Σ PCB concentration was found on the pig farm T (1.55 ng/m³). The difference in the dominating congeners allow us to assume that the major contamination source in the cow houses was leakage of filling from capacitors and transformers containing the lower-chlorinated PCBs and in pig houses paint coats containing the higher chlorinated PCBs.

No hygienic indoor or outdoor limits for airborne total PCBs or congeners have been laid down in the Czech Republic. Of the seven indicator congeners investigated within this study, PCB 118 with the WHO toxic equivalency factor of 0.0001 (Van den Berg et al., 1998) is considered the most hazardous. Its concentration in the air samples was very low, however (0.01 and 0.01 to 0.12 ng/m³ for the outdoor and indoor samples, respectively).

The monitoring of airborne PCB congeners 138, 153, and 180, done in the Czech Republic in 1991–1992 demonstrated the mean summary concentration of 0.169 ng/m³ (Holoubek et al., 1992). The Regional Background Observatory, Košetice (Czech Republic), monitoring air concentrations of seven indicator PCB congeners, reported the mean value of 0.194 ng/m³ for the period 1996–1998. The concentration of airborne PCBs in rural areas (15 km away from Chicago) fluctuated within the range 0.1–1.1 ng/m³ (Zhang et al., 1999). Our investigations showed that the outdoor concentrations were at the background level and the indoor concentrations were 3 to 15 times higher.

Unlike PAHs, PCBs, reached higher concentrations in the summer months. The increase was apparently due to increased volatilisation of PCBs from soil at higher temperatures (Kaupp et al., 1996).

DDT

The use of DDT-based products in agriculture is prohibited in the Czech Republic since 1974. Up to that time, the use was very intensive, however. Current DDT sources can include some feed components, such as fish meal or soy imported from South America or Africa where this insecticide is still being used for the control of vectors of malaria and sleeping disease. It is expected, however, that even there the use will be discontinued within the next 10 years. Another source of DDT on farms can be soil in close vicinity of cow and pig houses. Our analyses, done in 1999, demonstrated mean Σ DDT concentrations (6 isomers) of 0.015 and 0.013 mg/kg for soil samples collected around cow and pig houses, respectively.

The indoor Σ DDT concentrations were higher in the gaseous than in the solid phase (3 to 17 times for pig farms and 11 to 13 times for cow farms) and in pig houses than in cow houses (0.10 to 0.39 vs. 0.07 to 0.15 ng/m³). p,p'-DDE was the dominant metabolite in the indoor and outdoor samples collected on the pig and cattle farms.

No marked differences in the DDT concentrations were found between the indoor and outdoor air samples. The only exception was the pig farm T, where also the highest Σ DDT concentration in the indoor air was found (0.39 ng/m³).

No hygienic limits for indoor and outdoor concentrations of airborne DDT have been laid down in the Czech Republic. p,p'-DDE is considered the most hazardous of the six DDT isomers investigated within this study. This isomer is very persistent, penetrates into the human food chain, and cumulates in lipid tissue. Pigs are known to be more susceptible to DDT than cattle (Piskač et al., 1985).

Only few data on the occurrence of DDT in the atmosphere were published in the recent years. The concentrations of p,p'-DDE in air samples collected in the proximity of a farm in eastern North Dakota, USA, ranged from 0.01 to 0.20 ng/m³ (Hawthorne et al., 1996). In another study, the concentrations of this isomer in air samples collected over DDT-contaminated soil ranged from 6 to 13 ng/m³ (Spencer et al., 1996). Indoor and outdoor concentrations after spray treatment with DDT within an antimalaria campaign in Sardinia in 1940 ranged from 170 to 600 and 24 to 84 mg/m³, respectively (Cocco et al., 1997).

HCH

The indoor concentrations of Σ HCH were higher in the gaseous than in the solid phase (pig houses 27 to 65 times, cow houses 32 to 50 times). The concentration of γ -isomer (lindane) predominated in the gaseous phase of both the indoor (93 to 97%) and outdoor (63 to 71%) samples. The concentrations of lindane were much higher in the indoor than in the outdoor samples (52 times for pig houses, 16 times for cattle houses).

The highest HCH and lindane concentrations in indoor air samples were found on the pig farm D (4.35 ng/m³ for Σ HCH, 4.22 ng/m³ for lindane). Up to 1990, the pigs of this farm were repeatedly sprayed with 1% or 1.5% Fenofort forte containing 10% of lindane as a therapeutic or preventive treatment against ectoparasitic infections. Although this insecticide has not been distributed and used since 1991, higher concentrations of lindane are still present in the air of some barns. Another source of lindane may have been the insecticide Lindan WP 80 used up to the end of 1993 for the protection of rape cultures against the pest *Ceutorrhynchus pleurostigma*. Further possible sporadic sources may have been lindane-contaminated components of concentrate mixtures.

No outdoor or indoor hygienic limits for lindane have been laid down in the Czech Republic. Only sporadic data on the concentrations of airborne lindane were published in the last five years. Lindane at concentrations of 0.3 to 6.3 ng/m³ was identified as the major pesticide air pollutant in Paris in 1992 to 1993 (Chevreuil et al., 1996). Mean

concentrations of lindane in air samples collected in a rural area of Québec in 1992 (Poissant and Koprivnjak, 1996) and in rain water samples collected in Norway in 1991 to 1995 were 0.04 and 4.4 ng/m³ (Wania and Haugen, 1999).

HCB

The concentrations of HCB were very low in all the samples analysed within this study. The outdoor concentrations fluctuated around 0.02 ng/m³ and the indoor concentrations ranged from 0.04 to 10.0 ng/m³. The mean concentration reported by the Regional Background Observatory in Košetice (Czech Republic) for the period 1996 to 1998 was 0.181 ng/m³ (Holoubek et al., 1999). It is evident that the concentration of HCB in barn air was at the background level. The mean concentration of HCB in the gaseous phase of air samples collected in the Augsburg area, Germany, in 1992 to 1993 was 0.29 ng/m³ (Kaupp et al., 1996). The fungicide Agronal H, containing HCB and mercury compounds as the active components, which was very effective against fungal spores contaminating wheat grains, is no more used. No agricultural chemicals used currently in the Czech Republic contain HCB.

CONCLUSIONS

a) Indoor and outdoor contaminant concentrations on selected pig and cattle farms

Except for oxy-PAHs, the indoor concentrations of all the contaminants under study were higher than the outdoor concentrations (Tab. V). The ventilation of all the pig and cattle houses was effective enough to prevent any accumulation of contaminants penetrating from the outer environment. Hence, the sources of the contaminants must have been in the indoor environment. Their sources are discussed separately for each group of the contaminants. The most significant source of oxy-PAHs is the atmospheric PAH oxidation.

b) Differences in indoor concentrations of contaminants between pig and cattle houses

The most marked differences in indoor contaminant concentrations between pig and cattle houses were found for PAHs, Oxy-PAHs, PCB, and HCHs (Tab. VI). The higher concentrations of PAHs and oxy-PAHs in cow houses were due above all to the contribution of tractor exhaust gases. On the other hand, the higher concentrations of PCBs and HCHs resulted apparently from the use of PCB-containing paint coats and lindane-containing insecticides, respectively.

c) Distribution of indoor contaminant concentration in the gaseous and solid phases

Due to the rather high volatility, the major part of the indoor contaminants was present in the gaseous phase (Tab. VII). The solid phase contained largely the carcinogenic PAHs with the highest toxic potential.

The information on the occurrence and concentrations of hazardous contaminants in barn air are relevant to both veterinary medicine (animal health and food chain protection) and human preventive and occupational medicine (health of farm personnel). In 1998 the American Thoracic Society summarised the available information on respiratory health hazards in agriculture paying considerable attention to the relatively new area of chemical exposure and the lung (Schenker, 1998).

Increased attention to bioaccumulative and toxic substances is currently paid also in Central and East European countries (Holoubek et al., 1999). Agriculture ranks with the most important contamination sources and therefore sources of such compounds should be identified and their concentrations monitored.

REFERENCES

- Anděl K., Kolářová E., Čížková M. (1999): Benzo[a]pyrene in ambient air in the district of Karviná (in Czech). *Ochrana Ozduší*, 11, 22–24.
- Binková B., Topinka J., Mráčková G., Gajdošová D., Vidová P., Stávková Z., Peterka V., Pilčík T., Římař V., Dobiáš L., Farmer P. B., Šrám R. (1998): Coke oven workers and GSTM1 and NAT2 genotypes on DNA adducts levels in white blood cells and lymphocytes as determined by 32P-postlabelling. *Mutat. Res.*, 416, 67–84.
- Chevreuil M., Garmouma M., Teil M. J., Chesterikoff A. (1996): Occurrence of organochlorines (PCBs, pesticides) and herbicides (triazines, phenylureas) in the atmosphere and in the fallout from urban and rural stations of the Paris area. *Sci. Total. Environ.*, 182, 25–37.
- Cocco P., Blair A., Congia P., Saba G., Flore C., Ecra M. R., Palmas C. (1997): Proportional mortality of dichloro-diphenyl-trichloroethane (DDT) workers: a preliminary report. *Arch. Environ. Health*, 52, 299–303.
- Durant J. L., Busby Jr. W. F., Lafleur A. L., Penman B. W., Crespi C. L. (1996): Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. *Mutat. Res.*, 371, 123–157.
- Harada T., Yamauchi T., Sawai K., Yamamura T., Koseki Y., Ishii T. (1984): In situ emission levels of carcinogenic and mutagenic compounds from diesel and gasoline engine vehicles on an expressway. *Environ. Sci. Technol.*, 18, 895–902.
- Hawthorne S. B., Miller D. J., Louie P. K. K., Butler R. D., Mayer G. G. (1996): Vapour-phase and particulate – associated pesticides and PCB concentration in eastern north Dakota air samples. *J. Environ. Qual.*, 25, 594–600.

- Holoubek I., Kočan A., Petřík J., Chovancová J., Bilíková K., Kořínek P., Holoubková I., Pekárek J., Kott F., Pacl A., Bezačinský M., Neubauerová L. (1992): Project TOCOEN – The fate of selected organic compound in the environment. Part XI. The PAHs, PCBs PCDDs/Fs in ambient air at area of background GEMS station. Seasonal variations. *Toxicol. Environ. Chem.*, *36*, 115–123.
- Holoubek I., Kočan A., Holoubková I., Kohoutek J., Falandysz J., Roots O. (1999): Persistent, bioaccumulative and toxic chemicals in central and eastern European countries-State-of-the-Art report. TOCOEN Report No. 150, <http://recetox.chemi.muni.cz/>.
- Kaupp H., Dorr G., Hippelein M., McLachlan M. S., Hutzinger O. (1996): Baseline contamination assessment for a new resource recovery facility in Germany. 4. Atmospheric concentrations of polychlorinated biphenyls and hexachlorobenzene. *Chemosphere*, *32*, 2029–2042.
- König J., Balfanz E., Funcke W., Romanowski T. (1983): Determination of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particulate matter by capillary gas chromatography and gas chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.*, *55*, 599–603.
- Piskač A., Kačmár P., Bartík M., Procházka Z., Svobodová Z., Šíkula J. (1985): *Veterinary Toxicology* (in Czech). 1st Ed., Prague, State Agricultural Publishing, 256 pp.
- Pitts Jr. J. N. (1987): Nitration of gaseous polycyclic aromatic hydrocarbons in simulated and ambient urban atmospheres: A source of mutagenic nitroarenes. *Atmos. Environ.*, *21*, 2531–2547.
- Pitts Jr. J. N., VanCauwenbergh K. A., Grosjean D., Schmid J. P., Fitz D. R. (1978): Atmospheric reactions of polycyclic aromatic hydrocarbons: facile formation of mutagenic nitro derivatives. *Science*, *202*, 515–519.
- Poissant L., Koprivnjak J. F. (1996): Fate and atmospheric concentrations of alpha- and gamma-hexachlorocyclohexane in Quebec, Canada. *Environ. Sci. Technol.*, *30*, 845–851.
- Raszyk J., Pokorná Z., Strnadová V., Gajdůšková V., Ulrich R., Jarošová A., Salava J., Palác J. (1995): Mutagenicity of stable dust and drinking water on swine and cattle farms. *Vet. Med.–Czech*, *40*, 273–278.
- Raszyk J., Gajdůšková V., Ulrich R., Nezveda K., Jarošová A., Šabatová V., Dočekalová H., Salava J., Palác J., Schöndorf J. (1996): Evaluation of the presence of harmful pollutants in fattened pigs (in Czech). *Vet. Med.–Czech*, *41*, 261–266.
- Raszyk J., Ulrich R., Gajdůšková V., Salava J., Palác J. (1998a): Occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on pig and cattle farms (in Czech). *Vet. Med.–Czech*, *43*, 17–25.
- Raszyk J., Gajdůšková V., Ulrich R., Jarošová A., Nápravnik A., Salava J., Palác J. (1998b): Evaluation of the occurrence of some harmful pollutants on cattle farms (in Czech). *Vet. Med.–Czech*, *43*, 233–238.
- Raszyk J., Ulrich R., Salava J., Palác J. (1999a): Evaluation and occurrence of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in animal feed factories. *Vet. Med.–Czech*, *44*, 295–300.
- Raszyk J., Neča J., Salava J., Palác J. (1999b): A pilot study of 1-hydroxypyrene in the urine of pigs and cows. *Vet. Med.–Czech*, *44*, 359–363.
- Schenker M. B. (Ed.) (1998): Respiratory health hazards in agriculture. *Am. J. Respir. Crit. Care Med. (Suppl.)*, *158*, S1–S76.
- Spencer W. F., Singh G., Taylor C. D., LeMert R. A., Cliath M. M., Farmer W. J. (1996): DDT persistence and volatility as affected by management practices after 23 years. *J. Environ. Qual.*, *25*, 815–821.
- Šrám R. (Ed.) (1999): *Teplice Program II – Results 1998* (in Czech). Prague, Czech Environmental Institute, 90 pp.
- Tokiwa H., Ohnishi Y. (1986): Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, *17*, 23–60.
- Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld A. T. C., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J. P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S. W., Kubiak T., Larsen J. C., Rolaf van Leeuwen F. X., Djen Liem A. K., Nolt C., Peterson R. E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F., Zacharewski T. (1998): Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ. Health Perspect.*, *106*, 775–792.
- Wania F., Haugen J. E. (1999): Long term measurements of wet deposition and precipitation scavenging of hexachlorocyclohexanes in Southern Norway. *Environ. Pollut.*, *105*, 381–386.
- Zhang H. X., Eisenreich S. J., Franz T. R., Baker J. E., Offenberg J. H. (1999): Evidence for increased gaseous PCB fluxes to Lake Michigan from Chicago. *Environ. Sci. Technol.*, *33*, 2129–2137.

