

ACTA AGRARIA KAPOSVÁRIENSIS



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kaposvári Campus
Kaposvár, 2023

Főszerkesztő / Editor in chief
Dr. Hancz Csaba
professor emeritus

Szerkesztő / Editor
Dr. Gerencsér Zsolt
tudományos főmunkatárs

Szerkesztőbizottság elnöke / Head of editorial board
Prof. Dr. Horn Péter
MHAS

Szerkesztőbizottság / Editorial board

Dr. Altbäcker Vilmos	egyetemi tanár
Dr. Kazinczi Gabriella	egyetemi tanár
Kiss Gábor	könyvtárigazgató
Dr. Kovács Melinda	egyetemi tanár
Dr. Lanszki József	egyetemi tanár
Dr. Nagy István	egyetemi tanár
Dr. Romvári Róbert	egyetemi tanár
Dr. Stefler József	professor emeritus
Dr. Sütő Zoltán	egyetemi tanár
Dr. Szabó András	egyetemi tanár

ACTA AGRARIA KAPOSVÁRIENSIS

Vol. 27 No. 1–2



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Kaposvári Campus
Kaposvár, 2023

© Szerzők, 2023
© Szerkesztő, 2023

*A műre a Creative Commons 4.0 standard licenc alábbi típusa
vonatkozik: [CC-BY-NC-ND-4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).*



KIADJA
a Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem Kaposvári Campus
7400 Kaposvár, Guba Sándor utca 40.

FELELŐS KIADÓ
Vörös Péter, campus-főigazgató

FELELŐS SZERKESZTŐ
G. Szabó Sára

BORÍTÓTERV
Szalai Norbert

ISSN 1418-1789

TARTALOMJEGYZÉK

ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS GENETIKA

Omeralfaroug Ali:

A Brief Review of the European Directive on 3Rs and Facilitating Animal Experimentation 7

TAKARMÁNYOZÁSTAN

Hancz Csaba:

Az ehető rovarok szerepe a vízi állatok fenntartható és környezetbarát takarmányozásában 29

ÁLLATEGÉSZSÉGÜGY

Demeter Csongor, Német Zoltán László, Demeter-Jeremiás Anett, Gerencsér Zsolt, Mayer András, Sándor Máté, Matics Zsolt:

A nyulak kokcidiózisa 51

Tibor Halász, Gábor Nagy, Tamás Tari, Erika Csányi, Dávid Vicze, Sándor Németh, Ágnes Cshivincsik:

Epidemiological tools to assess the spread of *Fascioloides magna* 67

DIGITÁLIS KÉPALKOTÁS

Dénes Kőrösi, András Vorobcsuk, Dániel Fajtai, Ottó Tátrai, Emőke Bodor, Rita Garamvölgyi:

Closed-chest occlusion of the left anterior descending artery in swine infarction model 77



Review

A Brief Review of the European Directive on 3Rs and Facilitating Animal Experimentation

Omeralfaroug ALI*

Agrobiotechnology and Precision Breeding for Food Security National Laboratory, Institute of Physiology and Animal Nutrition, Department of Animal Physiology and Health, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, 40 Guba Sándor Street, 7400 Kaposvár, Hungary.

ABSTRACT – The value of animals to humankind extends beyond their provision of food and physical resources; they also serve a wide range of purposes, including their role in experimentation. Given that animals play a substantial part in experimentation, it becomes imperative to improve their living conditions, at the very least as a form of compensation. As a result, the driving force behind the enactment of various legislations, including the European Union Directive (2010/63/EU), is human morality. This directive primarily pertains to specific European member states and is fundamentally aimed at safeguarding the welfare of animals used in experimentation by advocating for the implementation of the 3Rs: replacement, reduction, and refinement. Nevertheless, concerns have arisen, particularly regarding how the provisions of the directive might constrain or influence the advancement of experimentation, notably within the biomedical field. This review explores the nexus between Directive 2010/63/EU and the facilitation of animal experimentation, with a specific focus on the 3Rs. Findings reveal that the judicious application of the 3Rs markedly enhances the progress of experimentation without compromising the quality of outcomes. Furthermore, recent studies propose that the 3Rs alone may not suffice, suggesting the need to introduce additional relevant Rs. Hence, the current decrees are deemed adequate for a certain period, with potential modifications in the future. In order to encourage the advancement of experimentation without jeopardizing animal welfare, it is imperative to conduct periodic, routine reviews.

Keywords: animal welfare, reduction, refinement, replacement, research.

HISTORICAL BACKGROUND ON THE DIRECTIVE

The history of legalization and legislation for animal protection dates back over a century. For instance, in 1876, the United Kingdom introduced an Act to amend laws related to Animal Cruelty (Wells, 2011). Since then, animal welfare has become the focus of scientific experimentation worldwide, spanning various domains, including farm animals, animals used for scientific purposes, and captive wild animals. The European Union (EU) has played a crucial role in establishing comprehensive animal protection laws. On September 22, 2010, the EU issued Directive 2010/63/EU, which, following its revision in 2009, out-

*CORRESPONDING AUTHOR

Hungarian University of Agriculture and Life Sciences Kaposvar Campus

✉ H-7400 Kaposvár, Guba Sándor str. 40., ☎ +36 30 464 2369

E-mail: omeralfaroug.ali@gmail.com

lines the legal framework governing animal protection in scientific experimentation (EU, 2009 and 2010). This directive represents the culmination of efforts that began with Directive 86/609/EEC. Its primary objective is to advance animal welfare by promoting the application of the three principles known as the 3Rs: replacement, reduction, and refinement (Olsson et al. 2016; EU, 1986). Hartung (2010) provides a comprehensive discussion of the distinctions between the previous and current directives.

Directive 2010/63/EU set an implementation deadline of January 1, 2013, for all EU member states. In April 2013, Hungary, as a member state, incorporated the directive through Ordinance 40/2013 (II. 14.) and Ordinance 98/2014 (III. 25) of the Hungarian Government (Hungary, 2013; Hungary, 2014), which replaced the 1998 Hungarian Animal Welfare Act (XXVIII. Act) pertaining to animal experiments (Hungary, 1998). The current Directive 2010/63/EU consists of two sections and eight annexes. The first section outlines the intentions (56 points), whereas the second section covers general provisions, the use of particular animals in procedures, authorization procedures, measures to prevent duplication, alternative approaches, and final provisions (a total of 66 articles). The directive chiefly pertains to animals, encompassing whole animals, organs, and tissues intended for use in scientific experiments, regardless of whether the usage involves the entire animal or only a part. Its central aim is to replace animal use with alternative approaches. Thus, EU guidelines mandate that every project, including breeders, suppliers, and users, establish an animal welfare body, be it at the local, regional, or national level, with a consultant and regular supervision and monitoring activities, as specified in Article 27. Within the directive, these animal welfare bodies bear a resemblance to the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) in the United States (Van der Meulen-Frank et al., 2017). Generally, the directive excludes sectors unrelated to scientific experimentation, such as cruel chemical and industrial testing, cosmetic tests, educational demonstrations, and veterinary clinic experiments.

The provisions of Directive 2010/63/EU are fundamentally anchored in the implementation of the 3Rs, which aim to protect animals used in scientific experimentation without compromising the quality of the results. However, the adoption of the 3Rs can pose numerous challenges related to the quality of inputs and outputs in scientific experiments. Restricting methodologies and establishing criteria for animal protection may significantly impact study design, budget, and timelines compared to previous management systems. To address these aspects, this review attempts to assess the directive by investigating the effectiveness of the 3Rs in animal experimentation.

THE THREE PRINCIPLES (3RS)

When animals are extensively utilized in experiments, and given their status as sentient beings capable of experiencing pain, it becomes our ethical obligation to respect and acknowledge their suffering. This principle underlines the implementation of the 3Rs, a framework governing the use of animals in experimentation. The foundational work in this area is the book titled “The Principles of Humane Experimental Technique,” authored by *Russell and Burch* in 1959. This seminal work categorizes animal techniques into what are known as the 3Rs: replacement, reduction, and refinement. The principles laid out in this book have been incorporated into numerous directives worldwide, including Directive 2010/63/EU, the Australian Code for the Care and Use of Animals for Scientific Purposes (*NHMRC*, 2013), and the Canadian Council on Animal Care Policy Statement on Ethics of Animal Investigation (*CCAC*, 1989). With regard to Directive 2010/63/EU, the 3Rs form the core of the directive’s framework, with the primary objective of protecting the welfare of animals and eliminating or minimizing their suffering. The directive introduces a classification system for the severity of procedures, categorizing them into four levels: mild, moderate, severe, and non-recovery. This categorization is designed to be flexible, acknowledging the evolving body of knowledge regarding specific animal species. It recognizes that animal species are undergoing genetic modifications due to both environmental (epigenetic) factors and artificial engineering aimed at enhancing productivity.

In contrast to *Russell and Burch’s* book, which primarily focuses on non-human vertebrate animals, both terrestrial and aquatic, Directive 2010/63/EU extends its scope to independently feeding larval and fetal forms of mammals in the last third of their normal development, as well as cyclostomes and cephalopods. Moreover, it permits the use of genetically modified animals, subject to certain constraints, including consideration related to laboratory construction, infection prevention, housing design, management procedures, and animal handling at the endpoint of a project (*Van der Meulen-Frank et al.*, 2017).

The 3Rs and animal experimentation progress

The utilization of animals in scientific experimentation confers significant benefits to humanity. Animals serve as vital components in the testing of vaccines, medications, therapeutic approaches, and various other products and protocols (*Barbee & Turner*, 2019; *Gruen*, 2011). The generation of more data from animal experiments can have both positive and negative implications for the 3Rs, although this aspect remains to be thoroughly evaluated. The accrual of

additional data has the potential to diminish the future necessity for animals in experimentation procedures while concurrently augmenting the reliability of these procedures and their associated findings. However, the accumulation of data from animal experiments also underscores the extensive scale of animals involved in scientific research. In 2015, approximately 79.9 million animals were engaged in scientific experiments (*Taylor & Alvarez, 2019*), with nearly 25% of these being used in regulatory studies. After 2019, there has been a remarkable decline in the number of animals involved in experimentation within the EU (*EARA, 2023*), primarily attributed to reduced research activity during the COVID-19 pandemic, which prompted the imposition of restrictive measures. Interestingly, in 2020, the EU used fewer animals in research compared to the United States, China, and Japan (*Statista, 2020*), reflecting the strict theme of the directive. Nevertheless, the total number of animals used in scientific studies is influenced by numerous events. These include the extent of research activities, financial investment in the field, advancements in technology, and the implementation of systematic data gathering methods, among others.

From a political and public standpoint, there are substantial expectations regarding the measurable impacts of the 3Rs principle. Animals participating in scientific experimentation, particularly those involved in biomedical research, frequently undergo invasive procedures that may, in some cases, result in fatality. In light of this, *Louhimies (2012)* raises a pivotal question concerning the assessment of legislative effectiveness: “*Where are we today, and what are the next steps? We have real opportunities ahead of us—are we grabbing them?*”. From a logical perspective, it is acknowledged that no single piece of legislation can be considered 100% perfect. This realization has led numerous researchers to propose that the 3Rs may not be entirely sufficient or conceptually suitable for certain animal experimentation groups. In addition, some debate elevates from social and ethical perspectives. Hence, *DeGrazia & Beauchamp (2019)* advocate for the incorporation of social benefit Rs, and *Curzer et al. (2013)* propose the implementation of ecosystem Rs. Moreover, *Slokenberga (2017)* emphasizes the urgent need for comprehensive administrative and criminal liabilities within directives to enhance the protection of animals used in experimentation. Lately, extreme arguments are taking place, merely focusing on the elimination of animal use in research. These arguments have escalated to level of political arguments, such as in the EU, USA and Switzerland (*Han, 2023; Bundesrat, 2022; European Commission, 2015*). While these proposals and demands aim at improving directives and protecting animals

from experimentation, they may also present potential obstacles to the advancement of scientific experimentation. Given that the directive is founded upon the 3Rs, an examination of the efficacy of the 3Rs in facilitating experiments can offer insight into the directive's adaptability to address emerging challenges in the field. In this review, this approach is employed to highlight contemporary issues within the realm of animal experimentation and assess the directive's capacity to accommodate these concerns.