Received: 00-04-21

Accepted after corrections: 00-06-23

Contact Address:

RNDr. Miroslav C i g a n e k, 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: ciganek@vri.cz

PREVALENCE OF ANTIBODIES TO *BORRELIA BURGdorFERI* IN HORSES OF EAST SLOVAKIA*

VÝSKYT PROTILÁTKO *BORRELIA BURGdorFERI* U KONÍ NA VÝCHODNOM SLOVENSKU

A. Štefančíková¹, G. Štepanová², B. Peťko¹, D. Nadzamová¹, E. Szeštáková³, I. Škardová³, R. Leinstein³

¹Parasitological Institute of Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic

²University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

³Parasitological Institute of Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic

ABSTRACT: In studying the circulation of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in animal population, sera of 207 clinically healthy horses from 11 districts of East Slovakia were examined by ELISA. Of all the sera examined anti-Borrelia IgG antibodies were detected in 99 horses, i.e. in 47.8%. The highest seroprevalence was observed in the districts Prešov (59.1%) and Košice (55.2%). A slightly lower seroprevalence was recorded in the districts Stropkov (43.7%) and Poprad (33.3%). A significantly lower seroprevalence relative to the districts Prešov and Košice was recorded from Michalovce district (23.8%) (χ^2 -test, $P < 0.05$). In the remaining districts (Bardejov, Kežmarok, Levoča, Stará Ľubovňa, Rožňava and Spišská Nová Ves) the seroprevalence was 25–100%, but the number of animals examined was low (2–5 horses). An analysis of seroprevalence made with respect to the age showed that there was no significant difference between 1–3-year-old horses (40.9%) and older horses (48.5, or 48.7%). Seroprevalence showed the same pattern of its occurrence as regards the exploitation of horses. Considering the months of taking blood samples, a significantly lower seroprevalence was identified in spring season (40.0%) than in summer (62.0 %) (χ^2 -test, $P < 0.05$). The occurrence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in horses in East Slovakia alerts veterinarians to consider this disease in their clinical practice and not to disregard it in differential diagnosis.

Borrelia burgdorferi sensu lato; antibodies; ELISA; horses

ABSTRAKT: Pri štúdiu cirkulácie *Borrelia burgdorferi* v animálnej populácii sme vyšetrili séra 207 klinicky zdravých koní z 11 okresov východného Slovenska metódou ELISA. Z celkového súboru vyšetrených sér sa antiboreliové IgG protilátky zistili u 99 koní, tj. 47,8 %. Najvyššia séroprevencia bola v okresoch Prešov (59,1 %) a Košice (55,2 %). Mierne nižšia bola v severných okresoch Stropkov (43,7 %) a Poprad (33,3 %). Signifikantne nižšia séroprevencia v porovnaní s okresmi Prešov a Košice bola v Michalovciach (23,8 %) (χ^2 -test, $P < 0,05$). V ostatných okresoch (Bardejov, Kežmarok, Levoča, Stará Ľubovňa, Rožňava a Spišská Nová Ves) séroprevencia bola zistená u 25 až 100 % koní, avšak počet vyšetrených zvierat bol nízky (dva až päť koní). Na základe analýzy séroprevencie podľa veku sa nezistili signifikantné rozdiely medzi jeden- až trojročnými (40,9 %) a staršími koňmi (48,5, resp. 48,7 %). Rovnaký priebeh výskytu antiboreliových protilátok sme zistili pri hodnotení pracovného využitia koní. Signifikantne nižšiu séroprevenciu sme zistili na jar (40,0 %) ako v lete (62,0 %) (χ^2 -test, $P < 0,05$). Výskyt antiboreliových protilátok u koní na východnom Slovensku je signálom pre veterinárnych lekárov, aby sa na toto ochorenie myslelo v klinickej praxi a nebolo opomenuté pri diferenciálnej diagnostike.

Borrelia burgdorferi sensu lato; protilátky; ELISA; kone

*Supported by the Scientific Grant Agency of the Slovak Republic – VEGA (Grant No. 2/4165/98).

INTRODUCTION

Lyme borreliosis is an important multisystemic infection of humans and animals. The main link in the epidemiology of this disease is an infected tick, harbouring borreliae for a long time, transmitting them through the developmental stages and in case of the overall infection most likely also transovarially (Lane and Burgdorfer, 1986). Unlike in geographically defined areas with the focal occurrence of tick-borne encephalitis virus, *B. burgdorferi* is more dispersed and bound to the areas where ticks find suitable conditions for their existence (Zeman et al., 1990).

Our concern for the problems of Lyme borreliosis has been elicited by reports on its incidence in the neighbouring countries. In Austria, Stanek and Flamm (1985) reported the first findings of this infection in humans. The occurrence of *erythrema chronicum migrans* (ECM) in humans in Hungary was reported by Bózsik et al. (1986), in Italy by Trevisan et al. (1986), in the Czech Republic by Doutlík et al. (1985). The initial surveys of ticks in the territory of Slovakia proved their extensive infestation with borreliae (Kmety et al., 1986, 1990). Borrelia infection rate in ticks in Slovakia has also been confirmed by other authors (Řeháček et al., 1991; Prokopčáková et al., 1992; Drgoňová and Řeháček, 1995; Peťko et al., 1996). The first results about the presence of anti-Borrelia antibodies in dogs from urban and suburban areas of Košice suggest their considerable exposure to this zoonosis (Štefančíková et al., 1996).

Within the complex research of Lyme borreliosis in Slovakia in a veterinary field, we present the first findings on seropositivity of horses from selected districts of East Slovakia.

MATERIAL AND METHODS

Serum samples

Over the years 1996–1998, serum samples from 207 horses were examined for anti-Borrelia antibodies. Blood sera were collected from 39 herds from 11 districts of East Slovakia: Košice sera 76 from 10 herds, Prešov 54/9, Stropkov 16/2, Poprad 30/7, Michalovce 21/5, Bardejov 2/1, Rožňava 2/1, Spišská Nová Ves 2/1, Levoča 5/1, Stará Ľubovňa 5/1 and Kežmarok 4/2. The sera were provided by State Veterinary Institutes in Košice and Prešov, Veterinary Department of the University of Veterinary Medicine in Košice and the Military Training Camp in Poprad district.

Antigen

Our own endemic strain of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolated from ticks *I. ricinus* in Košice city

was used as antigen, prepared by the method of Tresová et al. (1997). The protein content was assessed by the method of Lowry et al. (1951). The working dilution of antigen was determined by box titration.

Enzyme – linked immunosorbent assay (ELISA)

The sera were examined by a modified ELISA, commercially provided by the Institute of Sera and Vaccines (ÚSOL, Praha) as a medical kit for human diagnosis of Lyme borreliosis in the following way: Microplates were filled with 100 µl antigen diluted in carbonate buffer at pH 9.6 (5 µg/ml) and incubated overnight at 4 °C. After washing three times with phosphate buffer (pH 7.2) 100 µl portions of sera diluted at 1 : 400 in phosphate buffer with 0.05% Tween 20 and 1% BSA were added to each well and incubated at 37 °C for 30 min. After a triple washing of the plates 100 µl portions of anti-horse IgG peroxidase conjugate (Sigma) were added per well, diluted at 1 : 2000. After 30 min of incubation and a subsequent washing 100 µl of substrate solution (pH 5.0) with orthophenylene diamine were added per well. The reaction was stopped with 5% H₂SO₄ after 15 min of incubation. Absorbance was measured at a wave length of 492 nm. Horse serum that proved positive in repeated titrations was used as a positive control. Horse sera that proved negative in repeated titrations, with their absorbance value less than 0.4, served as negative controls. Cut-off was determined as a value of 3 standard deviations above the mean optical density (OD) for negative serum samples. Sera with the absorbance value higher than 0.6 were evaluated as positive. Anti-horse peroxidase conjugate (Sigma) was used.

The reproducibility of ELISA

Six sera samples were repeatedly examined (10 times), two of them being positive with absorbance value higher than 1.2, two with absorbance 0.7–0.9 and two with absorbance less than 0.4. All the sera from 207 horses were duplicated after 6 months' time.

Statistical evaluation was done by χ^2 -test and coefficient of variation (V%) (Reisenauer, 1970).

RESULTS

In the set of sera from 207 horses IgG antibodies were detected in 99 horses, i.e. 47.8% (Tab. I). The highest seroprevalence was found in Prešov and Košice districts, 59.1 and 52.6%, respectively. A lower seroprevalence was recorded in Stropkov and Poprad districts, 43.7 and 33.3%, respectively. A significantly lower seroprevalence relative to districts Prešov and Košice was observed in Michalovce district (23.8%) (χ^2 -test, $P < 0.05$). In the districts Bardejov, Kežmarok, Levoča,

I. Seroprevalence in horses for *B. burgdorferi* in regions studied

Region	Years									Total		
	1996			1997			1998					
	examined	positive	%	examined	positive	%	examined	positive	%	examined	positive	%
Bardejov	–	–	–	–	–	–	2	1	50.0	2	1	50.0
Kežmarok	–	–	–	–	–	–	4	1	25.0	4	1	25.0
Košice*	–	–	–	38	19	50.0	38	21	55.2	76	42	55.2
Levoča	–	–	–	–	–	–	5	2	40.0	5	2	40.0
Michalovce*	–	–	–	4	1	25.0	17	4	23.5	21	5	23.8
Poprad*	15	5	33.3	5	2	40.0	10	3	30.0	30	10	33.3
Prešov*	–	–	–	29	15	51.7	15	11	73.3	44	26	59.1
Rožňava	–	–	–	–	–	–	2	2	100.0	2	2	100.0
Spišská Nová Ves	–	–	–	–	–	–	2	2	100.0	2	2	100.0
Stará Ľubovňa	–	–	–	–	–	–	5	3	60.0	5	3	60.0
Stropkov	–	–	–	9	4	44.4	7	3	42.8	16	7	43.7
Total	15	5	33.3	85	41	48.2	107	53	49.5	207	99	48.7

Michalovce differs from Košice, Prešov and Poprad ($P < 0.05$)

Stará Ľubovňa, Rožňava and Spišská Nová Ves the seroprevalence was 25–100%, but the number of animals examined was low. An analysis of seroprevalence by age (Tab. II) showed that there was no significant difference between 1–3 year-old horses (40.9%), compared with the groups of older horses (48.5, or 48.7%). Seroprevalence showed the same pattern of occurrence as regards the utilization of horses. A significantly lower sero-

prevalence was recorded in spring (40.9%) than in summer time (62.0%), (χ^2 -test, $P < 0.05$) – Tab. III.

ELISA reproducibility: Coefficient of absorbance variation in highly positive sera reached higher values (15.4–20.2%) than in less positive (11.6–16.4%) or negative sera (12.6–14.9%). Duplicate examinations of all sera after 6 months' time showed a 100% reproducibility (positive sera remained positive and negative remained negative).

II. Seroprevalence in horses for *B. burgdorferi* by age and their utilization

Age/years	Examined	Positive	%	Group of horses	Examined	Positive
1–3	22	9	40.9	Breeding	15	5
4–9	103	50	48.5	Race	55	32
10–16	82	40	48.7	Draft	137	62
Total	207	99	47.8	Total	207	99

III. Seroprevalence in horses for *B. burgdorferi* by the months of sampling

Months	Examined	Positive	%
*April	65	26	40
**May	65	27	41.5
**June	50	31	62
**July	27	15	55.5
Total	207	99	47.8

$P < 0.05$ for each pair of months except April - May (*) and April - July (**)

DISCUSSION

Our results on seroprevalence of Lyme borreliosis in horses suggest that out of 207 serum samples taken in East Slovakia districts almost the half was positive (47.8%), with seroprevalence differing with individual districts. Although it is the dog that plays a very important epidemiological role in this serious disease as a constant companion of man to tick-infested areas (Eng et al., 1988), the international literature also presents data on such exposure of free-living animals (Isogai et al., 1991) and farm animals, including horses (Burgess and Mattison, 1987; Bernard et al., 1990; Parker and White, 1992). A seroepidemiological survey conducted in the U.S.A. has proved that in the north-eastern part of the

country some 14–25% of horses are seropositive (Marcus et al., 1985; Magnarelli et al., 1988), in the western U.S.A. 6–35% or more (Magnarelli and Anderson, 1989). In Japan seropositivity in horses is only 2.6–4.6% (Tassai et al., 1993) and in the Czech Republic 7.8% (Tremel, 1993). Horses in Texas have no record of seropositivity (Cohen et al., 1992). Clinical symptoms were recorded in only 10% of seropositive horses (Marcus et al., 1985; Magnarelli and Anderson, 1989).