Replacement

Replacement intends to substitute animal experimentation with alternative approaches, thereby safeguarding animal species and preserving their natural diversity, particularly endangered species. This approach can only be achieved by minimizing mortality, enhancing living conditions (welfare), and rehabilitating animal reproduction and habitats. According to *Van der Meulen-Frank et al. (2017)*, replacement can take two forms: absolute and relative, depending on the requirements of the specific experiment. Furthermore, these authors detail two variants of relative replacement: 1) employing the minimal number of animals, and 2) adopting a minimal-pain approach. In this regard, Directive 2010/63/EU highly encourages the implementation of absolute replacement. However, achieving absolute replacement in several scientific domains, such as *in vivo* toxicological experiments, can be particularly challenging. Hence, the directive permits partial replacement, classifying relative replacement into the following categories: 1) non-recovery experimentation, where animals are fully anesthetized without experiencing any discomfort, and 2) experiments that necessitate the use of animals who are painlessly euthanized. The extent of replacement varies based on numerous variables, including the animal species, the maximum permissible level of pain or stress, and the value pursued by the experimentation within its respective field. According to available literature, numerous biomedical experiments conducted on animals may lack strong justification or direct relevance to the human model (*Van Norman, 2019; Bracken, 2009*). Moreover, replacement may appear beneficial in the context of non-research observations, such as restricted measurements relative to the development of treatments. Though the directive upholds the principle of scientific freedom, it also mandates adherence to ethical principles and practices. It stipulates that animal involvement must be a last resort, and experiments must aspire to justifiable goals aimed at potentially improving the quality of life. Consequently, the experimental design must aim to closely replicate the actual pathogen dose range to minimize undesirable scenarios, such as severe physiological implications and an unjustifiably high mortality rate.

Over the past decades, funding for 3R research has facilitated advancements in replacement, predominantly through the establishment of alternative approaches. These approaches are not designed as direct replacements; rather, they represent an alternative approach to addressing a specific research query. In other sections, this term can include animal methods. However, within the scope of this section, these alternative approaches are fundamentally non-animal methods, which is the sector that receives significant funding under the 3Rs development project. Advocacy for these methods plays a crucial role in their implementation, especially since many of these methods are not widely recognized. For instance, *in vivo* experiments reveal the state of actual complex organism reactions to substance(s), albeit their reliability may be hampered by inherent individual genetic variations. To mitigate variability factors and minimize harm in experiments, numerous recognized alternative approaches are available. However, *Genzel et al. (2020)* note that currently, there is no alternative method sophisticated enough to predict organ and body complexity. Therefore, the directive does not mandate the exclusive use of alternative methods but encourages the application of computer models (predictive mathematical methods), *in vitro* studies, *in silico* approaches (such as computational methods: QSARs, systems biology, pathway modeling, PBPK and PKPD modeling), and cell and tissue culture and engineering as alternatives to whole-animal experiments. Though a single alternative approach may not entirely replace *in vivo* experiments for complex endpoints, a combination of alternative methods can provide prediction tools with a certain level of accuracy (*Laroche et al., 2019*). It is important to note that the development and validation of alternative methods are ongoing processes. The European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing (EPAA) promotes the use of read-across tools (predicting a substance's toxicological endpoint based on available data from one or more related substances) and *ab initio* methods (safety assessment based on *in vitro* tests combined with *in vitro* to *in vivo* extrapolation through computational approaches) to enhance the decision-making framework (*Mahony et al., 2020*). Fortunately, substantial data on the risk assessment of thousands of substances in Europe are publicly available online. Much credit goes to the activities of the European Commission, the European Food Safety Authority, the European Medicines Agency, the project EuroMix—European Test and Risk Assessment Strategies for Mixtures, and the project EU-ToxRisk. These risk assessment summaries contribute tremendously to the advancement of 3Rs implementation and the development of alternative approaches.

According to *Goh et al. (2015)*, *in vitro* tests exhibited consistent growth in the pharmaceutical industry from 1980 to 2013, significantly contributing to the replacement principle. However, under some circumstances they may not seem sufficient (*Krebs et al., 2022*). Therefore, it's imperative to emphasize that *in vitro* tests should not be viewed as mere supplements to *in vivo* tests; rather, they present valid substitutes. In the field of biomedical research, enormous efforts spanning the past two decades have been dedicated to implementing these alternative approaches. One such approach is tissue-engineered skin, which has been validated and recognized as a viable method for achieving replacement (*Basketter and Gerberick, 2022; ESAC, 2008*). Furthermore, omics' technologies, encompassing genomics, proteomics, metabolomics, metagenomics, phenomics, and transcriptomics, have played a remarkable role in promoting the 3Rs in the context of animal experimentation, with a particularly notable impact on replacement. Methods using "omics" technologies involve the analysis of gene expression of metabolites related to treatment (*Kroeger, 2006*), potentially substituting studies that require more time and involve the use of animals. In addition, computational toxicological modeling has emerged as a valuable tool in toxicological investigations, and its adoption in the pharmaceutical field has progressively increased over the last three decades (*Ford, 2016*). Recent technological advancements have been significantly contributing to the revolutionary development of computational models, leading to a paradigm shift from 2D to 3D models. Notably, advancements in machine learning, particularly artificial intelligence, have enabled the development of models capable of predicting hormone receptor binding affinity (*Wong et al., 2017*). It is worth highlighting the substantial contribution of *in silico* simulation in predicting the human response to COVID vaccines. A further marked tool among alternative methods is the meta-analysis approach, a systematic review method involving the statistical treatment of accumulated data. This method serves as a valuable tool in minimizing unnecessary duplication of animal experiments (*Hooijmans et al., 2014*), contributing remarkably to replacement as well as, to a lesser extent, reduction. In contemporary scientific investigations, meta-analysis plays a critical role in preventing similar data redundancy in genomic, clinical, pharmacodynamic, and toxicological investigations. Notably, researchers like *Harding (2017)* have noted the availability of genomic data for non-human primate laboratory animals, representing a promising development in this domain.

Replacement offers the potential to reduce research expenses by minimizing the substantial costs associated with animal experimentation (*Polli, 2008*),

including the costs of animals themselves, housing, transportation, and feeding. However, it is important to note that in certain circumstances, additional costs may be incurred, such as software licenses, equipment (complete or spare), and quality assurance kits. Challenges may also arise due to the accessibility and variability of materials and reagents required for recommended alternative approaches. These challenges may make the implementation of alternative methods and the 3Rs difficult, especially in regions with limited resources, such as low-income and third-world countries. The potential for unaffordable price increases can jeopardize the adoption of replacement methods, leading to limitations in publications and potential compromises in the quality of research outcomes. Reputable journals typically demand high standards as well as article processing charges (APCs). In such cases, the lack of anticipated publications (*DEFRA, 2010*) can be directly attributed to budget constraints and indirectly linked to inadequate animal protection laws. Therefore, effectively implementing the 3Rs framework necessitates international harmonization and collaboration to overcome the challenges faced in advancing experimentation progress. Global adoption of the 3Rs is imperative, thereby ensuring that no scientific organization can outsource unjustified experiments to other nations. Technological advancements have facilitated worldwide collaborations that benefit both humans and animals. Subsequently, the concept of a cooperative framework has gradually gained prominence among scientific institutions. For instance, the “3R Blackboard” is a recognized platform that provides a space for various research groups to distribute excess biological materials obtained from animals (*Czubala et al., 2022*). Notably, the current EU directive, Directive 2010/63/EU, has expanded and continues to broaden the collaboration zone. It genuinely encourages the sharing of technical and non-technical information among scientific communities through open-access database systems, enhancing the prediction and validation of methods, both direct and alternative, as well as promoting more effective directive execution. This strategy is rapidly advancing, with numerous easily accessible databases now available.

One of the most frequently voiced concerns regarding replacement is the reliability of these methods or models. Although alternative approaches offer comprehensive animal protection, not all methods are as reliable or suitable as human models (*Ritskes-Hoitinga, 2022; Mikhaylova & Thornton, 2019; Kattan & Gerds, 2018; Ferdowsian & Beck, 2011*). According to *Hackam & Redelmeier (2006)*, only 33% of the most highly cited studies (selected citations) were deemed suitable for human simulation in clinical applications. In numer-

ous instances, the intricate interactions and complexities of organisms and tissues are not readily discernible or fully comprehensible without the inclusion of data obtained from *in vivo* animal studies. This concern is particularly pronounced in certain fields, such as pharmacodynamics, metabolism, epigenetics, and toxicology. For instance, certain medications intended to target specific cell types may elicit unexpected or unconventional responses during experimentation (Saeidnia et al., 2015). In this context, the directive does not take an extremist stance. In urgent studies, the replacement principle allows for the utilization of a limited number of animals in experimentation (relative replacement) without compromising the quality of findings. According to Hopper (2016), automated microsampling represents one of the approaches in biomedical experimentation to minimize sample sizes without sacrificing the quality of results. The same author asserts that the use of microsampling in animal experimentation aligns with all the criteria of the 3Rs.

Another noteworthy issue is that specific animal data is not always applicable or accurate when extrapolated to other species (Saeidnia et al., 2015; Van der Worp et al., 2010). This issue is exemplified in cases involving drug withdrawal periods. In this regard, a well-devised plan can ultimately aid in averting crises and mitigating errors. Notably, the directive has established clear obligations for projects to ensure the accuracy of results. These obligations encompass comprehensive feasibility studies, a well-structured work plan that includes a sound understanding of species differences, and the engagement of qualified and competent teams. Moreover, the directive specifies the qualifications required for members at various project phases: project design, procedure design and implementation, animal care, and animal euthanasia. These acquisitions are imperative to verify the correctness of experimental design and the reliability of outcomes, especially regarding their potential applicability to other species.

Reduction

The primary objective of reduction is to minimize and restrict the number of experimental animals without compromising the project's objectives. Thus, within the confines of the existing legal framework, the principle of the 3Rs is a crucial component of responsible research conduct. However, it does not constitute an attempt to alter the legal foundation itself. It is crucial to note that reduction does not imply the absolute elimination of animals from experiments. Hence, in situations where alternative approaches are lacking, reduction becomes of fundamental importance, and its value becomes more pronounced when implemented in conjunction with refinement (Van der Meulen-

Frank et al., 2017). For instance, during the uncharted COVID-19 pandemic, diverse animal models were indispensable in examining the disease's pathological mechanisms and immune responses (Kiani et al., 2022; Genzel et al., 2020). To curtail animal exploitation in similar cases, the strategy outlined in Directive 2010/63/EU revolves around eliminating needless duplication and incorporating the findings of preliminary experiments, such as *in vitro* tests. This emphasizes the significance of careful planning and well-defined objectives in the reduction process (Das et al., 2009). In this regard, the directive stipulates minimal requirements for application approval, encompassing the proposal, technical and non-technical summaries, and 3Rs-related information. Furthermore, it demands the maintenance of project records, including historical and current information, qualifications of team members, stock replacement approaches, and veterinarian activities to ensure an accurate assessment. According to Felsmann et al. (2014), conducting animal experiments in practice may differ from what the protocol outlines. In this case, it is essential to have continuous monitoring and supervision to ensure the fulfillment of all obligations by the project.

The assessment performed before and during the project, as described by Van der Meulen-Frank et al. (2017), might appear insufficient, prompting the need for a critical retrospective severity evaluation after the project's conclusion. The primary objective of this retrospective assessment is to provide recommendations for subsequent projects. Fortunately, the current EU directive has adopted the "upper limit to harm" approach, as seen in the first report in the Danish law on animal protection (Olsson et al., 2020). In addition, it compels member nations to conduct a retrospective assessment considering objective attainment, harm, and factors relevant to the 3Rs. This indirectly underscores the recognition that the complete elimination of harm is often unattainable. Under such a context, it is desirable to broaden the scope of some models, adopt novel updates, and assure accurate execution. Grimm et al. (2017) have noted that existing animal welfare directives and their decrees may negatively impact the credibility of experimentation. Consequently, numerous European and non-European organizations are actively engaged in developing, improving, validating, and implementing models that reduce animal exploitation in experiments. Remarkably, the outputs of these entities have exhibited steady increases and have contributed to the reduction of animal cohorts in experiments, notably in the biomedical sector.

A recent study has proposed an alternate model for evaluation that centers on the potential knowledge gains as an outcome of a project rather than a prospective assessment of potential societal benefits (Eggel & Grimm, 2018a). The

harm-benefit analysis report, which plays a crucial role in the appropriate evaluation, is one of the most significant elements requested by Directive 2010/63/EU from scientific projects. In fact, the directive places a high value on harm-benefit analysis, setting it as an obligatory purpose for research. Nevertheless, according to certain reports, the 3Rs might not be sufficient to provide comprehensive insights into the cognitive and emotional capacities of animals, their distinct interests, and the evolving understanding of harm-benefit analysis in animal experimentation (*Eggel & Grimm, 2018a and b; Grimm et al., 2017; Ferdowsian & Beck, 2011*). Given these considerations, it is advisable that Directive 2010/63/EU undergo periodic revisions. Such reviews should encompass new outcomes, including severity categorization, the reliability of current and newly developed alternative approaches, and harm-benefit analysis. The performance of periodic reviews must be carefully balanced to ensure they do not compromise the quality of experimentation output or animal comfort, which remains the directive's primary objective.

Replacement and reduction in animal experimentation are closely related, with each principle influencing the outcomes of the other. Notably, the expansion of reduction, as well as refinement, seems to be accompanied by the impracticability of eliminating animals from experiments. For instance, the measurement of the median lethal dose (LD₅₀) has alternative methods, such as improved UDP, modeling, and algorithm approaches. However, the reliability of estimated findings can sometimes be compromised when the reduction principle is not appropriately implemented. In such circumstances, validation is often necessary, and this is typically accomplished through animal studies (*Akhila et al., 2007*). The occurrence of this type of validation (re-investigation) is notably attributed to inadequate knowledge in the specific scientific field. This requirement for validation is particularly evident in fields with high reliance on toxicological experiments and genomic investigations (*Spencer et al., 2019; Brannen et al., 2016*), notably requiring a large number of animals for validation. In such cases, proper planning and validation can provide a degree of reliability in reduction and/or replacement within the designated method (*Grimm et al., 2023*).

The variability in reduction across scientific reports is influenced by categorical preferences and the reliability of findings. Therefore, Directive 2010/63/EU acknowledges the need for proper plans and operational goals to enhance validation and minimize re-investigation. Reusing animals has been recognized as an effective strategy for reduction and is commonly employed in pharmacological and toxicological investigations. However, its effectiveness

is more pronounced in the context of reduction than refinement. Properly supervised (under veterinarian) animal reuse, taking into account the animals' lifetime experiences, can significantly contribute to reduction. Screening assays and *in vivo* imaging are also valuable pharmaceutical experimentation approaches that enhance statistical power and reduce the number of animals required for validation (Brannen et al., 2016; Campbell et al., 2016). The utilization of appropriate statistical evaluation methods with higher powers has led to a reduction in the animal cohort of 20–40% (Akkermans et al., 2020) by minimizing the use of invalid methods.

Directive 2010/63/EU encourages researchers to develop, seek, and evaluate similar scientific approaches that reduce error-related noise and enhance the planning process and the quality of outcomes. In order to promote similar approaches, a non-professional summary of the project, including its purposes, techniques, and circumstances, must be available to the public. Furthermore, documentation and method transparency are fundamental practices and essential components of the professional project summary. Transparency is a central objective of Directive 2010/63/EU, aimed at increasing public awareness, especially among advocates against animal exploitation and liberationists. Given that public funding plays a substantial role in the majority of the research sector, transparency is key. While not all animal protection authorities have equal access to research facilities and data (Clark et al., 2019), the underlying concept emphasizes the importance of greater transparency. Transparency not only enhances the perception of scientific experimentation but also improves the image of the commercial sector. According to an extensive survey conducted by the European Commission in 2005 across over 25 member states, 74% of the products derived from animals raised in accordance with ethical recommendations were deemed ethically acceptable, while 58% and 57% predicted improved food quality and safety, respectively (Bonafos et al., 2010). It's worth noting that with the recent expansion of internet networks and social media (which are rapid, widespread, and user-friendly), as well as the current shortage of animal protein sources, public perceptions may have evolved compared to a few years ago.

Refinement

Refinement has a profoundly positive impact on animal welfare, thereby promoting animal comfort and enhancing the quality of research outcomes. It implies that all compatible methods are suitable for the intended purpose of the procedure, while minimizing and eliminating any discomfort to animals. Ac-

completing this approach involves measures such as breeding animals, enriching housing systems and facilities, and employing proper animal care methods. In this context, the highest level of refinement achieved correlates with the highest scientific quality. Directive 2010/63/EU strongly emphasizes the need for environmental enrichment, encompassing proper housing conditions, area, facilities, and equipment. This favorably enriches the lives of research animals, broadens their range of activities, and enhances their coping processes. According to *Van der Meulen-Frank et al. (2017)*, environmental enrichment contributes more to refinement than to reduction. The implementation of refinement, along with transparency, improves the public perception of animal use in scientific experimentation and industry.

The directive also establishes minimum standards for individuals involved in experiments, especially those responsible for procedure design, method execution, animal care, and euthanasia. Member governments are further obliged to implement training programs for research team members. The establishment of an online educational system in the EU, featuring lectures and webinars, offers an effective means of promoting awareness and understanding of the 3Rs, particularly refinement. Courses and training significantly enhance the expertise of research staff (*Abelson et al., 2023; McCormick-Ell & Connell, 2019*). However, as found by *Franco & Olsson (2013)*, participation in these courses may not alter participants' perceptions of the current and future requirements for animal use in experiments. This discrepancy in outcomes is largely attributed to improper planning and implementation. Therefore, effective courses or trainings must be constructed to fulfill defined goals and consider the attendee's knowledge level. This approach has the merit of not limiting the utilization of human resources through refinement, enabling young researchers (who may not yet be considered experts) to contribute novel ideas to scientific projects without causing unnecessary discomfort or pain to animals. Accordingly, the directive permits the involvement of young researchers under specific criteria and qualifications, a necessary step toward fulfilling the requirements of refinement. This process plays a crucial role in optimizing the conduction and consistency of scientific investigations (*Kirby, 2004*) and minimizing unjustified discomfort or pain.

Reproducibility issues in experimentation can undermine the credibility and legitimacy of research in some disciplines (*Macleod & Mohan, 2019; Johnson, 2013; Richter et al., 2009*). Implementing refinement measures can remarkably enhance experimental accuracy and reproducibility. Directive 2010/63/EU established guiding principles to bolster the credibility and progress of experimentation, including considerations like animal homogeneity,

environmental enrichment (facilities consideration), randomization in experimental design, appropriate statistical methods, qualifications of individuals handling animals, and the potential for animal reuse or rehoming. Notably, these principles are undergoing assessments and recommendations. In a recent assessment, *Ecuier et al. (2023)* suggested a comprehensive framework for the rehoming of laboratory animals, which includes aspects of socialization. They also offered actionable guidance on the necessary procedures in a rehoming program. These guiding principles, referred to as the "hidden Rs" (*Louhimies, 2012*), strongly contribute to high reproducibility. Improving the consistency of animal coherence in scientific experimentations is crucial for achieving precise reproducibility. These hidden Rs not only enhance animal welfare and experimental reproducibility but also reduce the ecological footprint. The directive positively contributes to the advancement and sustainability of a wide range of scientific disciplines, extending beyond animal protection, with climate change being one of the most prominent fields in social media.

The animal endpoint serves as an early indicator (biomarkers) or a potential source of pain and/or distress in an animal experiment. This discomfort can often be minimized or avoided by applying a framework of ethical justification and scientific endpoints. One measure for mitigating pain and discomfort involves the humane euthanasia of the animal. According to *Van der Meulen-Frank et al. (2017)*, the endpoint is deliberated as a refinement option with the primary goal of maintaining a balance to align with ethical justifications. Various approaches, such as biomarkers, temperature measurements, biochemical assessment, and clinical indicators, are commonly used to determine endpoints (*Kendall et al., 2019*). In smaller-scale experimental designs, a pilot study is an effective tool for achieving refinement and reduction goals. Its importance is particularly pronounced in certain fields, such as nuclear medicine studies involving PET, SPECT, CT, and MRI scans (*Van der Meulen-Frank et al., 2017*). Moreover, it aids in the development of experimental procedures and the refinement of the number of animals involved, as multiple data points are collected from individual animals (*Hassan et al., 2006; Hudson, 2006*). The true value of a pilot study lies in its ability to identify shortcomings in the proposed experimental design or protocol. This knowledge enables researchers to make necessary improvements to environmental conditions and methodologies, thus preventing the unnecessary use of animals in experiments lacking reliable or validated approaches (*Van der Meulen-Frank et al., 2017*). However, during the planning phase, researchers and animal welfare bodies must critically assess whether the small-scale design of the pilot study is suitable for the

large/full-scale study. An additional tool that markedly benefits environmental enrichment is home cage monitoring for mice (Giles et al., 2018), which allows for improved assessment of pain, animal welfare, and their impact on experimental outcomes.

OTHER RELEVANT “R” PRINCIPLES

Directive 2010/63/EU has solely adopted the 3Rs of Russell and Burch. This decision has sparked controversial discussions and led to the establishment of other principles, referred to as relevant Rs. It is essential to differentiate between the hidden Rs of refinement and other relevant Rs. While the 3Rs are the core of the directive and the primary focus of experiments, other relevant Rs are additional principles that complement and enhance the credibility of experimentations. The concept of implementing other relevant Rs was observed even before the formulation of Directive 2010/63/EU, with advocates like *Dolan* (1999) proposing their inclusion. However, the 3Rs remain the essential foundation of the directive (mandatory to implement), and strengthening experiments in line with these principles is the current ultimate goal. Expanding the directive by incorporating other relevant Rs can markedly promote a reduction in animal use. Hence, other relevant Rs do not replace the 3Rs stated in the directive; rather, they are considered as aspects that have been identified to be associated with the enhancement of animal experimentation. In contrast, there are initial concerns that the implementation of other relevant Rs might make animal experimentation more complex due to their challenging integration and the need for additional legislative considerations. The adoption of relevant Rs heavily depends on the constraints within various research disciplines, which affect their acceptability levels. Therefore, any future adoption of additional Rs within the European Union should proceed with caution, considering the specific field of experimentation and the diverse national legislations across member nations.

Ongoing investigations on other relevant Rs and hidden Rs have been conducted, with notable efforts to adopt other relevant Rs over the last decade. For instance, in 2013, Mandal and Parija advocated for a 4th R known as “rehabilitation,” focusing on the post-experiment rehabilitation of animals (Mandal & Parija, 2013). *Curzer et al.* (2013) also urged for a 4th R called “removal” or “refusal,” which involves rejecting experimental protocols that could cause unjustified harm. There are ongoing efforts to expand the 3Rs into 6Rs, which include “responsibility” (referring to the management tasks within the experiment), “respect” (designing and performing experiments with the utmost re-

spect for animals), and “reproducibility” (ensuring that test outcomes are reproducible) as complementary Rs for fostering a culture of care (*6Roundtable*, 2022; *Akkermans et al.*, 2020). Though the concept of a culture of care has been gaining global attention, the term is most commonly recorded in the EU guidelines and published workshops (*Hawkins & Bertelsen*, 2019). Other common relevant Rs, such as “reason” (justifications for conducting animal experimentation), “recognition” or “relevance” (considering the possible implementation of appropriate alternative approaches), “reflection” (sincerely searching for alternative approaches that align with 3Rs), “reconsideration” (evaluating the feasibility of applicable alternative approaches), and “relief” (minimizing animal harm as much as possible) are also being advocated. Intriguingly, recent conferences and workshops have not merely focused on Rs but have also considered elements that influence the quality of research. For instance, in a recent conference, the so-called “mental health and work wellbeing” were proposed for consideration (*Ferrara et al.*, 2022), as a strong connection has been identified between a culture of caring in animal experimentation and individual performance.