The differences found in seroprevalences have been caused by several factors. They may include the use of different methods (indirect fluorescent-antibody assay – IFA, indirect enzyme-linked immunosorbent assay – ELISA and Western immunoblot – Wb) or their various modifications, which give different interpretations of results in terms of determining the reaction positivity. Furthermore, it is the geographical variability of *Borrelia burgdorferi* sensu lato that is reflected in the antigenic diversity of isolates used as antigens for serological diagnosis of this serious zoonosis and consequently in a different sensitivity of the method (Anderson et al., 1989; Baranton et al., 1992; Park et al., 1993). Most of the previous studies (Bunikis et al., 1995; Norman et al., 1996; Štefančíková et al., 1998) have proved that antigens prepared from local *Borrelia* isolates give a higher sensitivity of reaction, disclosing a higher seroprevalence. We found seropositive horses in 35 out of 39 herds. Considering the fact that sonicated antigens contain more than 100 proteins (Luft et al., 1989) some of which are equivalent to antigens of more than 60 different bacterial species, is not possible to rule out cross reactions if clinical symptomatology is unavailable. Nevertheless, the prevalence of anti-*Borrelia* IgG antibodies in almost every herd examined suggests a distribution of agents and their possible contact with horses from the eastern part of Slovakia.

The differences in seroprevalence are extensively influenced by the occurrence and different degree of tick infection in the particular territory. Ticks *I. ricinus* are infected with *Borrelia burgdorferi* almost all over the territory of Slovakia with differences between individual localities (Kmety et al., 1990) as well as between individual localities within one particular district (Pet'ko et al., 1996). In addition to ticks, the secondary role in transmission of Lyme borreliosis may also be played by other blood-sucking insects such as horseflies, mosquitoes, mites (Magnarelli et al., 1988).

Our results on the seroprevalence of anti-*Borrelia* IgG antibodies in horses obtained in individual months of the years suggest that this prevalence is connected with the activity of ticks. Considering the fact that this activity peaks in spring and autumn and that IgG antibodies generally start emerging about 1–2 months post infection, this could account for their increased prevalence in summer time as detected by our study. Since we have not determined any IgM antibodies, the presence of which would indicate an early stage of infection, the evidence of IgG antibodies can only serve as an indicator of a mere contact with the agent of Lyme borreliosis, but it

will not determine whether it is the case of acute infection or reinfection. Only scarce data are available on the duration of spirochaetemia and persistence of antibodies in horses (Magnarelli and Anderson, 1989), however, in dogs with subclinical infections or reinfections they were found to persist for 1–2 years or even more (Magnarelli, 1990). It is assumed that titres of anti-*Borrelia* antibodies in horses in endemic areas persist as a result of frequent reinfections (Parker and White, 1992).

The occurrence of *Borrelia burgdorferi* antibodies in horses in East Slovakia alerts veterinarians to pay attention to this disease in their clinical practice and not to disregard it in differential diagnosis. Moreover, knowledge of *Borrelia burgdorferi* circulation in animal population helps detect new foci of this disease, thus also contributing to the protection of human health.

REFERENCES

- Anderson J. F., Magnarelli, L. A., Lefebvre L. B., Andreadis T. G., McAninch J. B., Perng G.C., Johnson R.C. (1989): Antigenically variable *Borrelia burgdorferi* isolated from cottontail rabbits and *Ixodes dentatus* in rural and urban areas. *J. Clin. Microbiol.*, 27, 13–20.
- Baranton G., Postic D., Saint Girons I., Boerlin P., Piffaretti J. C., Assous M., Grimont P. A. D. (1992): Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia gerini* sp. Nov. and group VS461 associated with Lyme borreliosis. *Int. J. System. Bacteriol.*, 42, 378–383.
- Bernard W. V., Cohen D., Bosler E. (1990): Serologic survey for *Borrelia burgdorferi* antibody in horses. Referred to a mid-Atlantic veterinary teaching hospital. *Am. Vet. Med. Assoc.*, 196, 1255–1258.
- Bózsik B. P., Lakos A., Dudai J., Telegedy L., Ambrózy G. Y. (1986): Occurrence of Lyme borreliosis in Hungary. *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 263, 466–467.
- Bunikis J., Olsén B., Westman G., Bergström S. (1995): Variable serum immunoglobulin responses against different *Borrelia burgdorferi* sensu lato species in a population at risk for and patients with Lyme disease. *J. Clin. Microbiol.*, 33, 1473–1478.
- Burgess E. C., Mattison M. (1987): Encephalitis associated with *Borrelia* infection in a horse. *J. Am. Med. Assoc.*, 191, 1457–1458.
- Cohen D., Heck F. C., Heim B. (1992): Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in a population of horses in central Texas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 201, 1030–1034.
- Doutlik S., Hančil J., Kulková H., Sjödenberg B., Stiernstedt G. (1985): Is Lyme disease present also in Czechoslovakia (in Czech)? *Čas. Lék. Čes.*, 124, 1526–1527.
- Drgoňová M., Řeháček J. (1995): Prevalence of Lyme *Borrelia* in Ticks in Bratislava, Slovak Republic. *Centr. Eur. J. Publ. Hlth* 3, 134–137.
- Eng T. R., Wilson M. L., Spielman A., Lastovica C. C. (1988): Greater risk of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs than in people. *J. Infect. Dis.*, 158, 1410–1411.

- Isogai E., Isogai H., Masuzawa T., Yanagihara Y., Sato N., Hayashi S., Maki T., Moci M. (1991): Serological survey for Lyme disease in sika deer (*Cervus nippon yesoensis*) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Microbiol. Immunol.*, **35**, 695–703.
- Kmety E., Řeháček J., Výrosteková V., Kocianová E., Guričová D. (1990): Studies on infestation of *Borrelia burgdorferi* and *Franciscella tularensis* with ticks in Slovakia (in Slovak). *Bratisl. Lek. Listy*, **91**, 251–266.
- Kmety E., Řeháček J., Výrosteková V. (1986): Investigations of ticks for the presence of *Borrelia* in Czechoslovakia. *Zbl. Bakt. Hyg. A*, **263**, 468–470.
- Lane R. S., Burgdorfer W. (1986): Potential role of native and exotic deer and their associated ticks (Acari: Ixodidae) in the Ecology of Lyme Disease in California. USA. *Zbl. Bakt. A*, **263**, 55–64.
- Lowry O. H., Rosebrough N. S., Farr A. L., Randall R. G. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265–275.
- Luft B. J., Jiang W., Munoz P., Dattwyler R. J., Gorevic P. D. (1989): Biochemical and immunological characterization of the surface proteins of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.*, **57**, 3637–3645.
- Magnarelli L. A., Anderson J. F., Shaw E., Post J. E., Palka F. C. (1988): Borreliosis in equids in northeastern United States. *Am. J. Vet. Res.*, **49**, 359–362.
- Magnarelli L. A., Anderson J. F. (1989): Class-specific and polyvalent enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in equids. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **195**, 1365–1368.
- Magnarelli L. A. (1990): Serologic testing for Lyme disease. *Postgraduate Medicine*, **87**, 149–156.
- Marcus L. C., Patterson M. M., Gilfillan R. E., Urband P. H. (1985): Antibodies to *Borrelia burgdorferi* in New England horses: Serologic survey. *Am. J. Vet. Res.*, **46**, 2570–2571.
- Norman G. L., Antig J. M., Bigaignon G., Högrefé W. R. (1996): Serodiagnosis of Lyme Borreliosis by *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garini* and *B. afzelii* Western blots (Immunoblots). *J. Clin. Microbiol.*, **34**, 1732–1738.
- Park K. H., Chang W. H., Schwan T. G. (1993): Identification and characterization of Lyme disease spirochetes *Borrelia burgdorferi* sensu lato, isolated in Korea. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 1831–1837.
- Parker J. L., White K. K. (1992): Lyme borreliosis in cattle and horses: A review of the literature. *Cornell. Vet.*, **82**, 253–274.
- Pet'ko B., Štefančíková, A., Tresová G., Peterková J., Škardová I., Prokopčáková H., Čisláková, L. (1996): Common tick (*Ixodes ricinus*) as a source of infection of humans and dogs with the agent of Lyme borreliosis in Slovakia (in Slovak). *Slov. Vet. Čas.*, **21**, 313–318.
- Prokopčáková H., Peterková J., Pet'ko B. (1992): Examination of ticks for *Borrelia* sp. in Košice surroundings (in Slovak). Preliminary results. *Čs. Epidemiol.*, **41**, 236–239.
- Reisenauer R. (1970): Mathematico-statistical methods and their applications in technology (in Czech). Praha., SNTL.
- Řeháček J., Kmety E., Kociánová E., Výrosteková V., Sekeřová Z., Vavreková M. (1991): Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in ticks in Slovakia. In: Dusbábek F., Bukva V. (eds.): *Modern Acarology*, Academia Prague and SPB Academic Publishing Bv, The Hague, **2**, 61–65.
- Stanek G., Flamm H. (1985): Epidemiologie von *Borrelia*-Infektionen in Österreich. *Österr. Ärztezeitung*, **4**, 19–32.
- Štefančíková A., Škardová I., Pet'ko B., Janovská D., Cypričová V. (1996): Antibodies IgG to *Borrelia burgdorferi* in dogs from Košice region (in Slovak). *Vet. Med.-Czech.*, **41**, 83–86.
- Štefančíková A., Tresová G., Pet'ko B., Škardová I., Sesztáková E. (1998): ELISA comparison of three whole-cell antigens of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in serological study of dogs from area of Košice, Eastern Slovakia. *Ann. Agric. Environ. Med.*, **5**, 25–30.
- Tasai M., Takashima I., Kariwa H., Hashimoto A., Kondo T., Sugiura T., Kamada M. (1993): Serological survey of Lyme borreliosis in horses in Japan by immunofluorescent antibody test and fluorescent enzyme-linked immunosorbent assay. *Bull. Equine Res. Inst.*, **30**, 37–42.
- Treml F., Pospíšil L., Oburková P. (1993): Serological survey of Lyme borreliosis in animal and human. In: *Abstr. Int. Congr. Zoonoses*, 5–7 October 1993, Piešťany, Slovak Republic. **26** p.
- Tresová G., Mateička T., Pet'ko B., Kozárová D. (1997): Preliminary identification of *Borrelia burgdorferi* isolates from ticks *Ixodes ricinus* in eastern Slovakia (in Slovak). *Epidemiol. Mikrobiol. Imunol.*, **46**, 36–38.
- Trevisan G., Crovato F., Marcuccie C., Fumarola D., Scarpa C. (1986): Lyme disease in Italy. *Zbl. Bakt. Hyg. A*, **263**, 459–463.
- Zeman P., Vitková V., Makrvar K. (1990): Joint occurrence of tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in the Central Bohemian region (in Czech). *Čs. Epidem.*, **39**, 95–105.

Received: 99–06–30

Accepted after corrections: 00–06–26

Contact Address:

MVDr. Astéria Štefančíková, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel: +421 95 633 14 11, fax +0421 95 633 14 14

Změna publikačního jazyka ve vědeckých časopisech ČAZV

Předsednictvo České akademie zemědělských věd přijalo na zasedání dne 6. 4. 2000 usnesení, kde mj. doporučuje změnu publikačního jazyka ve vědeckých časopisech vydávaných pod gescí ČAZV. Předsednictvo navrhuje Vydavatelské radě ČAZV zavést angličtinu jako jediný jazyk ve všech vědeckých časopisech od 1. 1. 2001.

Od 1. 7. 2000 redakce časopisu Veterinární medicína přijímá příspěvky psané pouze v angličtině. Příspěvky přijaté do tohoto termínu budou ještě uveřejněny v češtině a slovenštině.



A change of publication language in Scientific Journals of the Czech Academy of Agricultural Sciences

At its session on the 6th April 2000, the Presidium of the Czech Academy of Agricultural Sciences adopted a resolution recommending, among other things, to change the publication language in scientific journals published under the Academy patronage. The Presidium proposes to the Publishing Board of the Academy to introduce English as the only language in all scientific journals from the 1st January 2001.

The papers written exclusively in English are accepted by the editor's office of the journal Veterinary Medicine - Czech from the 1st July 2000. The papers that were accepted before this date will be published in Czech and Slovak.

OCCURRENCE OF ANTHELMINTIC RESISTANCE IN STRONGYLID NEMATODES OF SHEEP AND HORSES IN THE CZECH REPUBLIC*

VÝSKYT ANTHELMINTICKÉ REZISTENCE U STRONGYLIDNÍCH NEMATODŮ OVCÍ A KONÍ V ČESKÉ REPUBLICĚ

K. Chroust

*Department of Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary
and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*

ABSTRACT: On selected farms of sheep, horses and cattle with naturally acquired strongylid infections levamisole, mebendazole, fenbendazole, albendazole, ivermectin and doramectin were tested for the prevalence of anthelmintic resistance. *In vivo* fecal egg counts reduction test (FECRT) was used and in the case of the benzimidazole anthelmintics also *in vitro* egg hatch assay (EHA). Considerable resistance was found in equine small strongylids to mebendazole (8–10 mg/kg) with the FECR test values 61.5% and 70.4% and to fenbendazole (7.5 mg/kg) with 76% and 84.1%. The FECR test results in sheep proved the occurrence of resistant strains of *Ostertagia* spp. and *Trichostrongylus* spp. to levamisole (7.5 mg/kg) 67.8% and to fenbendazole (5 mg/kg) 83.7% and 85.4%. The resistance to benzimidazoles was confirmed by EHA in horses and sheep as well. Resistance to albendazole, ivermectin and doramectin was not found.

sheep; horses; cattle; strongylid nematodes infection; anthelmintic resistance; FECR test; EHA

ABSTRAKT: Na vybraných farmách u ovcí, koní a skotu přirozeně infikovaných gastrointestinálními nematody byl testován výskyt anthelmintické rezistence vůči levamisolu, mebendazolu, fenbendazolu, albendazolu, ivermektinu a doramektinu. K detekci anthelmintické rezistence bylo použito jednak testu *in vivo* (test redukce počtu vylučovaných vajíček – FECRT) a u benzimidazolových sloučenin i testu *in vitro* (test líhnutí larev z vajíček – EHA). Rezistence byla prokázána u malých strongylidů koní vůči mebendazolu (8 až 10 mg/kg ž. h.) u FECR testu v 61,5 a 70,4 % a u fenbendazolu (7,5 mg/kg ž. h.) v hodnotách 76 a 84,1 %. Tímto testem byly prokázány rezistentní kmeny *Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp. u ovcí vůči levamisolu (7,5 mg/kg ž. h.) v 67,8 % a fenbendazolu (5 mg/kg ž. h.) v 83,7 a 85,7 %. Rezistence vůči imidazolovým anthelmintikům byla potvrzena i EHA testem. Rezistence nebyla prokázána u albendazolu, ivermektinu a doramektinu jak u ovcí, tak i u koní a skotu.

ovce; koň; skot; infekce strongylidními nematody; anthelmintická rezistence; FECR test; EHA

ÚVOD

Vznik rezistence vůči používaným antiparazitikům je v současné době velmi závažným celosvětovým problémem ve veterinární i humánní medicíně. Výzkum této problematiky je proto vysoce aktuální jak z vědeckého, tak i z praktického hlediska. Z praxe jsou dobře známy problémy spojené s rychlým nástupem a šířením rezistence k používaným chemoterapeutikům u bakterií, virů, protozoí a zejména členovců (roztoců a hmyzu).

V posledních letech se stala závažným problémem zejména rezistence vůči anthelmintikům.

Obecně lze rezistenci charakterizovat jako schopnost jedinců určitého kmene parazitů ve smyslu biologicky rozdílných kmenů určitého druhu tolerovat dávku určité substance (chemoterapeutika), která je pro většinu individuí normálně vnímavé populace letální. Tato rezistence se projevuje sníženou účinností terapeutické dávky, přičemž k docílení normální účinnosti je potřeba buď zvýšeného dávkování, nebo častějšího opakování

*Supported by the National Agency for Agricultural Research in Prague (Grant No. EP7281).

lčby. To neúměrně zvyšuje náklady na léčbu a v konečné fázi je nutná úplná změna antiparazitika. Rezistence se vyvíjí většinou na základě opakovaného a dlouhodobého vystavení parazitárních původců onemocnění účinku určitého antiparazitika. Rezistence je geneticky fixována a přechází na potomstvo. Zásadní problémy nastávají v době, kdy v populaci parazitů vzroste nebo převládne podíl rezistentních jedinců. Další závažný faktor je, že tyto rezistentní jedinci mohou být ve stejné míře přenašeni v rámci druhu i mezi jednotlivými druhy, například mezi domácími a volně žijícími přežvýkavci apod. (Le Jambre, 1978; Pfueller aj., 1986; Taylor a Hunt, 1989; Waller, 1993; Prichard, 1990, 1994; Borgsteede, 1993 a další).

V současné době je z hospodářských zvířat nejzávažnější problém rezistence vůči anthelmintikům především u ovcí a koz, dále i u koní. Méně je dosud rezistence zjišťována u prasat a skotu. Zpráva o výskytu rezistentních kmenů jsou již řadu let publikovány ze zemí s rozvinutým chovem ovcí (Austrálie, Nový Zéland, Jihoafrická republika), dále ze zemí Latinské Ameriky, Indonésie a z evropských zemí jsou to zejména Anglie, Skotsko, Wales, Irsko, Dánsko, Francie, Německo, Belgie, Nizozemsko a Řecko (Coles a Roush, 1992; Coles aj., 1994; Prichard, 1994; Coles, 1999; Swamkar aj., 1999; Sangster aj., 1999). Ze zemí střední a východní Evropy byly první zprávy publikovány u koz, ovcí a koní ze Slovenska (Čorba aj., 1993; Varády aj., 1993; Praslička aj., 1994a, b, 1995; Varády a Čorba, 1997, 1999; Čorba aj., 1998). První případy detekce rezistentních kmenů u strongylidních nematodů ovcí a koní proti některým imidazolovým anthelmintikům v České republice publikoval Chroust (1998). Ve všech zemích, kde byla rezistence zjištěna se jedná především o nematody z řádu Strongylida, u ovcí a koz z čeledi Trichostrongylidae (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia* spp., *Cooperia* spp., *Trichostrongylus* spp.), u koní z podčeledi Cyathostominae (malí strongylidé), případně Strongylinae (velcí strongylidé) (Bauer, 1993; Woods aj., 1998; Lendal aj., 1998; Craven aj., 1998 a další). Vůbec první rezistentní kmen byl zjištěn u *H. contortus* u ovcí proti thiabendazolu. U prasat byla dosud zjištěna rezistence proti druhu *Oesophagostomum dentatum*, avšak v menší míře (Bjorn, 1993; Varády aj., 1996) a podobně u skotu proti morantelu u *Ostertagia* spp. a *Cooperia* spp. (Geerts, 1993). Anthelmintická rezistence byla zjištěna rovněž u motolic *Fasciola hepatica* (Boray aj., 1990). V řadě zemí je v současné době prokazována již polyrezistence vůči několika anthelmintikům zároveň, například imidazolům, morantelu a ivermectinu (Coles, 1996; Waruiru aj., 1998; Coles a Stafford, 1999; Chandrawathani aj., 1999; Macchi aj., 1999; Sangster a Gill, 1999; Young aj., 1999 a další).

Cílem této práce, s použitím standardních metodik, bylo sledování výskytu rezistentních kmenů nematodů u ovcí, skotu a koní k používaným anthelmintikům v podmínkách České republiky. Zavedení těchto metodik do

veterinární diagnostiky podpoří významně i program sjednocování metodik v rámci EU.

MATERIÁL A METODY

Průkaz rezistentních kmenů nematodů se zakládal na použití standardních metodik doporučených Světovou asociací pro pokrok ve veterinární parazitologii (W.A.A.V.P.), které jsou používány ve většině zemí v nichž je tento problém aktuální, včetně EU.

A. Použité testy

1. Test *in vivo*: Test redukce počtu vylučovaných vajíček ve feces (FECRT – fecal egg count reduction test; Coles aj., 1992).
2. Test *in vitro*: Test líhnutí larev z vajíček (EHA – egg hatch assay; Coles aj., 1992).

B. Použitý materiál

Vlastní vyšetřování bylo prováděno v letech 1997 až 1999 u ovcí, koní a skotu v různých chovech a lokalitách v ČR. Vzorky trusu pro vlastní vyšetřování byly odbírány individuálně jak u zvířat v pokusných (léčených), tak i kontrolních (neléčených) skupinách. Pokusné a kontrolní skupiny byly tvořeny minimálně osmi, maximálně 15 zvířaty u nichž vylučování vajíček vesměs přesahovalo hodnoty EPG 150 a zvířata nebyla v posledních 12 týdnech léčena. Vlastní laboratorní vyšetření bylo prováděno podle druhu použitého testu.

Při provádění FECR testu byl u jednotlivých vzorků stanoven počet vylučovaných vajíček trusem (EPG) a sice před aplikací anthelmintik (0. den) a po aplikaci 10. až 14. den. Dále byly vzorky hromadně zpracovány do koprokultur a prováděna jejich kultivace. Vlastní determinace infekčních larev (LA III) byla prováděna po sedmi až osmi dnech kultivace. Při přípravě koprokultur bylo postupováno metodou podle Chrousta a Hulínské (1970) a metodou, kterou uvádí Coles aj. (1992) (MAFF, 1986). Determinace infekčních larev GIN byla prováděna po přidání Lugolova roztoku u poměrného počtu získaných larev podle klíčů, které uvádějí Hulínská (1969), MAFF (1986), Eckert aj. (1992) a jiní autoři.

Vlastní vyhodnocení FECR testu bylo prováděno podle vzorce:

$$\text{procento redukce} = 100 \cdot (1 - Xt/Xc),$$

kde X je aritmetický průměr, t = EPG u léčené skupiny 10. až 14. den a c = EPG u kontrolní skupiny (neléčené) rovněž 10. až 14. den. Rezistence byla potvrzena, jestliže redukce vylučovaných vajíček po léčbě byla nižší než 95 % u ovcí a než 90 % u koní a skotu.

Při provádění EHA testu byl trus odebírán rovněž individuálně a do doby vyšetření uchován v přenosném chladičím boxu. Při odběru v chovech s kratší vzdáleností do laboratoře byly vzorky zpracovány během tří až čtyř hodin, zatímco při odběrech ve vzdálených chovech bylo nutné vzorky anaerobně konzervovat. Za tím účelem byly použity vzorkovnice o obsahu 100 ml, v nichž se asi 10 g čerstvě odebraného trusu důkladně zhomogenizovalo s 85 ml vody, vzorkovnice se doplnily po okraj vodou a neprodyšně uzavřely. Anaerobní prostředí tak zabránilo rýhování vajíček, takže vzorky mohly být laboratorně zpracovány v následujících dnech (nejpozději do sedmi dnů) po odběru. Získaná vajíčka v počtu 100 až 300 byla kultivována na Petriho miskách (průměr 4 cm) v suspenzi o obsahu 2 ml vody s doplněním 10 µg roztoku thiabendazolu. Pracovali jsme s pěti koncentracemi, a sice 0,05, 0,1, 0,5, 1,0 a 2,0 µg a kontrolou (bez přidání thiabendazolu). Po 48 h inkubace při teplotě 26 až 27 °C se test vyhodnocoval. Posuzovalo se asi 100 vajíček a určilo se procentuální zastoupení vajíček mrtvých, embryonovaných a larev uvolněných z vajíček. Vlastní vyhodnocení EHA testu bylo prováděno použitím modelu logitové analýzy (Waller aj., 1985). Vzhledem ke skutečnosti, že byly vyhodnocovány terénní kmeny nematodů, nebyla prováděna kalkulace faktoru rezistence. Na základě výsledku byl pomocí vyhodnocovacího programu sestrojen graf závislosti účinnosti anthelmintika na použité koncentraci thiabendazolu a stanovena koncentrace, která zamezí líhnutí 50 % vajíček (LD₅₀). Byla-li překročena hodnota 0,1 µg, je u testovaného anthelmintika potvrzena rezistence. V případě použití thiabendazolu v testu se jedná o rezistenci vůči celé skupině benzimidazolových anthelmintik.

C. Testovaná anthelmintika

1. Fenbendazol

a) u ovcí v dávce 5 mg/kg ž. h. v preparátu PANACUR 2,5% susp. (Hoechst) – *p. o.*

b) u koní v dávce 7,5 mg/kg ž. h. v preparátu FENBION 2,5% pulv. (Mevak), resp. FENRYMIN susp. (Galea) – *p. o.*

2. Albendazol

a) u ovcí v dávce 5 mg/kg ž. h. v preparátech VERMITAN susp. 2,5% (Sanofi) a ALDIFAL susp. 2,5% (Mevak) – *p. o.*

b) u skotu v dávce 7,5 mg/kg ž. h. v preparátech ALDIFAL 10% susp. (Mevak) a VERMITAN 20% gran. (Sanofi) – *p. o.*

3. Levamisol

u ovcí v dávce 7,5 mg/kg ž. h. v preparátu BIOVERM sol. (Bioveta, Ivanovice na Haně) – *p. o.*

4. Mebendazol

u koní v dávce 10 mg/kg ž. h. v preparátu MEBENVET gran. 10% (G. Richter) a v dávce 8 mg/kg v preparátu TELMIN gran. (Janssen) – *p. o.*

5. Ivermectin

a) u ovcí a skotu v dávce 0,2 mg/kg ž. h. v preparátu IVOMEC inj. (MSD Agvet, Merial) – *s. c.*

b) u koní v téže dávce v preparátu EQVALAN pasta (MSD Agvet, Merial) – *p. o.*

6. Doramectin

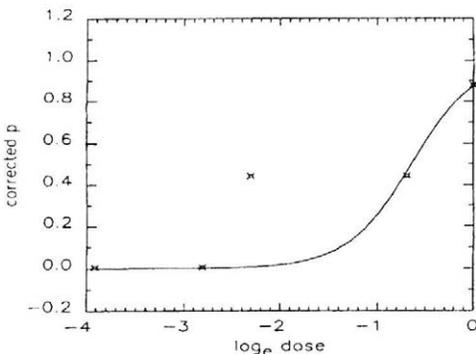
u ovcí v dávce 0,2 mg/kg ž. h. v preparátu DECTOMAX (Pfizer) – *s. c.*

VÝSLEDKY

Výsledky FECR testu prokázaly rezistentní kmeny *Ostertagia* spp. a *Trichostrongylus* spp. u ovcí vůči levamisolu v doporučené dávce 7,5 mg/kg ž. h. v 67,8 % a fenbendazolu v dávce 5 mg/kg ž. h. v 83,7 a 85,7%. Rezistence nebyla prokázána tímto testem u albendazolu, ivermectinu a doramectinu jak u ovcí, tak i u koní a skotu.

Výsledky FECR testů provedených u jednotlivých druhů zvířat jsou uvedeny v tab. I, II a III.

Výsledky EHA testu vůči imidazolovým anthelmintikům u ovcí a koní jsou dokumentovány obr. 1 a 2 a hodnotami LD₅₀.