CALL FOR GLOBAL 3RS IMPLEMENTATION

Scientific, legal, political, economic, and cultural barriers all contribute to the implementation challenges of the 3Rs. Most of these obstacles have been addressed in the aforementioned sections and can be overcome by advocating for the benefits derived from the implementation of the 3Rs. The advocacy for global adoption of the 3Rs is not a recent development; it predates the establishment of Directive 2010/63/EU. Nevertheless, it is essential to emphasize this historical perspective to expedite the worldwide implementation and harmonization of the 3Rs. One of the primary challenges in achieving global 3Rs implementation is the divergence in guiding provisions across nations, which is primarily founded on national-level social, cultural, and ethical grounds. *Grimm et al.* (2023) identified four major challenges related to these premises, including moral foundations point of view, highlighting practical recommendations, establishment of national legislation, and actual implementation. Hence, some opinions assert that 3Rs directive decrees may not be suitable or feasible in certain countries where cultures rely more on guidance within a limited legal framework established by lawmakers (*Ormandy & Schuppli*, 2014). However, this notion is not entirely accurate since the 3Rs can be readily adopted across continents. For instance, Directive 2010/63/EU allows for modifications to national and secondary legislation (which leads to minimal disparities in laws among member states). Hence, it respects stringent

measures and cultural values when there's no viable alternative and no undue harm incurred. It is noteworthy that legislation comparable to the Directive can also be observed in non-member states, such as Switzerland (*Hehemann, 2019*). This similarity is evident both in terms of major provisions and specific details.

Though recent organized initiatives strongly promote the adoption of relevant Rs, the primary emphasis should be on achieving global 3Rs harmonization. A fundamental understanding of the 3Rs, as defined by *Bayne et al. (2013)*, makes their incorporation feasible in nations lacking a well-developed directive. The global adoption of the 3Rs provides a legal framework that nurtures scientific advancements and ethical evolution, considering cultural diversity (*Louhimies, 2012*). Furthermore, the global adoption of the 3Rs can lead to harmonization, minimizing errors (reducing discrepancies and eliminating duplication), and thereby improving reliability and reproducibility.

Despite the absence of complete global 3Rs harmonization, several initiatives aimed at international harmonization have emerged. Across Europe, the European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing plays a substantial role in fostering international collaborations. Additional joint efforts involving universities and small or medium-sized enterprises are also contributing to the global development, validation, dissemination, and implementation of the 3Rs. However, further endeavors, including international meetings and discussions, collaborations, and sponsorships, are imperative to achieving global 3Rs adoption. These efforts should be established within a defined framework with adaptable specifics, adhering to a structured timeline.

CONCLUSION

To date, the EU's legislative framework has mandated the incorporation of the 3Rs within its member states. This mandate has remarkably enhanced the conditions and protection of animals involved in scientific investigations. Directive 2010/63/EU has, therefore, elevated the credibility and quality of experimentation through the promotion of best practices, streamlined workflows, data dissemination, public health safeguarding, and the development of alternative approaches. The directive's inherent flexibility safeguards our ethical justifications at present; however, it is critical to evaluate the extent to which the 3Rs principle fulfils its designated ethical objective. This is extreme necessary for altering the viewpoints on societal norms and research methodologies, which can enhance the comprehensiveness of policies that regulate animal research.

By embracing the 3Rs, Directive 2010/63/EU aspires to promote the value and quality of scientific experiments, which are the cornerstones of the project evaluation process. Although the 3Rs have made immense contributions to the scientific community and the public at large, the expansion of these principles to include other relevant Rs can potentially enhance animal protection practices. However, it is crucial to acknowledge that such an expansion might also impede experimental progress, especially from a quantitative perspective. Therefore, while the current provisions of Directive 2010/63/EU based on the 3Rs should be rigorously upheld, any future adjustments should be made without undermining the directive's foundational principles. Nevertheless, such adjustments should only occur following a comprehensive assessment of the EU directive's efficacy and the attainment of its objectives, which depends on future reports.

Acknowledgments: The work was supported by the EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00005, “support of scientific research teams” project. The support of the Hungarian National Laboratory project (RRF-2.3.1-21-2022-00007) is also gratefully acknowledged. In addition, the author would like to acknowledge András Szabó for his insightful suggestions, which improved the present review.

REFERENCES

- 6Roundtable (2022). Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Abelson, K. S., Chambers, C., De La Cueva, T., et al. (2023). Harmonisation of education, training and continuing professional development for laboratory animal caretakers, technicians and technologists: Report of the FELASA-EFAT Working Group. *Lab Anim.*, 57, 599-610. DOI: [10.1177/00236772231175550](https://doi.org/10.1177/00236772231175550).
- Akhila, J., Shyamjith, D., Alwar, M. (2007). Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. *Curr. Sci.*, 93, 917-920. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Akkermans, A., Chapsal, J. M., Coccia, E. M., et al (2020). Animal testing for vaccines. Implementing replacement, reduction and refinement: challenges and priorities. *Biologicals*, 68, 92–107. DOI: [10.1016/j.biologics.2020.07.010](https://doi.org/10.1016/j.biologics.2020.07.010).
- Australian National Health and Medical Research Council (NHMRC). (2013). Australian code for the care and use of animals for scientific purposes, 8th ed. Canberra: National Health and Medical Research Council, Australia. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Barbee, R.W., Turner, P.V. (2019). Incorporating laboratory animal science into responsible biomedical research. *ILAR J.*, 60, 9-16. DOI: [10.1093/ilar/ilz017](https://doi.org/10.1093/ilar/ilz017).
- Basketter, D.A., Gerberick, G.F. (2022). Skin Sensitization Testing: The Ascendancy of Non-Animal Methods. *Cosmetics*, 9, 38. DOI: [10.3390/cosmetics9020038](https://doi.org/10.3390/cosmetics9020038).
- Bayne, K. A., Bayvel, A. C. D., Williams, V. (2013). Laboratory animal welfare: international issues. In Bayne KA, Turner PV, eds. *Laboratory Animal Welfare*, Ed 1. New York: Academic Press. p 55-76.
- Bonafos, L., Simonin, D., Gavinelli, A. (2010). Animal welfare: European legislation and future perspectives. *J. Vet. Med. Educ.*, 37, 26–29. DOI: [10.3138/jvme.37.1.26](https://doi.org/10.3138/jvme.37.1.26).

- Bracken, M. B. (2009). Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *J. R. Soc. Med.*, 102, 120–122. DOI: [10.1258%2Fjrsn.2008.08k033](https://doi.org/10.1258%2Fjrsn.2008.08k033).
- Brannen, K. C., Chapin, R. E., Jacobs, A. C, Green, M. L. (2016). Alternative models of developmental and reproductive toxicity in pharmaceutical risk assessment and the 3Rs. *ILAR J.*, 57, 144-156. DOI: [10.1093/ilar/ilw026](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw026).
- Bundesrat (2022). Popular initiative of March 18, 2019 “Yes to the ban on animal and human experiments – Yes to research paths with impulses for safety and progress”. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024
- Campbell, B. R., Trotter G. D., Hines, C.D., et al. (2016). In vivo imaging in pharmaceutical development and its impact on the 3Rs. *ILAR J.*, 57, 212–220. DOI: [10.1093/ilar/ilw019](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw019).
- Canadian Council on Animal Care (CCAC). (1989). CCAC policy statement on ethics of animal investigation. Ottawa: CCAC. 1989. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Clark, J. M., Clifford, P., Jarrett, W., Pekow, C. (2019). Communicating about animal research with the public. *ILAR J.*, 60, 34-42. DOI: [10.1093/ilar/ilz007](https://doi.org/10.1093/ilar/ilz007).
- Curzer, H. J., Wallace, M. C., Perry, G., Muhlberger, P. J., Perry, D. (2013). The ethics of wildlife research: a nine R theory, *ILAR Journal*, 54,52–57. DOI: [10.1093/ilar/ilt012](https://doi.org/10.1093/ilar/ilt012).
- Czubala, M. A., Eilles, E., Staubi, A., et al. (2022). 3R Blackboard: A platform for animal and organ sharing. *Laboratory Animals*, 56, 292-296. DOI: [10.1177/00236772211067456](https://doi.org/10.1177/00236772211067456).
- Das, R. G., Fry, D., Preziosi, R., Hudson, M. (2009). Planning for reduction. *Altern Lab Anim.*, 37, 27–32. DOI: [10.1177/026119290903700106](https://doi.org/10.1177/026119290903700106).
- DeGrazia, D., Beauchamp, T. L. (2019). Beyond the 3 Rs to a more comprehensive framework of principles for animal research ethics. *ILAR Journal*, ilz011, 1-10. DOI: [10.1093/ilar/ilz011](https://doi.org/10.1093/ilar/ilz011).
- Department for Environment, Food and Rural Affairs (DEFRA). (2010). Review of the animal welfare research programme 2005-2010. DEFRA, London, UK, p.13. available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Dolan, K. (1999). *Ethics, Animals, and Science*. Blackwell: Oxford, UK.
- Ecuere, E., Boxall, J., Louwerse, A. L., et al. (2023). FELASA recommendations for the rehoming of animals used for scientific and educational purposes. *Lab Anim.*, 57, 572-582. DOI: [10.1177/00236772231158863](https://doi.org/10.1177/00236772231158863).
- Eggel, M., Grimm, H. (2018a). Necessary, but not sufficient. The benefit concept in the project evaluation of animal research in the context of Directive 2010/63/EU. *Animals-Basel*, 8, 34. DOI: [10.3390/ani8030034](https://doi.org/10.3390/ani8030034).
- Eggel, M., Grimm, H. (2018b). The logic, methodological and practical flaws of the harm-benefit-analysis in Directive 2010/63/EU. Conference Proceedings of Professionals in food chains. Austria, 13 June 2018 - 16 June 2018, Wageningen Academic Publishers, pp.407-411. DOI: [10.3920/978-90-8686-869-8_64](https://doi.org/10.3920/978-90-8686-869-8_64).
- ESAC, 2008. Statement on the scientific validity of in-vitro tests for skin irritation testing. [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- European Animal Research Association (EARA) (2023). 2020 EU numbers on animals used in research show the impact of Covid-19. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- European Commission (EC) (2015). Commission replies to "Stop Vivisection" European Citizens' Initiative. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- European Union (EU) (1986). European Convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes/Convention européenne sur la protection: Protection of Vertebrate Animals. Council of Europe, 123. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- European Union (EU) (2009). 22nd Report of Session 2008–09: The revision of the EU Directive on the protection of animals used for scientific purposes. Volume II; Evidence. House of Lords, London, UK. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.

- European Union (EU) (2010). Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the council: on the protection of animals used for scientific purposes. Official Journal of the European Union. 276: 33-79. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Felsmann, M. Z., Szarek, J., Felsmann, M., Strzyzewska, E. (2014). Protection of animals used in experiments in Polish law – history, present day and perspective: a review. *Vet Med (Praha)*, 59, 117–123. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Ferdowsian, H. R., Beck, N. (2011). Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research. *PLoS One*, 6, e24059. DOI: [10.1371/journal.pone.0024059](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024059).
- Ferrara, F., Hiebl, B., Kunzmann, P., et al. (2022). Culture of care in animal research – Expanding the 3Rs to include people. *Lab. Ani.*, 56, 511-518. DOI: [10.1177/00236772221102238](https://doi.org/10.1177/00236772221102238).
- Ford, K. A. (2016). Refinement, reduction, and replacement of animal toxicity tests by computational methods. *ILAR J.*, 57, 226-233. DOI: [10.1093/ilar/ilw031](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw031).
- Franco, N. H., Olsson, I. A. S. (2013). Scientists and the 3Rs: attitudes to animal use in biomedical research and the effect of mandatory training in laboratory animal science. *Lab. Anim.*, 48, 50–60. DOI: [10.1177/0023677213498717](https://doi.org/10.1177/0023677213498717).
- Genzel, L., Adan, R., Bernes, A., et al. (2020). How the COVID-19 pandemic highlights the necessity of animal research. *Curr. Biol.*, 30, R1014–R1018. DOI: [10.1016%2Fj.cub.2020.08.030](https://doi.org/10.1016%2Fj.cub.2020.08.030).
- Giles, J. M., Whitaker, J. W., Moy, S. S., Fletcher, C. A. (2018). Effect of environmental enrichment on aggression in BALB/cj and BALB/cByj mice monitored by using an automated system. *J Am Assoc Lab Anim Sci.*, 57, 236–43. DOI: [10.30802/aalas-jaalas-17-000122](https://doi.org/10.30802/aalas-jaalas-17-000122).
- Goh, J. Y., Weaver, R., Dixon, L., Platt, N., Roberts, R. (2015). Development and use of in vitro alternatives to animal testing by the pharmaceutical industry 1980-2013. *Toxicol. Res.*, 4, 1297–1307. DOI: [10.1039/C5TX00123D](https://doi.org/10.1039/C5TX00123D).
- Grimm, H., Biller-Andorno, N., Buch, T., et al. (2023). Advancing the 3Rs: innovation, implementation, ethics and society. *Front Vet Sci.*, 10:1185706. DOI: [10.3389%2Ffvets.2023.1185706](https://doi.org/10.3389%2Ffvets.2023.1185706).
- Grimm, H., Eggel, M., Deplazes-Zemp, A., Biller-Andorno, N. (2017). The road to hell is paved with good intentions: why harm–benefit analysis and its emphasis on practical benefit jeopardizes the credibility of research. *Animals-Basel*, 7, 70. DOI: [10.3390/ani7090070](https://doi.org/10.3390/ani7090070).
- Gruen, L. (2011). *Ethics and Animals*. Cambridge University Press: Cambridge, MA, USA, 2011, p.118.
- Hackam, D. G., Redelmeier, D. A. (2006). Translation of research evidence from animals to humans. *JAMA*, 296, 1727-1732. DOI: [10.1001/jama.296.14.1731](https://doi.org/10.1001/jama.296.14.1731).
- Han J. J. (2023). FDA Modernization Act 2.0 allows for alternatives to animal testing. *Artif Organs*, 47, 449-450. DOI: [10.1111/aor.14503](https://doi.org/10.1111/aor.14503).
- Harding, J. (2017). Genomic tools for the use of non-human primates in translational research. *ILAR J.*, 58, 59–68. DOI: [10.1093%2Filar%2Filar042](https://doi.org/10.1093%2Filar%2Filar042).
- Hartung, T. (2010). Comparative Analysis of the Revised Directive 2010/63/EU for the Protection of Laboratory Animals with its Predecessor 86/609/EEC – a t4 Report. *Altex*. 27, 285-303. DOI: [10.14573/altex.2010.4.285](https://doi.org/10.14573/altex.2010.4.285).
- Hassan, Z. A., Schattner, P., Mazza, D. (2006). Doing a pilot study: why is it essential?. *Malays. Fam. Physician*. 1, 70–73. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Hawkins, P., Bertelsen, T. (2019). 3Rs-related and objective indicators to help assess the culture of care. *Animals*, 9, 5–11. DOI: [10.3390/ani9110969](https://doi.org/10.3390/ani9110969).
- Hehemann, L. (2019). The approval of animal experiments in the context of animal protection and freedom of research. A legal comparison between Germany, Austria and Switzerland: Work from the legal seminar at the University of Freiburg Switzerland. Schulthess Publishing, Switzerland. pp. 305–325. (The book is in German language).

- Hooijmans, C. R., Int'Hout, J., Ritskes-Hoitinga, M., Rovers, M. M. (2014). Meta-analyses of animal studies: an introduction of a valuable instrument to further improve healthcare. *ILAR J.*, 55, 418–426. DOI: [10.1093/ilar/ilu042](https://doi.org/10.1093/ilar/ilu042).
- Hopper, L. D. (2016). Automated microsampling technologies and enhancements in the 3Rs. *ILAR J.*, 57, 166-177. DOI: [10.1093/ilar/ilw020](https://doi.org/10.1093/ilar/ilw020).
- Hudson, M. (2006). The EU Physical Agents (EMF) directive and its impact on MRI imaging in animal experiments: a submission by FRAME to the HSE. *Altern. Lab. Anim.* 34, 343-347. DOI: [10.1177/026119290603400302](https://doi.org/10.1177/026119290603400302).
- Hungary (1998). XXVIII of 1998 Act on the Protection and Welfare of Animals (Article in Hungarian language). Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Hungary (2013). 40/2013. (II. 14.) Government decree on animal experiments (Article in Hungarian language). Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Hungary (2014). The Government 96/2014. (III. 25.) Government Decree on the taking over by the central budget body of the tasks carried out through the participating organizations (Article in Hungarian language). Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Johnson, V. E. (2013). Revised standards for statistical evidence. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 110, 19313–19317. DOI: [10.1073/pnas.1313476110](https://doi.org/10.1073/pnas.1313476110).
- Kattan, M. W., Gerds, T. A. (2018). The index of prediction accuracy: an intuitive measure useful for evaluating risk prediction models. *Diagn. Progn. Res.*, 2: 7. DOI: [10.1186/s41512-018-0029-2](https://doi.org/10.1186/s41512-018-0029-2).
- Kendall, L. V., Owiny, J. R., Dohm, E. D., et al. (2019). Replacement, refinement, and reduction in animal studies with biohazardous agents. *ILAR J.*, 59, 177-194. DOI: [10.1093/ilar/ilv021](https://doi.org/10.1093/ilar/ilv021).
- Kiani, A. K., Pheby, D., Henehan, G. (2022). Ethical considerations regarding animal experimentation. *J. Prev. Med. Hyg.*, 63, E255–E266. DOI: [10.15167%2F2421-4248%2Fjpmh2022.63.2S3.2768](https://doi.org/10.15167%2F2421-4248%2Fjpmh2022.63.2S3.2768).
- Kirby, P. (2004). A guide to actively involving young people in research: for researchers, research commissioners, and managers. *INVOLVE*. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Krebs, C. E., Lam, A., McCarthy, J., Constantino, H., Sullivan, K. (2022). A survey to assess animal methods bias in scientific publishing. *bioRxiv*. DOI: [10.1101/2022.03.24.485684](https://doi.org/10.1101/2022.03.24.485684).
- Kroeger, M. (2006). How omics technologies can contribute to the “3R” principles by introducing new strategies in animal testing. *Trends in Biotechnology*, 24, 343-346. DOI: [10.1016/j.tibtech.2006.06.003](https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2006.06.003).
- Laroche, C., Aggarwal, M., Bender, H., et al (2018). Finding synergies for 3Rs – toxicokinetics and read-across: report from an EPAA partners’ Forum. *Regul Toxicol Pharmacol.* 99, 5–21. DOI: [10.1016/j.yrtph.2018.08.006](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.08.006).
- Louhimies, S. (2012). EU Directive 2010/63/EU: “Implementing the three Rs through policy”. *ALTEX Proc.*, 1, 27–33. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Macleod, M., Mohan, S. (2019). Reproducibility and rigor in animal-based research. *ILAR J.*, 60, 17-23. DOI: [10.1093/ilar/ilz015](https://doi.org/10.1093/ilar/ilz015).
- Mahony, C., Ashton, R. S., Birk, B., et al (2020). New ideas for non-animal approaches to predict repeated-dose systemic toxicity: Report from an EPAA Blue Sky Workshop. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 114, 104668. DOI: [10.1016/j.yrtph.2020.104668](https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104668).
- Mandal, J., Parija, S. C. (2013). Ethics of involving animals in research. *Trop Parasitol.* 3, 4-6. DOI: [10.4103/2229-5070.113884](https://doi.org/10.4103/2229-5070.113884).
- McCormick-Ell, J., Connell, N. (2019). Laboratory safety, biosecurity, and responsible animal use. *ILAR J.*, 60, 24-33. DOI: [10.1093/ilar/ilz012](https://doi.org/10.1093/ilar/ilz012).
- Mikhaylova, A.V., Thornton, T. A. (2019). Accuracy of gene expression prediction from genotype data with PrediXcan varies across and within continental populations. *Front. Genet.*, 10, 261. DOI: [10.3389/fgene.2019.00261](https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00261).

- Olsson, I. A. S., da Silva, S. P., Townend, D., Sandøe, P. (2016). Protecting animals and enabling research in the European Union: an overview of development and implementation of Directive 2010/63/EU. *ILAR J.*, 2016; 57(3): 347-357.
- Olsson, I. A. S., Nicol, C. J., Niemi, S. M., Sandøe, P. (2020). From unpleasant to unbearable—why and how to implement an upper limit to pain and other forms of suffering in research with animals. *ILAR J.*, ilz018: 1-11. DOI: [10.1093/ilar/ilz018](https://doi.org/10.1093/ilar/ilz018).
- Ormandy, E. H., Schuppli, C. A. (2014). Public attitudes toward animal research: a review. *Animals-Basel*. 4, 391-408. DOI: [10.3390/ani4030391](https://doi.org/10.3390/ani4030391).
- Polli, J. E. (2008). In vitro studies are sometimes better than conventional human pharmacokinetic in vivo studies in assessing bioequivalence of immediate-release solid oral dosage forms. *AAPS J.*, 10, 289–299. DOI: [10.1208/s12248-008-9027-6](https://doi.org/10.1208/s12248-008-9027-6).
- Richter, S. H., Garner, J. P., Würbel, H. (2009). Environmental standardization: cure or cause of poor reproducibility in animal experiments?. *Nat. Methods*, 6, 257–261. DOI: [10.1038/nmeth.1312](https://doi.org/10.1038/nmeth.1312).
- Ritskes-Hoitinga, M. (2022). Medical regulators: look beyond animal tests. *Nature*, 604, 599. DOI: [10.1038/d41586-022-01110-6](https://doi.org/10.1038/d41586-022-01110-6).
- Russell, W. M. S., Burch, R. L. (1959). *The principles of humane experimental technique*. Methuen & CO LTD, London, UK.
- Saeidnia, S., Manayi, A., Abdollahi, M. (2015). From in vitro experiments to in vivo and clinical studies; pros and cons. *Curr Drug Discov Technol.*, 12, 218-24. DOI: [10.2174/1570163813666160114093140](https://doi.org/10.2174/1570163813666160114093140).
- Slokenberga, S. (2017). Country report: an overview of animal protection in Latvia. In: *Il comitato scientifico del Progetto* (ed.), Scritti su etica e legislazione medica e veterinaria. Bari: Cacucci Editore, pp.149-158. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Spencer, C. C. A., Su, Z., Donnelly, P., Marchini, J. (2019). Designing genome-wide association studies: sample size, power, imputation, and the choice of genotyping chip. *PLoS Genet.*, 5, e1000477. DOI: [10.1371/journal.pgen.1000477](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000477).
- Statista (2020). Annual number of animals used in research and testing in selected countries worldwide as of 2020. Available at: [Link](#). Accessed on 15 January, 2024.
- Taylor K., Alvarez, L. R. (2019). An estimate of the number of animals used for scientific purposes worldwide in 2015. *Alternatives to Laboratory Animals*, 47, 196-213. DOI: [10.1177/0261192919899853](https://doi.org/10.1177/0261192919899853).
- Van der Meulen-Frank, M., Prins, J. B., Waarts, B. L., Hofstra, W. (2017). Vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes: principles and practice for legislation and protection. In: *Glaudemans A., Medema J., van Zanten A., Dierckx R., Ahaas C. (eds). Quality in nuclear medicine*. Springer, Cham, pp 91-105.
- Van der Worp, H. B., Howells, D. W., Sena, E. S., et al. (2010). Can animal models of disease reliably inform human studies? *PLoS Med.*, 7, e1000245. DOI: [10.1371/journal.pmed.1000245](https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000245).
- Van Norman, G. A. (2019). Limitations of animal studies for predicting toxicity in clinical trials: is it time to rethink our current approach?. *JACC: Basic to Translational Science*, 4, 845-854. DOI: [10.1016/j.jacbts.2019.10.008](https://doi.org/10.1016/j.jacbts.2019.10.008).
- Wells, D. J. (2011). Animal welfare and the 3Rs in European biomedical research. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1245, 14–16. DOI: [10.1111/j.1749-6632.2011.06335.x](https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06335.x).
- Wong, J. C., Zidar, J., Ho, J., et al. (2017). Assessment of several machine learning methods towards reliable prediction of hormone receptor binding affinity. *Chemical Data Collections*, 9-10, 114-124. DOI: [10.1016/j.cdc.2017.05.002](https://doi.org/10.1016/j.cdc.2017.05.002)



© Copyright 2023 by the authors. This is an open access article under the terms and conditions of the Creative Commons attribution ([CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)) license 4.0.