1. Výsledek EHA testu po aplikaci fenbendazolu (5 mg/kg ž. h.) u ovcí. Výsledek testu LD₅₀ = 0,4558 přesahuje hodnotu 0,1 mg thiabendazolu a prokazuje rezistenci – The results of the EHA test after the application of fenbendazole (5 mg/kg b. w.) in sheep. The resulting value of the test LD₅₀ = 0.4558 exceeds an empirical value of 0.1 mg of thiabendazole and proves resistance

I. Výsledky FECR testu u ovcí – Results of FECR test in sheep

Chov č. ¹	Použitá anthelmintika ²	Dávka (mg/kg ž. h.) ³	Počet zvířat ⁴	EPG před aplikací (0. den) ⁵	EPG po aplikaci (10 až 14. den) ⁶	Redukce EPG ⁷ (%)	Horní koeficient spolehlivosti ⁸	Dolní koeficient spolehlivosti ⁹	Rezistence ¹⁰
1	fenbendazol	5,0 p. o.	10	230	10,5	95,4	98	94	–
	neléčená ¹¹	–	10	261	246	–	–	–	–
2	fenbendazol	5,0 p. o.	12	104	18	83,7	92	81	+
	neléčená	–	10	149	131	–	–	–	–
3	fenbendazol	5,0 p. o.	10	122	17,8	85,4	95	78	+
	neléčená	–	10	107	124	–	–	–	–
4	albendazol	5,0 p. o.	15	129	0,8	99,3	99	95	–
	albendazol	5,0 p. o.	10	260	16,9	93,5	94	88	±
	neléčená	–	10	143	169	–	–	–	–
5	levamisol	7,5 p. o.	15	270	87	67,8	70	31	+
	neléčená	–	15	209	192	–	–	–	–
6	levamisol	7,5 p. o.	10	169	39	77,0	78	49	+
	neléčená	–	8	181	162	–	–	–	–
7	ivermectin	0,2 s. c.	10	87	0,5	99,4	99	95	–
	doramectin	0,2 s. c.	8	69	0	100,0	100	100	–
	neléčená	–	10	74	69	–	–	–	–

¹experiment No., ²anthelmintics, ³dose (mg/kg b.w.), ⁴number of animals, ⁵EPG before treatment (Day 0), ⁶EPG after treatment (Days 10 to 14), ⁷EPG reduction, ⁸upper confidence limit (UCL), ⁹lower confidence limit (LCL), ¹⁰resistance, ¹¹untreated control

II. Výsledky FECR testu u skotu – Results of FECR test in cattle

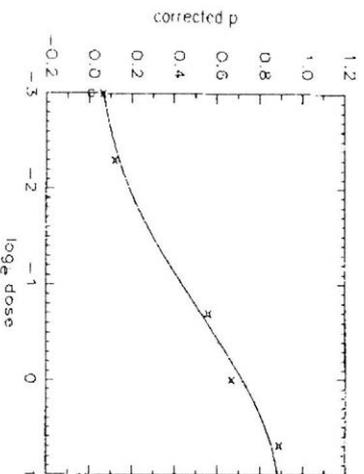
Chov č. ¹	Použitá anthelmintika ²	Dávka (mg/kg ž. h.) ³	Počet zvířat ⁴	EPG před aplikací (0. den) ⁵	EPG po aplikaci (10. až 14. den) ⁶	Redukce EPG ⁷ (%)	Horní koeficient spolehlivosti ⁸	Dolní koeficient spolehlivosti ⁹	Rezistence ¹⁰
1	albendazol	7,5 p. o.	12	62	0,45	99,3	98	95	–
	ivermectin	0,2 s. c.	7	42	0	100,0	100	100	–
	neléčená ¹¹	–	10	44	52	–	–	–	–
2	doramectin	0,2 s. c.	8	104	1,4	98,7	99	93	–
	neléčená	–	8	90	101	–	–	–	–

For 1–11 see Tab I

III. Výsledky FECR testu u koní – Results of the FECR test in horses

Chov č. ¹	Použitá anthelmintika ²	Dávka (mg/kg ž. h.) ³	Počet zvířat ⁴	EPG před aplikaci (0. den) ⁵	EPG po aplikaci (10. až 14. den) ⁶	Redukce EPG ⁷ (%)	Horní koeficient spolehlivosti ⁸	Dolní koeficient spolehlivosti ⁹	Rezistence ¹⁰
1	mebendazol neléčená ¹¹	8–10 p. o.	10	420	162	61,5	71	42	+
			10	384	361	–	–	–	–
2	mebendazol neléčená	8 p. o.	8	165	49	70,4	88	61	+
			8	182	169	–	–	–	–
3	fenbendazol neléčená	7,5 p. o.	8	348	83,5	76,0	88	70	+
			8	302	402	–	–	–	–
4	fenbendazol ivermectin neléčená	7,5 p. o.	15	270	43	84,1	94	82	+
			7	330	4,5	98,6	99	97	–
			10	360	395	–	–	–	–

For 1–11 see Tab. I



2. Výsledek EHA testu po aplikaci mebendazolu (10 mg/kg) u koní. Výsledek testu LD₅₀ = 0.5262 přesahuje hodnotu 0.1 mg thia-bendazolu a prokazuje rezistenci – The results of the EHA test after the application of mebendazole (10 mg/kg) in horses. The resulting value of the test LD₅₀ = 0.5262 exceeds an empirical value of 0.1 mg of thia-bendazole and proves resistance

DISKUSE

Na základě dosavadních poznatků nejzávažnější problémy se vznikem rezistenčních kmenů jsou v oblastech, kde klimatické a epizootologické podmínky vyžadují častou aplikaci anthelmintik (JAR, Austrálie, Nový Zéland, Jižní Amerika) a dále v zemích s intenzivním odchovem jehňat masných plemen ovcí (Anglie, Skotsko, Nizozemsko, Dánsko). Je známo, že například rezistentní kmeny včel thia-bendazolu byly prokázány již po čtyřikrát opakované aplikaci tohoto anthelmintika v periodách krašších než čtyři týdny; rezistentní kmen *H. contortus* větší ivermektinu se vyvinul v podmínkách JAR prakticky po jednorozem používání u ovcí (Van Wyk a Malan, 1988).

Z území bývalého Československa byla rezistence včelí anthelmintikům neznámá. Stejně jako v ostatních zemích se po zavedení a širší distribuci stala anthelmintika imidazolové řady pro svoji širokospektrální účinnost po řadu let téměř jedinými používanými jak u ovcí, tak u skotu a koní. Navíc jejich úzký sortiment nezajišťoval potřebnou obměnu, zejména u koní, kde například mebendazol (MEBENVET gran. 10%) se používal téměř jako jediné anthelmintikum déle než 10 let. Toréž lze říci o tetraimisu a levamisolu u ovcí; připadne u skotu. V lékových formách NILVERM sol. k perorální aplikaci a NILVERM inj. k subkutánní aplikaci se toto anthelmintikum používalo prakticky od začátku 70. let. Na základě chemické struktury patří levamisol do skupiny imidazol-thiazolových sloučenin, tedy s podobným mechanismem účinnosti jako později vyvinuté imidazolové sloučeniny. Výskyt rezistence se u těchto anthelmintik předpokládá a přímé důkazy podal Praslička aj. (1995) na Slovensku a Chroust (1998) v České republice. Vážným nebezpečím je rovněž možnost rozšíření

rezistentních kmenů spolu s importovanými zvířaty jak prokázali u koz z Nového Zélandu Varády aj. (1993, 1994) a Praslička aj. (1994b). Titíž autoři zjistili v podmínkách Slovenska rezistentní kmeny trichostrongylidů u ovcí v 8 % stád (Praslička aj., 1994a, 1995)

Získané výsledky studia rezistentních kmenů se zakládají na vyšetřování stád z různých lokalit České republiky a potvrzují předpoklad, že rezistence vůči současně používaným anthelmintikům, zejména imidazolové řady, je v našich podmínkách rovněž rozšířena, a to daleko více než se ve veterinární a chovatelské veřejnosti předpokládá. Výskyt rezistence má především ekonomický dopad. K dosažení požadované účinnosti anthelmintika by bylo nutné trvale zvyšovat jeho terapeutické dávky, případně častěji opakovat léčbu, což zvyšuje neúměrné náklady na tlumení helmintóz, zejména u pastevních kusů. Jediným řešením je úplná změna anthelmintika odlišné chemické struktury. Taková anthelmintika jsou v současné době na našem trhu přístupná (na bázi avermektinů, pyrantelu apod.). Vzhledem k nálezům v zahraničí, kde i u těchto sloučenin byla již zjištěna rezistence a případné možnosti zavlečení rezistentních kmenů s importovanými zvířaty, je studium této problematiky u nás vysoce aktuální a nezbytné. Zavedení metodik do diagnostiky by umožnilo soustavné vyhledávání rezistentních kmenů helmintů, a tím i uplatnění v systému prevence a tlumení ekonomicky závažných helmintóz hospodářských zvířat v podmínkách ČR.

Poděkování

Autor děkuje MVDr. Mariánu Várady, CSc. z Parazitologického ústavu SAV v Košicích za poskytnutí programu pro vyhodnocování *in vitro* testu stanovení rezistence vůči anthelmintikům a MVDr. Jiřímu Volfovi z Ústavu parazitologie FVL VFU Brno za pomoc při vyhodnocení testu.

LITERATURA

- Bauer C. (1993): Anthelmintic resistance in nematodes of horses. In: EC working document, Brussels, 17–24.
- Bjorn H. (1993): Anthelmintic resistance in nematodes of pigs. In: EC working document, Brussels, 31–39.
- Borgsteede F. H. M. (1993): Anthelmintic resistance in nematodes of sheep and goats. In: EC working document, Brussels, 1–16.
- Boray J. C., Martin P. J., Roush R. T. (1990): Resistance of parasites to antiparasitic drugs. In: VII. Int. Congr. Parasitol., Paris, MSD Agvet, Rahway, N.J., 219.
- Chandrawathani P., Adnan M., Walleer P. J. (1999): Anthelmintic resistance in sheep and goats farm on Peninsular Malaysia. *Vet. Parasitol.*, 82, 305–310.
- Chroust K. (1998): The first occurrence of anthelmintic resistance in strongylid nematodes of sheep and horses in Czech Republic. *Parasitol. Int.*, 47, 242.
- Chroust K., Hulínská I. (1970): Metoda koprokultury pro diagnostiku invazních larev (La III) gastrointestinálních nematodů přežvýkavců a koní. *Metodiky ÚSVÚ Praha*, 313–314.
- Coles G. C. (1996): Multiple anthelmintic resistance in nematodes in England. *EMOP VII Abstracts. Parasitologia*, 38, 230.
- Coles G. C. (1999): Anthelmintic resistance and the control of worms. *J. Med. Microbiol.*, 48, 323–325.
- Coles G. C., Roush R. T. (1992): Slowing the spread of anthelmintic resistance nematodes of sheep and goats in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 130, 505–510.
- Coles G. C., Stafford K. A. (1999): Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the UK. *Cattl. Pract.*, 7, 173–175.
- Coles G. C., Bauer C., Borgsteede F. H. M., Geerts S., Klet T. R., Taylor M. A., Waller P. J. (1992): W.A.A.V.P. (World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.*, 44, 35–44.
- Coles G. C., Borgsteede F. H. M., Geerts S. (1994): Anthelmintic resistance nematodes in the EU. *Parasitol. Today*, 10, 288–299.
- Craven J., Bjorn H., Henriksen S. A., Nansen P., Larsen M., Lendal S. (1998): Survey of anthelmintic resistance on Danish horse farms, using 5 different methods of calculation faecal egg count reduction. *Equine Vet. J.*, 30, 289–293.
- Čorba J., Varády M., Praslička J., Veselý L. (1993): Anthelmintické ovlivnění polyrezistentních nematodův gastrointestinálního traktu u importovaných kůz. *Vet. Med. – Czech*, 38, 369–374.
- Čorba J., Varády M., Praslička J., Tomašovičová O., Konigová A. (1998): Anthelmintic resistance of domestic animals in Slovakia. *Slov. Veter. Čas.*, 23, 61–66.
- Eckert J., Kutzer E., Rommel M., Bürger H. J., Körting W. (1992): *Veterinärmedizinische Parasitologie*. Berlin u. Hamburg, Verlag Paul Parey, 512 pp.
- Geerts S. (1993): Anthelmintic resistance in nematodes of cattle. In: EC working document, Brussels, 25–30.
- Hulínská I. (1969): Die Determinationsmerkmale der Invasionslarven bei Schafhelminthen. *Acta Sci. Nat. Acad. Sci. Bohem. Brno*, III, 1–25.
- Le Jambre L. F. (1978): Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in sheep. *Sydney Academic Press*, 109–120.
- Lendal S., Larsen M. M., Bjorn H., Craven J., Chriel M., Olsen S. N. (1998): A questionnaire survey on nematode control practices on horse farms in Denmark and the existence of risk factors for the development of anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.*, 78, 49–63.
- Macchi C., Morris R.S., Pfeifer D. U., Beckett S. (1999): Economic evaluation of three anthelmintic strategies for lamb flock affected by benzimidazole-resistant nematodes. *Aust. Vet. J.*, 77, 674–677.
- MAFF (Manual of Veterinary Parasitological Laboratory Techniques, Ministry of Agriculture Fisheries and Food) (1986), HMSO, London. 1–132.