Irodalmi áttekintés

Az ehető rovarok szerepe a vízi állatok fenntartható és környezetbarát takarmányozásában

HANCZ Csaba¹ 

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Kaposvári Campus, Állattenyésztési Tudományok Intézet,
7400 Kaposvár, Guba S. u. 40

ABSTRACT - The role of edible insects in sustainable and environmentally friendly aquatic animal feeding - Review

Author: Csaba HANCZ¹

Affiliation: ¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Animal Sciences, Kaposvár Campus, H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40.

To ensure sustainable growth, feed-fed aquaculture needs to reduce its reliance on fishmeal and oil. Introducing of novel aquaculture feeds such as macroalgae, bacteria, yeasts, and insects can greatly reduce the need for fish in aquaculture while maintaining efficiency and omega-3 fatty acid profiles. Insects, particularly, can efficiently convert organic waste into valuable products, thus reducing waste management costs and replacing fish and soybean meal. The flexibility and efficiency of insect metabolism contribute to their potential in mass food and feed production. However, for insect farming to have a global impact, it needs to be economically viable and capable of supplying insect products in industrial quantities. Extensive research has been conducted to explore the potential of insect meal for various physiological effects in important crustacean and fish species in aquaculture. This paper aims to summarize the relevant literature on these topics and highlight the results of experiments conducted with key species.

Keywords: edible insects, feeding, aquaculture, sustainability

BEVEZETÉS

A fenntarthatóság és a környezetbarátság méltán váltak korunk talán legnépszerűbb hívószavaivá. Továbbá a legtöbb élelmiszertermeléssel kapcsolatos tudományos cikket hagyományosan a gyorsan növekvő világnépesség élelmészésének sürgető problémáira való hivatkozással indítanak, ami szintén teljesen indokolt az akvakultúra témakörében is (FAO 2013, 2022). Általánosságban, de mégis inkább a szárazföldi állati termék előállításra koncentrálva Dunkel és Payne (2016) az "Insects as Sustainable Food Ingredients" című könyv bevezetőjében átfogó áttekintést nyújtanak az ehető rovarok globális jelentőségéről, kiemelve az állati eredetű fehérjék iránti növekvő keresletet, a termőföld és a

*CORRESPONDING AUTHOR

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem,

✉ 7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40., ☎ +36 30 907 8546

E-mail: csaba.hancz@gmail.com

víz hatékony felhasználását, valamint a nem megújuló energiaforrások korlátait. Kiemelve a fenntarthatósággal kapcsolatos növekvő aggodalmakat, *Guiné* és munkatársai (2021) fontos megállapításokat tesznek a rovarok hatékonyságáról más haszonállatokkal összehasonlítva. Állítják, hogy a rovartermelés környezeti hatását értékelve figyelembe kell venni a táplálék értékesítésének hatásfokát, a földhasználatot és a vízfogyasztást. Tény, hogy a rovarok igénylik a legkevesebb takarmányt, földet és vizet, őket követik a baromfifélék/tyúkok, a sertések és a szarvasmarhák.

Az is egyértelmű, hogy a takarmányozott akvakultúrának a jövőben tovább kell csökkentenie a halliszt- és olajfüggőséget a fenntartható ágazati növekedés biztosítása érdekében. Az újszerű akvakultúra takarmányok (makroalgák, baktériumok, élesztők és rovarok) globális bevezetése 2030-ra jelentősen csökkentheti az akvakultúra takarmányhal-szükségletét, a takarmányhatékonyság és az omega-3 zsírsavprofilok fenntartása mellett (*Cottrell* és munkatársai, 2020).

A rovarok az állatok legnagyobb és legváltozatosabb taxonját képviselik, több mint egymillió leírt fajjal, amelyek az összes ismert élő szervezet több mint felét, az állati létformák több mint 90%-át teszik ki. Kulcsfontosságú szerepet játszanak az ún. ökoszisztéma-szolgáltatások biztosításában, beleértve a beporzást, a biológiai védekezést, a táplálékellátást és a szerves anyagok újrahasznosítását. A rovarok a legtöbb szárazföldi ökoszisztémában a biológiai sokféleség meghatározó összetevőjét képviselik, és kritikus fontosságúak a tápanyagkörforgásban és az ökoszisztéma általános működésében (*Weisser* és *Siemann*, 2004; *Noriega* és munkatársai, 2017). Bár a növényevő rovarok károsítása a globális mezőgazdasági termelésben jelentős (mintegy 18%-osra tehető), az ismert rovarfajok kevesebb mint 0,5%-a tekinthető kártevőnek (*Jankielsohn*, 2018). A vízi rovarok is rendkívül változatosak, több mint 100.000 faj él az édesvízi ökoszisztémákban, és létfontosságú ökológiai szerepet játszanak, például lebontják a szerves anyagokat és energiát közvetítenek a trofikus szintek között. A vízi rovarok a tápanyagkörforgás láncszemeként szolgálnak, és biológiai kölcsönhatásaik jelentős hatással lehetnek az édesvízi ökoszisztémán belüli közösségi szerkezetre (*Baskar* és *Gawade*, 2021).

Az ökoszisztéma-szolgáltatások mellett a rovarok másik alapvető előnye a mezőgazdasági és egyéb szerves hulladékokon alapuló tömeges termelésük. A rovarok hatékonyan alakítják át a szerves hulladékot új termékekké, ami olyan előnyöket tesz lehetővé, mint a hulladékgazdálkodási költségek csökkentése és a rovarokból származó termékek (liszt és olaj) felhasználása a halliszt, sőt a szójaliszt helyettesítésére (*Gasco* és munkatársai, 2020). A rovarok élelmiszer-

ként és takarmányként való felhasználásával kapcsolatos legújabb fejleményekről *van Huis* (2022) adott áttekintést, megállapítva, hogy a figyelem a természetből való összegyűjtéséről már egy évtizeddel ezelőtt azok ipari termelésére helyeződött át. A termelés nagy része kezdetben a kedvtelésből tartott állatok tápjainak kiegészítését jelentette, de hamarosan az ún. aquafeed felé irányult.

A rovarból származó takarmányok számos állatfaj takarmányozási programjának részét képezik. Legfőbb előnyük, hogy fenntartható módot biztosítanak a hulladékok tápanyagokban gazdag összetevőkké történő újrahasznosítására. Mivel sok állat természetes módon fogyasztja a rovarokat, a takarmányozási programba való bevonásuk ténylegesen javíthatja akár az állatok jólétét is. Ezen kívül a rovarokból származó összetevők tápanyagösszetétele és emészthetősége általában nagyon kedvező az élettani követelményekhez és a formulázási igényekhez képest, továbbá az olyan összetevők, mint a kitin, a fehérjék és az antimikrobiális hatású zsírsavak további előnyöket biztosítanak, ahogy azt *Koutsos* (2021) összefoglalta. Végül, de nem utolsósorban hamarosan komoly gazdasági megfontolások is felmerülhetnek az egyéb állati fehérjeforrások, különösen a halliszt helyettesítésére történő felhasználásukkal kapcsolatban. Az alacsony termelt mennyiség és a magas termelési költségek miatt azonban a rovaralapú fehérjék ára még mindig magas és nem versenyképes a halliszthez vagy a szójaliszthez képest, bár a termelés növelésére irányuló folyamatos erőfeszítések növelni fogják a termék elérhetőségét és minőségét, valamint csökkenteni fogják a költségeket (*Pippinato és munkatársai, 2020*). *A Pinotti és munkatársai (2019)* által közölt adatok azonban figyelmet érdemelnek. Összehasonlítva a különböző rovarlisztek árát a szójaliszt (45% nyersfehérje) és a halliszt (65% nyersfehérje) árával, megállapították, hogy az utóbbiak 3, illetve 7-12-szer drágábbak. Amikor azonban ezt az összehasonlítást 100 g fehérjére vonatkozóan végezték, ezek az értékek 2, illetve 6-9 között alakultak.

A rovarok a legkorábbi idők óta szolgálnak az emberek táplálékául, és fogyasztásuk (entomofágia) a világ számos részén a hagyományok része, és újabban a fejlett országokban is terjedőben van, ám ennek tárgyalása jelen munkának nem célja. Célkitűzése viszont az iparszerű termelés és az erre alkalmas rovarfajok, valamint a rovarlisztek és -olajok felhasználásában elért eredmények rövid bemutatása.

A rovarok iparszerű termelésének természetesen többféle célja van. Amint az *Francuski és Beukeboom (2020)* áttekintéséből kiderül, összesen 62 faj sorolható fel ebben a körben a következő kategóriákban: biológiai védekezés

(33), élelmiszer (6), takarmány (5), beporzás (4), ipari termelés (3), gyógyászat és kozmetika (4), hulladékgyártás (2) és kutatás (5).

A legfontosabb ehető rovarfajokat az 1. táblázat tartalmazza. Más szerzők, mint például *Alfiko* és munkatársai (2022) részben más fajokat (*Bombyx mori*, *Hermetia illucens*, *Musca domestica*, *Tenebrio molitor*, *Alphitobius diaperinus*, *Acheta domesticus*, *Grylloides sigillatus*, *Gryllus assimilis*) sorolnak ebbe a kategóriába.

1. táblázat

A legfontosabb ehető rovarfajok

Faj	Köznapni név	Fejlődési stádium a felhasználáskor	Élelmiszer	Takarmány
<i>Acheta domesticus</i>	Házi tücsök	Kifejlett	x	x
<i>Tenebrio molitor</i>	Közönséges lisztbogár	Lárva	x	x
<i>Gryllus bimaculatus</i>	Mediterrán mezei tücsök	Kifejlett		x
<i>Bombyx mori</i>	Selyemlepke	Lárva, báb	x	x
<i>Galleria mellonella</i>	Nagy viaszmolylepke	Lárva	x	
<i>Apis mellifera</i>	Európai méh	Kifejlett	x	
<i>Musca domestica</i>	Házilégylepke	Lárva (nyű)		x
<i>Lucilia sericata</i>	Selymes döglégylepke	Lárva (nyű)		x
<i>Rhynchophorus ferrugineus</i>	Pálmafűró ormányosbogár	Lárva, báb	x	
<i>Rhynchophorus phoenicis</i>	Afrikai pálmazsizsik	Lárva	x	
<i>Pachnoda marginata</i>	Kongói rózsabogár	Lárva	x	x
<i>Hermetia illucens</i>	Fekete katonalégylepke	Lárva	x	x

Forrás: *Cortes Ortiz* és munkatársai, 2016; *Varelas*, 2019

ROVAR BIOMASSZA TERMELÉS

A rovarok anyagcseréjének rugalmassága és hatékonysága minden bizonnyal a legfontosabb szempont a tömeges és gazdaságos élelmiszer- és takarmánytermelésben. *Ramos-Elorduy* (2008) hangsúlyozza, hogy ez elsősorban azon a jól ismert tényen alapul, hogy a rovarok poikilotherm, azaz változó testhőmérsékletű állatok, ami takarékosabb anyagcserét biztosít számukra. Adatai szerint az ehető rovarok energiataralma fajonként és régióként eltérő, de általában a *Coleoptera* és *Lepidoptera* fajok több energiát szolgáltatnak. Kiemelendő, hogy míg a haszonállatok energiaértéke 165-705 kcal/100g, a zöltségeké 308-352 kcal/100g, a szerves hulladékon nevelt rovaroké 288-575 kcal/100g. *Waldbauer* (1968) nyújtotta talán az első átfogó áttekintést a rovarok táplálékfogyasztásáról és felhasználásáról, elemezve a fajok, étvendék és környezeti tényezők közötti különbségeket. *Maino* és *Kearney* (2015) szerint a rovarokat kis méretük, nagy számuk, lenyűgöző szaporodási teljesítményük és gyors növekedésük jellemzi, amely minőségileg más növekedési modellt követ, mint sok más állaté. A rovarok biomasszára jutó energiataralékai a kor előrehaladtával nőnek, ami magasabb termelési hatékonyságot és biomassza energiasűrűséget jelent, amit a fajlagos asszimiláció növelésével és az energiataralékok növelésével érnek el. *Halloran* és munkatársai (2016) életciklus-leltárak alapján elemezték a különböző rovartermelési rendszerek környezeti hatásait. A termelékenység növelése érdekében a genetikai munka (szelekció) szükségessége is felmerült a takarmányhasznosítás javítása érdekében (*Rumbos* és munkatársai, 2021).

Cortes Ortiz és munkatársai (2016) egy könyvfejezetben foglalták össze a rovarok tömegtermeléséről aktuálisan rendelkezésükre álló tudnivalókat. Megállapították, hogy a termelési szintek emelkedésével várható a rovarok számára gyártott minőségi takarmányok és nyersanyagok iránti igény növekedése is. A tenyésztett rovarok tápanyagszükségletének és az alapanyagok által kínált tápanyagoknak a kiegyensúlyozása további drágább adalékanyagokat, takarmánygyártási módszereket igényel. Mindemellett szükséges az ingyenes/hulladékáramba kerülő anyagok és/vagy a fel nem használt, nem kellően hasznosított vagy újszerű, állati takarmányként még nem használt biomassza kihasználása is.

Alfiko és munkatársai (2022) arra a megállapításra jutottak, hogy a tenyésztett halak takarmányozásában a rovarok halliszt helyettesítésére történő felhasználása problémákat is felvet. Az egyik a rovarok tápláléértéke, amely fajonként és fajon belül fejlődési stádiumonként eltérő. Ezért a rovarok ipari méretű termeléséhez szükséges takarmányok tervezésekor elengedhetetlen, hogy a termelők állandó, jó minőségű összetevőkkel rendelkezzenek a rovarok

etetéséhez. Egy másik kérdés, hogy tulajdonképpen a rovarfajok egyike sem helyettesíti tökéletesen a hallisztet. Az aminosavak összetételét és a fehérjék emészthetőségét tekintve a fekete katonalégylárva liszt hasonlít leginkább a hallisztre. A legtöbb rovarfajnak alacsonyabb a metionin és cisztin tartalma a halliszténél. Zsírjuktól hiányzik az EPA és DHA, így zsírsavkiegészítés nélkül nem alkalmazhatók a tengeri halak takarmányozásában. Meg kell vizsgálni továbbá a rovartenyésztés gazdaságilag életképes méretűre történő bővítésének megvalósíthatóságát, amely ipari mennyiségben (azaz összesen >1 millió tonna/év) képes terméket produkálni. A rovarlisztek mennyisége jelenleg még minimális, de növekszik, bár a következő néhány évben szerepük még mindig csekély lesz az akvakultúra-tápok gyártásában. A rovartenyésztési ágazat a következő évtizedben valószínűleg fellendül és a közeljövőben a rovarliszt, mint haltakarmány-összetevő, jelentősen befolyásolja majd az akvakultúrát, zölddé, jövedelmezővé és fenntarthatóvá téve azt.

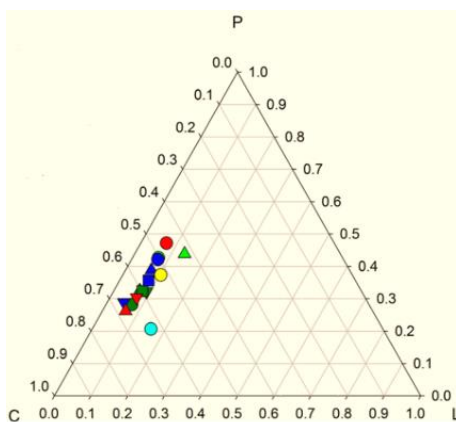
A rovarok takarmányozásra való felhasználásának táplálkozási szempontjairól *Makkar* és munkatársai (2014) írtak kiváló és részletes áttekintést. A rovarok táplálkozási adaptációjuk alapján a következők szerint osztályozhatók: folyékony táplálkozású, szívó szájszervekkel rendelkező rovarok; harapó szájszervekkel rendelkező, állati vagy növényi anyagok rágását lehetővé tevő táplálkozásúak; és szűrő-szívó rovarok, amelyek módosított szívó szájszervekkel rendelkeznek. A folyékony vagy cseppfolyós takarmányok jobban megfelelnek a szívó szájszervekkel rendelkező rovarok számára, bár a legtöbb, így táplálkozó faj képes a szilárd táplálékot extraorális emésztéssel cseppfolyósítani (*Eggink*, 2004). Mivel a rovarok szájszerkezete fajonként specifikus táplálkozási igényekhez igazodik, ezt a nekik kínált mesterséges takarmányok tervezése és gyártása során figyelembe kell vennünk.

A rovarok számára szánt takarmányok előállítására a jelenlegi technológiai eljárások alkalmazása a nyilvánvaló kiindulópont. A gyártási technológia jelentősen befolyásolja a takarmány funkcionális tulajdonságait, hibái a takarmány emészthetőségének csökkenéséhez vagy a takarmány tápanyagtartalmának csökkenéséhez vezethetnek. Továbbá az íz, az aroma, a textúra, a szín vagy más tulajdonságok megváltozása miatt a rovarok számára kevésbé elfogadhatóvá válhat a takarmány.

A legtöbb rovarfaj, amelyet világszerte élelmezési vagy takarmányozási céllal tenyésztenek, mindenevő, természetes környezetükben gyakran dögevők. A mindenevők nagyfokú táplálkozási rugalmasságot mutatnak, és sokféle eredetű táplálékot képesek fogyasztani. Táplálkozási igényeik azonban összetettek és nehezen meghatározhatók. Mivel sokféle táplálékforrást használnak fel,

és ennek megfelelően különböző táplálkozási jellemzőkkel rendelkeznek, nehéz meghatározni, hogy milyen arányban fogyasztják az egyes táplálékokat a természetben. Másrészt a mindenevő rovarok táplálkozási rugalmassága lehetővé teszi számukra, hogy több generáción keresztül fejlődjenek és szaporodjanak szuboptimális táplálékkal táplálkozva. Ez a táplálkozási rugalmasság teheti őket könnyen felnevelhetővé alacsony értékű táplálékforrások felhasználásával, ami ideálissá teszi őket a nagyüzemi termelés számára (*van Huis* és munkatársai, 2013). Mindazonáltal a tenyésztett rovarok termelékenysége javítható a megfelelően kiegyensúlyozott étrend biztosításával.

A három fő tápanyagcsoport, a fehérje, a lipid és a szénhidrát (F, L és Sz vagy angolul: P,L,C). *Morales-Ramos* és munkatársai (2014) a következők szerint használták ezek abszolút arányait a mesterséges étrend kialakításához. A PLC-arányok kiszámításához az egyes fő tápanyagok százalékos arányát elosztjuk a fehérje, lipid és emészthető szénhidrát (összes szénhidrát - rost) százalékos arányainak összegével. Például egy adott étrend fehérjearányát úgy számítják ki, hogy $\%P/(\%P + \%L + \%C)$. A három arány (P, L és C) összege mindig = 1; azonban a PLC-arányok 100-as vagy 1000-es bázisra alakíthatók át az egyes arányok megfelelő bázissal való megszorzásával. A tenyésztett rovarok (konkrétan 5 faj) takarmányaiban általánosan használt összetevők főbb tápanyag-csoportjainak tartalma és PLC-arányai alapján készült ún. háromszatú ábra jól mutatja, hogy a rendszertani és táplálkozási különbségektől függetlenül a számukra elfogadhatónak minősülő tápok tápanyag-aránya viszonylag szűk intervallumban mozgott (1. ábra).



1. ábra. Különböző rovarfajok számára készített tápok fehérje (P), lipid (L) és szénhidrát (C) tartalmának arányai. (A különböző színű alakzatok értékeit különböző szerzők közleményei alapján számították.)

(*Cortes Ortiz* és munkatársai, 2016 nyomán)

A mikrotápanyagok kis mennyiségben, de a rovarok táplálkozásához is nélkülözhetetlenek, és egy mikrotápanyag hiánya jelentős negatív hatással van biológiájukra még akkor is, ha a főbb tápanyagcsoportok megfelelő mennyiségben és arányban vannak jelen a táplálékukban. A mikrotápanyagok többnyire komplex lipideket, például szterolokat, vitaminokat és néhány ásványi anyagot tartalmaznak.

Az ehető rovarok tömeges tenyésztésének egyik fő kihívása ökonómiai szempontból a megfelelő egyensúly megtalálása a gépesítés, az automatizálás, a munkaerő, a beruházás és a termelékenység szintje között. A rovartermeléssel kapcsolatos minőségi elvárások és termelési költségek, mint például a takarmányozás, az itatás, a kezelés, a termékbetakarítás, a tisztítórendszerek, a feldolgozás, a csomagolás és a tárolás, jelentősen javíthatók a technológia fejlesztésével. Korábban a rovarokat termelő üzemek nem érték el a gépesítés magas szintjét, aminek két következménye volt: a piacon kapható termékek túlárazottak, és gyakran alacsony vagy nagyon eltérő minőségűek voltak. Ez a helyzet azonban rohamosan változik a fejlett országokban épülő újabb és újabb "rovargyárak" termelésének beindulásával, ahol a felügyeleti rendszerek integrálhatók a vezérlőrendszerekkel, amelyek folyamatos teljesítményadatokat szolgáltatnak, beleértve a takarmányozást, a párosodási és a peteérési arányt, a környezetet és a mikrobiológiai ellenőrzést, valamint az életciklus aktuális fázisát (Cortes Ortiz és munkatársai, 2016). A rovarok iparszerű termelésére és feldolgozására épülő termékelőállítás (rovarliszt és -olaj gyártás) jelenét és jövőjét formáló tényezőkről szemléletes képet ad a *Gasco* és munkatársai (2020) munkájában található SWOT analízis, valamint annak összefoglaló táblázata (2. táblázat).

2. táblázat

A rovarok felhasználásának SWOT analízise. Belső (Erősségek és Gyengeségek) valamint Külső (Lehetőségek és Fenyegetések) tényezők

	Erősségek	Gyengeségek
Belső tényezők	<i>Testösszetétel</i> Magas tápanyagtartalom, ami a nevelő szubsztrát által alakítható. Bioaktív vegyületek jelenléte.	<i>Magas piaci ár</i> <i>Relatív PUFA és ásványianyag hiány.</i> <i>Versengő vállalatok, viszonylag kis volumenű termelés.</i>
	Lehetőségek	Fenyegetések
Külső tényezők	<i>Szerves hulladék, melléktermék hasznosítás.</i> <i>Takarmány vs. táplálék.</i> <i>A termelés jelentősen növelhető.</i>	<i>A jogi szabályzás bizonytalanságai.</i>

Forrás: *Gasco* és munkatársai (2020)

A ROVARLISZTEK ALKALMAZÁSÁBAN ELÉRT EREDMÉNYEK AZ AKVA-KULTÚRÁBAN

Az akvakultúrában használt takarmányok elsősorban gabonafélékből, olajos magvakból és tengeri eredetű összetevőkből állnak, ugyanakkor a szárazföldi állattenyésztés takarmányai iránti kereslet kihívást jelent előbbieik jövedelmezősége szempontjából, ami szükségessé tette egyéb kiegészítő összetevők felhasználásának tesztelését (Freccia és munkatársai, 2020). Számos tanulmány az alternatív állati fehérjeforrásokra összpontosított, de a növényi fehérjék, a mikroorganizmus-alapú fehérjék és a különböző állati melléktermékek kutatása is folyamatban van az antinutritív tényezők és a kiegyensúlyozatlan tápanyagprofilok kezelése céljából. A rovarok felhasználása a vízi állatok takarmányozásában szintén intenzíven folyik, és a rovarok az akvakultúrában is jelentős szerepet kezdenek betölteni, mint helyettesítő fehérjeforrások. A rovarok a legtöbb édesvízi környezetben bőségesen előfordulnak, míg a tengervízben csak három nemzetség él (Henry és munkatársai, 2015). A halak nevelésében elsősorban lárva- ivadékstádiumban jelentősek a különböző rovarfajok, mert értékes fehérjeforrást jelentenek a halak számára (Makkar és munkatársai, 2014; Sánchez-Muros és munkatársai, 2014) és 7,9% és 40% közötti zsírtartalmuk (Finke, 2015; Meneguz és munkatársai, 2018) miatt. Figyelembe kell azonban venni a zsírsav- és aminosav tartalomban mutatkozó különbségeket is. Fontos tény továbbá, hogy a rovarok nem csak hal- és húsliszt-pótlók, hanem a kitin és az AMP (adenozin monofoszfát) tartalmuk miatt prebiotikumok is, így a rovarliszteknek a halak és rákfélék tápjaiba való beillesztése, még viszonylag alacsony mennyiségben is, javíthatja azok immunrendszerének működését és növelheti a teljesítményüket, ahogyan azt korábban más használati fajok esetében is kimutatták. Szem előtt kell ugyanakkor azt is tartani, hogy több mint 200 tenyésztett halfaj létezik, melyek táplálkozási igényei nem eléggé ismertek. Ezenkívül figyelembe kell venni a rovarliszt gyártási folyamatát is (pl. fejlődési fázis „betakarításkor”) mielőtt azt takarmányban használnák (Nogales-Mérida és munkatársai, 2018).