- Pfueller H., Buchwalder E., Hiepe T. (1986): Anthelmintika-Resistenz bei Nematoden-Infektion. *Monatsh. Vet. Med.*, *41*, 706–711.
- Prichard R. K. (1990): Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. *Int. Parasitol.*, *20*, 515–523.
- Prichard R. K. (1994): Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.*, *54*, 259–268.
- Praslička J., Varády M., Čorba J., Veselý L. (1994a): A survey of anthelmintic resistance in sheep in Slovakia. *Vet. Parasitol.*, *52*, 169–171.
- Praslička J., Varády M., Čorba J. (1994b): Persistent infection with multiple anthelmintic-resistant gastrointestinal nematodes in Cashmere goats. *Vet. Res. Commun.*, *18*, 443–446.
- Praslička J., Pilko P., Varády M., Čorba J. (1995): Nález gastrointestinálních nematodů rezistentních k levamizolu a tetramizolu u ovčie. *Vet. Med. – Czech*, *40*, 45–48.
- Sangster N. C., Gill J. (1999): Pharmacology of anthelmintic resistance. *Parasitol. Today*, *15*, 141–146.
- Sangster N. C., Miller J. E., Klei T. R. (1999): Anthelmintic resistance, past, present and future. *Int. J. Parasitol.*, *29*, 115–124.
- Swarnkar C. P., Khan F. A., Singh D., Bhagwan P. S. K. (1999): Further studies on anthelmintic resistance in sheep at an organised farm in arid region of Rajasthan. *Vet. Parasitol.*, *82*, 81–84.
- Taylor M. A., Hunt K. R. (1989): Anthelmintic drug resistance in the UK. *Vet. Rec.*, *125*, 143–147.
- Van Wyk J. A., Malan F. S. (1988): Resistance of a field strains of *Haemonchus contortus* to ivermectin, closantel, rafoxanide and the benzimidazoles in South Africa. *Vet. Rec.*, *123*, 226–228.
- Varády M., Čorba J. (1997): Resistance of equine small strongyles to benzimidazoles in Slovak Republic. *Helminthologia*, *34*, 81–85.
- Varády M., Čorba J. (1999): Comparison of six *in vitro* tests in determining benzimidazole and levamisole resistance in *Haemonchus contortus* and *Ostertagia circumcincta* of sheep. *Vet. Parasitol.*, *80*, 239–249.
- Varády M., Praslička J., Čorba J., Veselý L. (1993): Multiple anthelmintic resistance of nematodes in imported goats. *Vet. Rec.*, *132*, 387–388.
- Varády M., Praslička J., Čorba J. (1994): Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia* spp. in Cashmere and Angora goats. *Int. J. Parasitol.*, *24*, 335–340.
- Varády M., Bjorn H., Nansen P. (1996): *In vitro* characterization of anthelmintic susceptibility of field isolates of the pig nodular worm *Oesophagostomum* spp., susceptible or resistant to various anthelmintics. *Int. J. Parasitol.*, *26*, 733–740.
- Waller P. J. (1993): Towards sustainable nematode parasite control of livestock. *Vet. Parasitol.*, *48*, 295–309.
- Waller P. J., Dobson R. J., Donald A. D., Griffith D. A., Smith E. F. (1985): Selection studies on anthelmintic resistant and susceptible population of *Trichostrongylus colubriformis* of sheep. *Int. J. Parasitol.*, *15*, 669–676.
- Waruiru R. M., Ngoto J. W., Mukiri J. G. (1998): Multiple and multigeneric anthelmintic resistance on a sheep farm in Kenya. *Trop. Anim. Health Prod.*, *30*, 159–166.
- Woods T. F., Jr., Lane T. J., Zeng Q. Y., Courtney C. H. (1998): Anthelmintic resistance on horse farms in north central Florida. *Equine Pract.*, *20*, 14–17.
- Young K. E., Garza V., Snowden K., Dobson R. J., Powe D., Craig T. M., Little S. E., Moore J. N., Dapietro J. A. (1999): Parasite diversity and anthelmintic resistance in two herds of horses. *Vet. Parasitol.*, *85*, 205–214.

Received: 99–11–02

Accepted after corrections: 00–06–26

Kontakní adresa:

Prof. MVDr. Karel Chroust, DrSc., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika
Tel. +420 5 41 56 22 63, fax +420 5 74 88 41, e-mail: Chroust K@vfu.cz

**Subscription list of scientific journals published in 2000
in the Institute of Agricultural and Food Information
Prague, Czech Republic**

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with long summaries in English or in English language with summaries in Czech or Slovak.

Journal	Periodicity	Yearly subscription fee in USD (including postage)	
		Europe	overseas
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	195,-	214,-
Czech Journal of Animal Science (Živočišná výroba)	12	195,-	214,-
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	195,-	214,-
Journal of Forest Science	12	195,-	214,-
Veterinární medicína (Veterinary Medicine – Czech)	12	159,-	167,-
Czech Journal of Food Sciences (Potravinařské vědy)	6	92,-	97,-
Plant Protection Science (Ochrana rostlin)	4	62,-	64,-
Czech Journal of Genetics and Plant Breeding (Genetika a šlechtění)	4	62,-	64,-
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	62,-	64,-
Research in Agricultural Engineering	4	62,-	64,-

Please send subscription your order to the address:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
Vydavatelské oddělení
Slezská 7
120 56 Praha 2
Czech Republic

Tel.: +420 2 24 25 79 39, Fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: redakce@uzpi.cz

QUANTITATIVE EVALUATION OF ACID-BASE BALANCE ON MILK PRODUCING GOATS: EFFECT OF SEX AND MILK YIELD

HODNOCENÍ KVANTITATIVNÍ ACIDOBAZICKÉ ROVNOVÁHY U KOZ: VLIV POHLAVÍ A MLÉČNÉ PRODUKCE

C. Castillo¹, J. Hernandez¹, J. L. Benedito¹, M. Lopez-Alonso¹, M. Miranda¹,
C. Gutierrez-Panizo², J. Sotillo²

¹*Department of Animal Pathology, Veterinary Faculty of Lugo, University of Santiago de Compostela, Spain*

²*Department of Animal Pathology, Veterinary Faculty of Murcia, University of Murcia, Spain*

ABSTRACT: The characteristics of the acid-base balance in the Murciano-Granadina goat are evaluated in this report. This is a rustic breed, located in the South of Spain, which is raised for milk. This fact could determine special metabolic and internal characteristics that have been evaluated. In order to obtain a better understanding of the factors that control the acid-base balance and its relationship to sex and milk yield, Fencel's equations have been developed. Our results showed that the sex influences buffer bases (HCO_3^- and BE) and fluid balance (taking into account Na^+ , PCV, osmolality and BE_{ex}). Considering the influence of milk yield, the statistical differences appeared in four parameters: pCO_2 , HCO_3^- , AG and PCV. The most significant findings of this report are that this breed is well adapted to the high metabolic requirements imposed by milk production and that secondly, the females of this breed present a peculiar fluid balance, different from the males.

Fencel's equations; Murciano-Granadina breed; Fluid balance

ABSTRAKT: V této práci jsou zhodnoceny parametry acidobazické rovnováhy u koz z jihu Španělska (murcijsko-granadské plemeno), chovaných pro mléko. Fencelovy rovnice byly sestaveny ve snaze lépe pochopit jednotlivé činitele, které kontrolují acidobazickou rovnováhu a její závislost na pohlaví a mléčné produkci. Naše výsledky naznačily vliv pohlaví na obsah pufrových bází (HCO_3^- a BE) a na rovnováhu tělních tekutin (Na^+ , PCV, osmolalitu a BE_{ex}). Podle mléčné produkce se statistické rozdíly projevily u čtyř parametrů: pCO_2 , HCO_3^- , AG a PCV. Plemeno se dobře adaptovalo na vysoké požadavky, které na metabolismus klade produkce mléka. Samice tohoto plemene mají rovnováhu tělních tekutin odlišnou od samců.

koza; acidobazická rovnováha; Fencelovy rovnice; murcijsko-granadské plemeno; rovnováha tělních tekutin

INTRODUCTION

The Murciano-Granadina goat is a rustic breed located in the South of Spain, which is raised for milk (an average of 500 litres/276 days) and with an important economic value (Sotillo et al., 1996). This breed is among the most important dairy caprine breeds of Spain (Falagan, 1996). This condition gives them certain peculiar metabolic and physiological characteristics, in fact Larson (1978) and Qi et al. (1992) pointed up that high-producing dairy goats consume twice as much feed as do dairy cows and devote a greater proportion of their energy consumption to milk production. Consequently, there will exist peculiar effects on internal balance.

When we talk about internal balance we are thinking of H^+ concentration in body fluids and especially in blood: the acid-base homeostasis. Since a few years ago the acid-base balance, based on the traditional Henderson-Hasselbalch equation, has undergone a new approach derived from Stewart's studies (Stewart, 1981). This new method provides a mathematical explanation for the relevant variables that control pH in body fluids and their interactions. These studies show that the value of H^+ is determined by, and only by, the difference between strong ions, mainly Na^+ and Cl^- , proteins and pCO_2 which are, in turn, determined by the balance between tissue metabolism and respiration.

Fencel and Leith (1993) developed the clinical application of Stewart's method, establishing equations based on physical chemistry and on data from human patients. Both Stewart's and Fencel's methods provide a good estimate of the H^+ and HCO_3^- concentrations measured in plasma (Kowalchuck and Scheuermann, 1994). Other authors also propose a combination of old and modern theories for evaluating simple and combined disorders of the acid-base balance, disorders which can potentiate each other but also mask their effects (Kubat, 1996).

Following up with these studies, some investigators have applied Fencel's equations in veterinary medicine. With this aim, we want to determine what happens in the internal balance of the Murciano-Granadina goat. In order to obtain a better understanding of the factors controlling acid-base balance and its relationship between sex and milk yield level, Fencel's equations have been developed. We want to understand the metabolic particularities of these lactating goats and to establish their contributions to acid-base homeostasis. We must point out that there are no studies that consider this new approach in this species: for this reason it is difficult to compare our results.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Testing was performed on 50 healthy Murciano-Granadina goats, ranging from 4 to 5 years of age, divided into different groups, depending on sex and milk yield:

– male goats ($n = 10$)

– female goats ($n = 40$). This group was also divided into groups: barren goats ($n = 10$) and lactating females ($n = 30$), divided into:

a) high milk producing goats ($n = 10$) with average milk production above 3.5 litres/day,

b) medium milk producers ($n = 9$) with average milk production between 3.5 and 1.5 litres/day,

c) low milk producers ($n = 11$) with average milk production below 1.5 litres/day.

The diet of these grazing animals was based on fresh grass from natural pasture plus low-quality hay and mineral supplement (40 g/day/animal).

Sample collection and analysis

Samples were taken from selected goats between 8.30 and 9.30 prior to morning feeding. They had previously been separated from the flock the night before to minimize the effect of stress. Blood samples were collected by jugular venipuncture, taking into account all the precautions necessary to avoid interferences in the measurements, especially in acid-base parameters (Bailey and Pablo, 1998).

Whole blood was used to study the parameters related to acid-base balance (venous pH, pCO_2 , HCO_3^- , BE, Na^+ , K^+ and Cl⁻), all of them measured with a blood gas and electrolyte analyzer (ABL System 600, Radiometer Copenhagen); PCV was determined by microhaematocrit technique. Calculated parameters were established using Fencel's equations as follows: change in BE due to free water (BE_{fw}); chlorine ion (BE_{Cl^-}); unmeasured anions (BE_{ua}) and albumin abnormalities (BE_{alb}). Like in prior reports, we preferred to use the albumin measurement rather than total protein determination because it is the only significant element, among total proteins, that contributes to the variable negative charges in the acid-base equilibria in plasma (Figge et al., 1991). The SID (strong ion difference) and AG (anion gap) values were calculated by the formulae $(Na^+ - Cl^-)$ and $(Na^+ + K^+) - (Cl^- + HCO_3^-)$, respectively. The z value, necessary for the BE_{fw} determination, was calculated using the formula $z = SID/Na^+_{normal \text{ for the species}}$ (Whitehair et al., 1995), obtaining a mean z value of 0.280 ± 0.002 . We determined the serum osmolality using the equation $2 \times Na^+ + glucose/14 + BUN/2.8$ (Contreras and Blanco, 1997). Serum glucose and BUN determinations were carried out using standardized techniques (Spinreact Reagents, Spain).

For calculated parameters, we also employed, reference values that were obtained in our laboratory from healthy goats of the same breed and environmental conditions, using the same analytical techniques. These mean values were 147.13 ± 0.24 mmol/l for Na^+ , 105.79 ± 0.35 mmol/l for Cl⁻ and 29.2 ± 0.35 g/l for albumin.

Statistical procedure

A statistical test was performed using an analysis of variance included in the statistical program SPSS Version 8.0. We made two types of comparison: firstly, males versus total females, with the purpose of analyzing the influence of sex factor on the studied parameters, and secondly, we compared the different groups of females (barren, high, medium and low producers) to determine the influence of milk yield. All the comparisons were made using the Tukey HSD test considering $p < 0.05$ (Williams, 1994).

RESULTS

Tab. I presents the mean values ($\mu \pm$ std. error) of each group considered; Tab. II shows the significance levels for each comparison. It is evident from this table it can be appreciated that there is no significant effect of either sex or milk yield on venous blood pH, Cl⁻, SID, BE_{ua} , BE_{alb} , BE_{Cl^-} , albumin and glucose values.

In a comparison between males and total females, statistical differences appear in many aspects: firstly, in relation to buffer bases (HCO_3^- and BE), when the females

I. Mean values ($\mu \pm$ std. error) of each parameter depending on milk yield factor

Parameter	Bucks	Total Females	Barren Goats	High producers	Medium producers	Low producers
Venous pH	7.393 \pm 0.009	7.375 \pm 0.004	7.353 \pm 0.003	7.378 \pm 0.007	7.378 \pm 0.009	7.382 \pm 0.006
pCO ₂ (mm Hg)	45.70 \pm 1.27	44.38 \pm 0.82	48.76 \pm 1.00	41.57 \pm 1.21	42.86 \pm 1.72	46.01 \pm 0.77
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	27.08 \pm 0.91	25.10 \pm 0.41	26.14 \pm 0.42	23.72 \pm 0.49	24.45 \pm 0.89	26.57 \pm 0.70
BE (mmol/l)	2.73 \pm 0.86	0.77 \pm 0.34	0.90 \pm 0.45	-0.014 \pm 0.28	0.30 \pm 0.79	2.07 \pm 0.65
Na ⁺ (mmol/l)	146.33 \pm 0.33	147.46 \pm 0.25	148.0 \pm 0.54	147.71 \pm 0.47	147.55 \pm 0.55	146.71 \pm 0.35
K ⁺ (mmol/l)	4.31 \pm 0.10	3.91 \pm 0.07	4.10 \pm 0.17	3.91 \pm 0.14	3.81 \pm 0.10	3.90 \pm 0.18
Cl ⁻ (mmol/l)	105.83 \pm 0.30	106.17 \pm 0.44	108.0 \pm 1.26	106.42 \pm 0.68	105.55 \pm 0.78	105.42 \pm 0.84
AG (mmol/l)	17.76 \pm 0.58	20.02 \pm 0.50	17.88 \pm 1.36	21.41 \pm 0.73	21.20 \pm 0.49	18.64 \pm 1.11
SID (mmol/l)	40.50 \pm 0.56	41.28 \pm 0.40	40.0 \pm 1.04	41.28 \pm 0.64	42.0 \pm 0.70	41.28 \pm 0.91
PCV (%)	40.0 \pm 2.65	29.07 \pm 0.42	32.0 \pm 0.83	28.42 \pm 0.61	28.33 \pm 0.72	28.57 \pm 0.64
Osm. (mosm/kg H ₂ O)	305.25 \pm 1.59	316.08 \pm 0.88	317.14 \pm 2.68	316.83 \pm 1.76	316.00 \pm 1.81	314.69 \pm 1.20
z value	0.278 \pm 0.004	0.280 \pm 0.003	0.266 \pm 0.008	0.281 \pm 0.004	0.286 \pm 0.005	0.282 \pm 0.006
BE _{fw} (mmol/l)	-0.213 \pm 0.087	0.095 \pm 0.071	0.233 \pm 0.145	0.166 \pm 0.136	0.124 \pm 0.156	-0.111 \pm 0.100
BE _{aa} (mmol/l)	2.646 \pm 4.06	-0.396 \pm 1.740	-5.772 \pm 7.628	2.362 \pm 4.049	0.950 \pm 1.142	-1.045 \pm 1.729
BE _{ab} (mmol/l)	0.925 \pm 3.621	-1.176 \pm 1.599	-5.402 \pm 6.681	-2.325 \pm 3.595	-1.315 \pm 1.044	3.171 \pm 2.126
BE _{cf} (mmol/l)	-0.623 \pm 0.486	-0.134 \pm 0.399	-1.504 \pm 1.073	-0.217 \pm 0.619	0.538 \pm 0.693	0.060 \pm 0.888
Glucose (mg/dl)	70.08 \pm 2.71	69.21 \pm 1.41	69.60 \pm 6.55	70.18 \pm 2.76	68.82 \pm 1.64	68.48 \pm 1.66
Albumin (g/l)	28.95 \pm 0.97	29.51 \pm 0.43	30.66 \pm 1.80	29.82 \pm 0.97	29.55 \pm 0.28	28.34 \pm 0.57
BUN (mg/dl)	24.35 \pm 3.64	47.03 \pm 1.64	40.28 \pm 3.80	49.02 \pm 2.77	47.78 \pm 3.04	48.88 \pm 3.41

Parameter	Males vs. females	Among females	Barren vs. H.P.	Barren vs. M.P.	Barren vs. L.P.	H.P. vs. M.P.	H.P. vs. L.P.	M.P. vs. L.P.
Venous pH	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
pCO ₂ (mm Hg)	N.S.	0.010	0.013	0.038	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	0.044	0.040	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	0.045	N.S.
BE (mmol/l)	0.026	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Na ⁺ (mmol/l)	0.048	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
K ⁺ (mmol/l)	0.021	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Cl ⁻ (mmol/l)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
AG (mmol/l)	0.045	0.023	0.041	0.046	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
SID (mmol/l)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
PCV (%)	0.000	0.008	0.023	0.023	0.023	N.S.	N.S.	N.S.
Osm. (mosm/Kg H ₂ O)	0.000	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
z value	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
BE _{fw} (mmol/l)	0.043	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
BE _{ua} (mmol/l)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Be _{ab} (mmol/l)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
BE _{cr} ⁻ (mmol/l)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Glucose (mg/dl)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Albumin (g/l)	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
BUN (mg/dl)	0.000	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

H.P. = high producers, M.P. = medium producers, L.P. = low producers

show lower values than the males, which indicates a consumption of buffer bases. Secondly, the fluid balance (taking into account Na⁺, PCV, osmolality and BE_{fw}) seems to be another factor that differentiates males from females. Thus, females present higher Na⁺, osmolality and BE_{fw} values than males and lower PCV percentages. Finally, other statistical differences were determined in relation to K⁺, AG and BUN values.

On the other hand, and considering the influence of milk yield, statistical significance appears in four parameters: pCO₂, HCO₃⁻, AG and PCV. The pCO₂ and AG values are the factors that differentiate barren goats from high and medium producers. In these cases barren females show higher pCO₂ values and lower AG concentrations than the others. The HCO₃⁻ concentration differentiates high milk producers from the low-producing group, showing the lowest values among females in the former group. And finally, PCV is the parameter that clearly distinguishes lactating goats (independently of milk yield) from barren females, since the latter group shows the highest levels.

DISCUSSION

We can see from the above data that neither sex nor milk yield influences blood pH in this native breed. It is a logical result if we consider that maintaining pH within notably narrow limits is vital for the normal physiologi-

cal and biochemical events that maintain life (Carlson, 1989; Bailey and Pablo, 1998). The question is how lactating females, which have certain peculiar metabolic characteristics, maintain their blood pH in the same range as males.

The process of pH regulation requires coordinated functions of blood buffers and two major organs: the lungs and the kidneys. Obviously, the buffering capacity of the body plays an important role in acid-base regulation, and this may be one of the factors that can explain the main differences associated with sex or milk yield. The most remarkable fact in all cases is that BE_{ua} does not differ between the animals, and in our opinion this is an important finding. It is generally accepted that milk production, as a physiological characteristic of females, makes particularly difficult metabolic demands on ruminants because not only energy requirements but also glucose needs are increased (Herdt, 1988). On the other hand, it is well known that in a general sense, metabolic activity modifies acid-base balance although it is difficult to estimate the degree of this contribution to the metabolic component of acid-base status. In this aspect the BE_{ua} concept plays an important role because it considers many metabolic components, such as organic acids and inorganic anions (Whitehair et al., 1995). If there is an increased metabolic rate (e.g. lactation), one can expect a significant decrease in their concentrations, even showing a negative value, which would indicate a metabolic overload (Castillo et al., 1998a, b). Taking into

account the aforementioned considerations, we can see that lactating females (and especially high and medium producers) do not show a critical metabolic overload due to lactation. This finding agrees with previous reports on dairy goats in relation to the "resistance" of these animals to certain metabolic diseases (Drackley et al., 1989; Bruss, 1996).

The first conclusion we obtain is that lactation in the Murciano-Granadina goats does not imply a metabolic risk and that the highest-producing females are best adapted to this physiological event. In consequence, these same goats show a greater respiratory effort and base consumption although they do not reach the pathological levels. It is clear that the respiratory mechanism contributes to the maintenance of normal blood pH through increased elimination of CO_2 , which can also contribute to the low HCO_3^- values found in this group (Tietz et al., 1994). The negative BE value observed only in high producers is not due to a metabolic overload and may be attributable to the fluid balance changes associated with lactation. In fact, fluid balance is another differential factor between the animals, and surprisingly, the sex factor establishes more differences than milk yield.

In relation to the sex influence, the differences refer to blood volume and osmoregulation, which are closely connected. The BE_{fw} is a useful parameter that can contribute to the explanation. We know that plasma contains water and that water content modifies base excess; in this sense, free water is water that is added to or removed from a body fluid compartment and produces changes in the Na^+ concentration. This movement of water between body fluid compartments usually occurs in response to changes in osmolality (Whitehair et al., 1995). In our study the females present a positive BE_{fw} , which implies a decrease in free water parallelly to higher Na^+ and plasma osmolality values in comparison with males. In conclusion, the females present more water bound to Na^+ than the males.

If we consider only the high or medium lactating goats, this may be a logical result. Lactation implies an effort at fluid balance to produce milk (Olsson and Dahlborn, 1989) which determines a decrease in urinary Na^+ excretion aided by the ANP influence and the capacity of these animals for drinking large amounts of water (Olsson et al., 1989; Cvek et al., 1997). But it is surprising to observe that the low-producing goats present a negative BE_{fw} accompanied by the lower Na^+ value in the females, showing that they have more free water. But another notable finding is that the barren goats, without milk synthesis demands, are similar to high and medium producing females in the fluid balance behaviour. It is complicated to seek an explanation. We must add that there are no references in this matter to goats in baseline conditions. Perhaps the Murciano-Granadina goat, as a native breed adapted to Mediterranean conditions, has a low water turnover and can retain water. A similar finding was described by Hossaini-Hilali et al. (1994) in the Moroccan goat. Nevertheless, more studies are

needed in this area and in this breed in order to clarify such questions.

The differences that appear in relation to K^+ concentrations with respect to the sex factor can be explained by taking into account the role played by the renin-angiotensin-aldosterone system, which plays a key role in the maintenance of circulating fluid volume that promotes water and Na^+ resorption in exchange for K^+ and H^+ ions (Carlson, 1989).

The role of AG in the evaluation of acid-base disorders has been controversial. Traditionally, this parameter was used to estimate the presence of unmeasured anions, but in our case this application is not valid because there are no metabolic differences as can be seen in the BE_{m} interpretation. Nowadays it is well known that AG can also vary with changes in pCO_2 and HCO_3^- values (Fencel and Leith, 1993; Castillo et al., 1998a, b), and this fact is the only reason that can explain the differences found in relation to sex and milk yield. Like in prior studies carried out by us, the usefulness of AG in the interpretation of acid-base disorders is limited.

CONCLUSIONS

In the study of acid-base balance there are two important conclusions to be drawn:

- The Murciano-Granadina goat is well adapted to the high metabolic requirements imposed by milk production.
- The females of the Murciano-Granadina breed present a peculiar fluid balance, different from the males. Nevertheless many factors that control this equilibrium may be clarified.

REFERENCES

- Bailey J. E., Pablo L. (1998): Practical approach to acid-base disorders. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, 28, 645.
- Bruss M. L. (1996): Selected metabolic diseases in goats. In: Gutierrez C., Prieto F. (eds.): *Proc. IV Cong. FeMeSPRum*, Murcia, Spain.
- Carlson G. P. (1989): Fluid, electrolyte and acid-base balance. In: Kaneko J. J. (ed.): *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Orlando, Academic Press.
- Castillo C., Garcia-Partida P., Hernandez J., Benedito J. L. (1998a): Applications of Fencel's equations in the acid-base balance changes related to pregnancy on ewe. *Vet. Med. - Czech*, 43, 27.
- Castillo C., Hernandez J., Miranda M., Lopez M., Ayala I., Benedito J. L. (1998b): Analysis of acid-base balance by application of Fencel's equations in sheep. *J. Appl. Anim. Res.*, 14, 135.
- Contreras F. O., Blanco M. R. (1997): *Fisiopatología*. Caracas, MC Graw-Hill Interamericana.
- Cvek K., Gerstberger R., Schutz H., Olsson K. (1997): The goat mammary gland as a target organ for atrial natriuretic peptide. *Acta Physiol. Scand.*, 160, 9.

- Drackley J. K., Kim Y. K., Strang B. D., Young J. W. (1989): Metabolic responses of lactating goats to feed restriction and dietary 1,3 butanediol. *J. Dairy Sci.*, *72*, 3204.
- Falagan A. (1996): Situación actual del sector productor de ganado caprino en Murcia (SE de España) y su mejora. In: Gutierrez C., Prieto F. (eds.): Proc IV Cong. FeMeS-PRum, Murcia, Spain.
- Fencl V., Leith V. E. (1993): Frontiers in respiratory physiology; Stewart's quantitative acid-base chemistry. Applications in Biology and Medicine. *Resp. Physiol.*, *91*, 1.
- Figge J., Rossing T. H., Fencl V. (1991): The role of serum proteins in acid-base equilibria. *J. Lab. Clin. Med.*, *117*, 453.
- Herdt T. H. (1988): Fuel homeostasis in the ruminant. *Vet. Clin. North Am.: Food Anim. Pract.*, *42*, 213.
- Hossaini-Hilali J., Benlamlih S., Dahlborn K. (1994): Effects of dehydration, rehydration and hyperhydration in the lactating and non-lactating black Moroccan goat. *Comp. Biochem. Physiol. A*, *109*, 1017.
- Kowalchuck J. M., Scheuermann B. W. (1994): Acid-base regulation: a comparison of quantitative methods. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, *72*, 818.
- Kubat K. (1996): Basic indicators characterizing the acid-base equilibrium and its disorders. *Vnitr. Lek.*, *42*, 181.
- Larson B. L. (1978): The dairy goat as a model in lactation studies. *J. Dairy Sci.*, *61*, 1023.
- Olsson K., Dahlborn K. (1989): Fluid balance during heat stress in lactating goats. *Quart. J. Exp. Physiol.*, *74*, 645.
- Olsson K., Karlberg B. E., Eriksson L. (1989): Atrial natriuretic peptide in pregnant and lactating goats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)*, *120*, 519.
- Qi K., Lu C. D., Owens F. N. (1992): Sulfate supplementation of Alpine goats: Effects on milk yield and composition, metabolites, nutrient digestibilities, and acid-base balance. *J. Anim. Sci.*, *70*, 3541.
- Sotillo J. L., Quiles A., Ramirez A. R. (1996): Producción Animal e Higiene Veterinaria. Vol. I. Murcia, Spain, ICE-Universidad de Murcia.
- Stewart P. A. (1981): Modern quantitative acid-base chemistry. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, *61*, 1444.
- Tietz N. W., Siggaard-Andersen O., Pruden E. L. (1994): Acid-base balance and acid-base disorders. In: Burtis C. A., Ashwood E. R. (eds.): Textbook of Clinical Chemistry. Philadelphia, W.B. Saunders Company.
- Whitehair K. A., Haskins S. C., Whitehair J., Pascoe P. J. (1995): Clinical applications of quantitative acid-base chemistry. *J. Vet. Int. Med.*, *9*, 1.
- Williams B. (1994): Biostatistics: Concepts and Applications for Biologists. London, Chapman and Hall.

Received: 00-06-09

Accepted: 00-07-22

Contact Address:

Prof. Cristina Castillo Rodríguez, PhD, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
 Phone: + 34 982 25 23 03, Fax: + 34 982 28 59 40, e-mail: ccasti@lugo.usc.es

HOW TO EVALUATE THE RESULTS OF RESEARCH: REPORTS ON RESEARCH GRANTS PROJECTS

Information and advice for postgraduate students and new research workers. Recommendations for the preparation of reports which must be based on papers already published or ready for publication.

JAK HODNOTIT VÝSLEDKY VÝZKUMU: ZPRÁVY O GRANTOVÝCH PROJEKTECH

Grantové agentury mají požadavky na sledování průběhu řešení a hodnocení výsledků přesně vyjádřeny v pravidlech svého systému. Většinou požadují uveřejnění výsledků v lektorovaných časopisech, což jim umožňuje přenést odpovědnost za posouzení kvality výsledků na nezávislé lektorské řízení. Závěrečná zpráva se proto podstatně liší od zprávy pro oponentní řízení a má přinést pouze komentář k přiloženým publikovaným výsledkům, stanovisko řešitelů k naplnění cílů projektu a přehled vynaložených nákladů. Její zpracování je časově méně náročné a posuzování nevyžaduje účast úzce zaměřených specialistů. Pokud nebylo možné všechny výsledky před předložením závěrečné zprávy uveřejnit, mohou být přiloženy rukopisy prací, již předložených redakci nebo připravovaných k předložení. V tomto případě se však hodnotitelé nemohou spolehnout na ukončené lektorské řízení a musí sami posoudit věrohodnost výsledků. Řešitelé by měli bez vyzvání přiložit potvrzení redakce o obdržení rukopisu, nebo že práce již prošla lektorským řízením a bude uveřejněna. Po uveřejnění musí být grantové agentuře dodatečně zaslány separáty, protože vyhlášením výsledku hodnocení projektů se databáze informací o vyřešených projektech neuzavírá. Je zcela pochopitelné, že v době, kdy toto hodnocení musí být provedeno, tj. za několik měsíců po ukončení financování projektu, nemusí být ještě všechny výsledky uveřejněny a výsledky se proto evidují i později po jejich prokázání uveřejnění. Řešitelé grantů však musí pečlivě dbát na uvedení informace o finanční podpoře výzkumu grantovou agenturou a správného evidenčního čísla grantu. Při posuzování dalších žádostí o udělení grantu přihlížejí grantové agentury ke všem výsledkům, které navrhovatelé dosáhli při řešení dřívějších projektů. Jejich nesplnění nebo jen částečné splnění je závažným důvodem pro opatrné rozhodování o uvolnění dalších finančních prostředků. Proto musí každý řešitel počítat s tím, že pokud neuveřejní dosažené výsledky, ztrácí šanci na získání dalšího grantu.

Zpracování projektu, pro který je požadována podpora, má v grantovém systému mimořádný význam. Slouží nejen pro posouzení významu navrhovaného

řešení a pravděpodobnosti jeho úspěšného průběhu, ale umožňuje i kontrolu splnění předpokládaných cílů. Zkušenými navrhovateli je proto věnována příprava projektů velká pozornost. Návrhy musí vycházet z dobře zpracovaného přehledu literatury a musí mít přesně formulovanou pracovní hypotézu, postupně cíle s předpokládanými termíny jejich dosažení a podrobný popis metodiky, umožňující posouzení předpokladu dosažení cílů projektu a přiměřenosti nákladů. Lacíné projekty nemusí být vůbec řešitelné a špatně zpracované návrhy nákladných projektů jsou pro sponzora příliš velkým rizikem.

Dobré projekty jsou doplněny grafickými přehledy vzájemných vazeb činností jednotlivých řešitelských týmů s termíny jejich ukončení a přesným popisem podílu jednotlivých členů týmu na řešení projektu. Nezbytnou součástí návrhů jsou charakteristiky pracovišť řešitelů a podrobné údaje o jejich vybavení. Životopisy řešitelů musí dokumentovat jejich způsobilost k splnění cílů navrhovaného projektu. Je samozřejmé, že začínající badatelé bez publikací, řešitelé neúspěšných projektů a pracoviště nedostatečně vybavená, která dosud nevychovala žádné osobnosti výzkumu, nemohou získat významnější podporu. Proto je nezbytné, aby se začínající pracovníci snažili získat podporu zkušených a aby se v jejich týmech prosadili jako spoluautoři dobrých publikací. Velkou pomocí našim pracovištím jsou programy Evropské unie a některých dalších mezinárodních institucí a zahraničních grantových agentur, nadací a univerzit, které poskytují podporu společným projektům zkušených pracovníků a perspektivním, ale v grantovém systému dosud neprovozeným pracovníkům ze zemí v přechodu (country in transition).

Při hodnocení výsledků ukončených grantových projektů podle publikací nestačí jen ověřit splnění základní podmínky, kterou je uvedení agentury a čísla grantu, bez níž není možné přijmout publikaci jako výsledek řešení. Je nutno také ověřit, zda obsah publikace odpovídá zaměření grantu a zda výsledky, uvedené v předložených publikacích, vyčerpávají záměr

projektu v plném rozsahu. Čerpání finančních prostředků musí odpovídat vykázaným výsledkům. Nelze vyúčtovat desetitisíce na speciální chemikálie pro metody molekulární biologie a vykázat výsledky, získané vážením jater pokusných myší. Nelze vyúčtovat náklady na 500 pokusných myší a předložit publikaci o výsledku pokusu na deseti myších a stejně početné kontrolní skupině. Hodnotitelé dílčích a závěrečných zpráv o grantových projektech musí pozorně sledovat také náklady na využívané služby, protože někteří řešitelé by rádi působili jako distributoři peněz, které jim byly svěřeny a řešení projektu by ochotně zadali jiným. Řešitel má tvůrčím způsobem usilovat o dosažení cíle projektu, nejčastěji o experimentální ověření hypotézy, vyplývající z rozporu v současných znalostech o studovaném problému. Nemůže proto být mecenášem, přinášejícím jiným peníze, které získal pro svoji vlastní práci. Požadavky na financování spolupráce jsou proto pečlivě posuzovány již při schvalování projektu a skutečně vynaložené prostředky musí být předmětem zájmu i při jeho závěrečném hodnocení. Stejně pozorně musí být sledovány náklady na cestovné. Konfrontace výsledků našich a zahraničních pracovišť je velmi důležitá, ale zahraniční cesty nesmějí být překážkou v práci a nemohou být jediným výstupem řešení. Velká pozornost se věnuje také podpoře vybavení pracovišť řešitelů přístroji. I tyto položky nákladů na řešení musí být velmi odpovědně zdůvodněny, musí přispívat k zlepšení podmínek pro práci nejen navrhovatele, ale i dalších spolupracovníků a řešitelů jiných projektů. Předmětem zájmu hodnotitelů výsledků řešení grantu je i to, jak rychle bylo zařízení pořízeno a po dodání uvedeno do provozu, jaký je rozsah jeho využití pro řešený projekt a pro další účely, jak se použití nového zařízení odrazilo v publikovaných výsledcích apod. Řešitelé mohou toto hodnocení usnadnit, pokud v závěrečné zprávě přesvědčivě doloží potřebné údaje, pokud jednoznačně naplní cíle projektu a pokud výsledky uveřejní ve vhodných, tj. náročných, nejlépe mezinárodních časopisech.

Vymáhání jiného přístupu k hodnocení výsledků grantového projektu, než stanoví pravidla příslušné

grantové agentury, podávání stížností, poukazování na úspěchy při řešení jiných úkolů, na věhlas řešitelů v zahraničí, na velmi úspěšné posouzení výsledků při oponentním řízení, ani podezírání hodnotitelů z nekalých úmyslů nemůže nijak změnit stanovisko, že výsledky nebyly doloženy, pokud nebyly předloženy jako separáty uveřejněných publikací s odkazem na podporu grantové agentury. Podpora Grantové agentury ČR představuje částku až několika milionů korun na jeden projekt. Ročně se jen na projekty této agentury vynakládá téměř jedna miliarda korun. Tyto finanční prostředky musí být přeměněny na publikace, které doloží jejich smysluplné použití. Pokud to řešitelé nejsou ochotni pochopit, nemohou očekávat další podporu.

Při podpoře českého výzkumu a při přípravě našich řešitelů mají významnou úlohu kromě Grantové agentury České republiky i další národní agentury, pokud jsou náročné a důsledné a nepodléhají snaze některých řešitelů vyhnout se kontrole dosažených výsledků v tvrdém a nezávislém lektorském řízení, obvyklým ve významných mezinárodních časopisech. K zvýšení náročnosti přispívají i ty národní časopisy, které podporují uveřejňování výsledků v angličtině a opírají se o spolupráci s náročnými lektory. Bohužel i v časopisech s nikoliv bezvýznamným impact faktorem mohou být uveřejněny méně kvalitní publikace. Proto se hodnotitelé musí řídit i svými zkušenostmi a nemohou se zcela bezvýhradně spolehnout pouze na lektorské řízení.

Podobné zásady hodnocení výsledku řešení experimentálních projektů mají i jiné grantové agentury v České republice i v zahraničí. Stejně náročné by mělo být hodnocení i jiných programů na podporu výzkumu, jako je fond rozvoje vysokých škol, podpora metodických center, podpora zahraničních studijních pobytů apod. Zkušenosti zatím nedovolují poskytovat finanční prostředky na neurčitě cíle nebo jen za dosavadní zásluhy. Čím lépe a náročněji je zpracován návrh projektu a čím důsledněji je požadováno a kontrolováno splnění slíbených cílů, tím větší přínos grantových systémů je dosahován nejen u nás, ale v celém světě.

Karel Hruška
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

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

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se 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 přesahnout 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 úhelnů na řádku, mezi řádky dvojitě 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 zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

Název práce (titul) nemá přesahnout 85 úhelnů 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 informace, popř. 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 nedostacích a výsledky se konfrontují s údaji publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práci 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 uvolnění 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 PŠČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Úplné znění pokynů pro autory s dodatky najdete na URL, adrese <http://www.vri.cz> nebo <http://www.uzpi.cz>

For full text of instruction for authors see <http://www.vri.cz> or <http://www.uzpi.cz>

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 keywords 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 45, No. 8, August 2000

CONTENTS

Ciganek M., Raszyk J., Kohoutek J., Ansorgová A., Salava J., Palác J.: Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs, nitro-PAHs, oxy-PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and organic chlorinated pesticides (OCPs) in the indoor and outdoor air of pig and cattle houses (in English)	217
Štefančíková A., Štěpánová G., Peřko B., Nadzamová D., Szestáková E., Škardová I., Lein stein R.: Prevalence of antibodies to <i>Borrelia burgdorferi</i> in horses of East Slovakia (in English)	227
Chroust K.: Occurrence of anthelmintic resistance in strongylid nematodes of sheep and horses in the Czech Republic	233
Castillo C., Hernandez J., Benedito J. L., Lopez-Alonso M., Miranda M., Gutierrez-Panizo C., Sotillo J.: Quantitative evaluation of acid-base balance on milk producing goats: effect of sex and milk yield (in English)	241
INFORMATION	
Hruška K.: How to evaluate the results of research: reports on research grants projects	247

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 45, č. 8, Srpen 2000

OBSAH

Ciganek M., Raszyk J., Kohoutek J., Ansorgová A., Salava J., Palác J.: Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH, nitro-PAH, oxy-PAH), polychlorované bifenylly (PCB) a chlorované pesticidy ve vnitřním a vnějším ovzduší stájí prasat a skotu	217
Štefančíková A., Štěpánová G., Peřko B., Nadzamová D., Szestáková E., Škardová I., Lein stein R.: Výskyt protilátek <i>Borrelia burgdorferi</i> u koní na východnom Slovensku	227
Chroust K.: Výskyt anthelmintické rezistence u strongylidních nematodů ovcí a koní v České republice ...	233
Castillo C., Hernandez J., Benedito J. L., Lopez-Alonso M., Miranda M., Gutierrez-Panizo C., Sotillo J.: Hodnocení kvantitativní acidobazické rovnováhy u koz: vliv pohlavi a mléčné produkce	241
INFORMACE	
Hruška K.: Jak hodnotit výsledky výzkumu: zprávy o grantových projektech	247

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd – Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: edit@uzpi.cz ● Sazba a tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 2000

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

Podávání novinových zásilek povoleno Českou poštou, s. p., Odštěpný závod Střední Čechy, č. j. NOV-6588/00-P/1 dne 9. 5. 2000