Rákfélék

A rákok rendszertanilag az ízeltlábúak altörzse, amelynek 5 osztályába fajok sokasága tartozik. A természetes táplálékláncok meghatározó tagjai, gondoljunk csak a tengeri krillre vagy az édesvizek *Cladocera* és *Copepoda* taxonjaira. Utóbbiak nem csak a természetes vizek életében, de az ún. félintenzív (azaz halastavi) akvakultúrában alkalmazott ivadéknevelésben is meghatározó sze-

repet játszanak. Jelen tanulmány viszont az emberi táplálékként, általában intenzív körülmények között nevelt fajokra, illetve azok takarmányozására koncentrálnak.

Az ágazatban a tengeri garnélarákok dominálnak, mint a legjelentősebbnek nevezhető *Litopenaeus vannamei* és a *Penaeus monodon*, de az édesvízi *Procambarus clarkii*, az *Eriocheir sinensis* és a *Macrobrachium nipponense* vagy a *M. rosenbergii* szintén jelentősek. (Mivel ezek fogyasztása hazánkban elenyésző, a fajok magyar nevének általában nincs is egységesen elfogadott változata, úgy, mint az angolban, ezért inkább nem adunk meg ilyet.)

Hasonlóan az akvakultúrában termelt halakhoz, a tenyésztett rákfélék közel 90%-át is Ázsiában termelik (ebből 50%-ot Kínában), és a legtöbbet ott is fogyasztják. Az intenzívebb termelés az 1980-as években kezdődött, amelynek mértéke a vízcserre, a levegőztetés, a (pelletált) takarmányok, a műtrágya és a gyógyszerek bevitele, valamint az ebből származó magasabb hozamok alapján számszerűsíthető. A mai garnélarák tenyésztés a nevelőhely típusa (tó, átfolyóvízes medence vagy tartály), a vízcserélő rendszer típusa (nyitott, félig zárt vagy zárt), a relatív állománysűrűség, valamint a vízellátás, a takarmányozás és a szállítás energiaigénye (extenzív, félig intenzív, intenzív vagy szuperintenzív) alapján osztályozható (Röthig és munkatársai, 2023). A modern, szuperintenzív ráktenyésztésben vízminőség-kezelés és speciális takarmányok szükségesek a szennyezőanyagok kibocsátásának elkerülése ill. csökkentése és az optimális tartási feltételek biztosítása érdekében. Az új technológiák lehetővé teszik az "intelligens akvakultúrát", ami az internetes technológia és a hagyományos akvakultúra kombinációja (Hu és munkatársai, 2020; Mustapha és munkatársai, 2021). A szuperintenzív rendszerek két fő formája a recirkulációs akvakultúra rendszer (RAS) és a bioflok. Az előbbiben a nagy teljesítményű szűrőknek köszönhetően a víz kevesebb mint 1%-át cserélik ki naponta az ammóniát eltávolító bioszűrők és a mechanikus szűrők kombinálásával, valamint UV vagy ózon üzemű vízfertőtlenítőkkel, bár ez nagymértékű beruházási költségekkel jár, és sok energiát fogyaszt (Badiola és munkatársai, 2018). Ezeket a költségeket részben ellensúlyozhatja a nagyon magas állománysűrűség, ami viszont növeli a betegségek kockázatát. Röthig és munkatársai (2023) részletesen tárgyalják a molekuláris mechanizmusokat, amelyek a rákfélék akvakultúrájában immunitást és betegségekkel szembeni ellenállást biztosítanak, bemutatják továbbá a rákfélék akvakultúrájának és a rovartenyésztésnek környezeti fenntarthatóságát, a rovaralapú takarmányok használatának jogi kereteit és a fogyasztói elfogadottság kérdéseit.

A rovaroknak a garnélarákok takarmányozásában játszott szerepével foglalkozik Sánchez-Muroz és munkatársai (2018) irodalmi áttekintése, majd

Gasco és munkatársai (2023) is kitérnek erre a körkörös gazdaság szempontjaira fókuszáló legújabb áttekintésükben. Összefoglaló tanulmányukból az alábbi eredmények emelhetők ki, mint legfontosabbak. A *Litopenaeus vannamei* faj teljesítményében nincs különbség a teljes zsírtartalmú lisztkukac (*Tenebrio molitor*) liszt 30,5%-os arányú beviteléig, amely teljes mértékben helyettesíti a hallisztet az esszenciális aminosavak megfelelő egyensúlya tekintetében is. Egy nem kiegyensúlyozott tápban viszont már a 7% zsírtalanított fekete katonalégy lárvalisztet tartalmazó százalékos arány negatívan befolyásolta a *L. vannamei* növekedését. A hallisztet tartalmazó táp etetésével összehasonlítva, a teljes zsírtartalmú fekete katonalégy lárva liszt 10%-os bevitelével a halliszt részleges helyettesítésére a garnélaivadékok teljesítményének javulását eredményezte. A teljes zsírtartalmú lisztkukac liszt alkalmazása esetén azonban nem mutatkozott különbség, még akkor sem, ha mindkét rovarreledelkezelés magas emészthetőségi együtthatót mutatott a nyersfehérje (84%, illetve 85%) és a nyerszsír (95%, illetve 97%) tekintetében (*Shin és Lee, 2021*). *Richardson* és munkatársai (2021) a (zsírtalanított) fekete katonalégy lárva liszt pozitív hatását találták a *L. vannamei* növekedési teljesítményére.

Aaqillah-Amr és munkatársai (2021) áttekintő tanulmánya szerint a rákfélék tápláléktípusai, táplálkozási viselkedése és a tápok összetétele közötti kölcsönhatások létfontosságúak. Kitérnek a rákfélék számára összeállított tápok fejlesztésével kapcsolatos kihívásokra és lehetőségekre is, mint például az alternatív fehérje- és lipidforrások használata, a funkcionális összetevők beépítése, a takarmánygyártás optimalizálása, valamint a takarmányhatékonyság és fenntarthatóság értékelése. A szerzők javasolják, hogy a jövőbeni kutatásoknak olyan fajspecifikus és környezetbarát tápok kifejlesztésére kell összpontosítaniuk, amelyek képesek kielégíteni a rákfélék táplálkozási és élettani igényeit, valamint fokozzák növekedésüket, szaporodásukat, egészségüket és jólétüket. Ezen általánosságokon túlmenően kiemelendő az a megállapításuk, hogy az akvakultúra ágazat globálisan heterogén, az üzemméret tekintetében is. A fejlődő országokban a kkv kategóriába tartozó gazdaságok az akvakultúra termelésének ugyan nem túl jelentős részét teszik ki, a helyi lakosság megélhetése azonban gyakran tőlük függ. Itt a rákfélék és a rovarok kombinálásával ezeknek a gazdaságoknak lehetőségük van a regionális termelés gazdaságosságának növelésére.

Halak

Az alábbiakban olyan halfajokkal végzett kutatási eredmények bemutatására vállalkozunk – természetesen a teljesség igénye nélkül -, amelyeket vagy kizár-

rólag intenzív módon nevelnek, vagy az intenzív technológiai körülmények közötti tartásuk is elterjedt és gazdaságos. (Ezek említésük sorrendjében a következők: atlanti lazac, szivárványos pisztráng, tengeri keszeg, európai tengeri sügér, nílusi tilápia, afrikai harcsa.)

A világ haltermelését halászatra (fogásra) és akvakultúrára osztják. 2021-ben körülbelül 92,6 millió tonna halat fogtak ki, míg 85,5 millió tonna halat neveltek és tenyésztettek ellenőrzött akvakultúrában. A fogás és a termelés adatai ellentétes tendenciát mutatnak a tengervízből és az édesvízből (a FAO nevezéktana szerint: inland waters) származó halak esetében. Előbbi esetében ez az arány 68:8, míg az utóbbinál 12:48 millió tonna (FAO, 2022).

A tenyésztett lazac ágazat az 1960-as évekbeli kezdetek óta az elmúlt évtizedekben jelentősen nőtt, és ma már a világszerte termelt lazac mintegy 70%-át tenyésztett lazacból állítják elő. A 2021-es évben több mint 2,8 millió tonna tenyésztett lazacot állítottak elő. Ehhez képest a vadon élő lazacfélékből csak mintegy 705.000 tonnát fogtak ki. Ezek a számok, ha nem is tűnnek meghatározónak a világszintű összes akvakultúra termelésen belül, azért a tengeri halakon belül például jelentős arányt jeleznek. Azt pedig, hogy az irodalmi áttekintést ezzel az ágazattal kezdjük az a tény is indokolja, hogy a pisztráng és lazacfajok takarmányozására vonatkozó kutatások tekinthetők hagyományosan a leggazdagabban dokumentáltak.

A rovarok lazactápokban való felhasználásával kapcsolatos kutatások ígéretes eredményekre vezettek. *Lock* és munkatársai (2015) két rovarliszt terméket teszteltek kb. 250 g tömegű atlanti lazacok (*Salmo salar*) takarmányának összetevőjeként. A modern kontrolltáp 200 g/kg hallisztet (FM100) tartalmazott, amelyet fokozatosan 25, 50, 100%-ban helyettesítettek A és B rovarliszttel. A két kísérleti táp zsírtartalma volt különböző (A: 25,5 vs. B: 17,0%). A teszt 15 hétig tartott, a halak növekedési teljesítményén túl értékelték a zsírsav és aminosav összetétel alakulását és azok emészthetőségét, továbbá a máj, a vese, a középső és hátsó bél morfológiáját. Végül a filék érzékszervi vizsgálatát is elvégezték. Az A táp mindhárom verziója ugyanolyan jól teljesített, mint az FM100-es étrend. A szövettani vizsgálat nem mutatott különbséget a csoportok között, és az FM100, A100 és B25 filék érzékszervi vizsgálata sem mutatott jelentős különbséget a csoportok között a szag, az íz vagy a textúra tekintetében. Az A táp alkalmas volt a halliszt 100%-os helyettesítésére, míg a B táp nem teljesített hasonlóan jól. *Belghit* és munkatársai (2018) kimutatták, hogy a halliszt teljes helyettesítése fekete katonalégy lárva (BSFL) őrlményenyl a lazactápokban káros hatások nélkül alkalmas. Megállapították, hogy lehetséges 600 g/kg rovarlisztet rovarolajjal kombinálva hozzáadni az édesvíz-

ben nevelt atlanti lazacok takarmányához anélkül, hogy az bármilyen káros hatással lenne a növekedési teljesítményre, a takarmányhasznosításra, a látszólagos emészthetőségre és a teljestest összetételére. Továbbá a fekete katonalégylárvára fehérjedara jó aminosav-forrásnak tűnik, mert magas biológiai hozzáférhetőséggel rendelkezik. Figyelembe kell azonban venni a BSFL lisztben lévő taurin alacsony koncentrációját, és ennek a lipidanyagcserére gyakorolt lehetséges hatásait. *Weththasinghe* és munkatársai (2021) megállapították, hogy a teljes zsírtartalmú fekete katonalégy lárvá liszt javította az atlanti lazacok takarmányfelvételét és növekedési ütemét. Hat extrudált takarmányt teszteltek átlagosan 28 g kezdeti tömegű lazacokkal: kontroll táp; teljes zsírtartalmú BSFL-lisztet tartalmazó táp; zsírtalanított BSFL-lisztet tartalmazó táp; kitinmentesített BSFL-liszt; BSFL-olajos és BSFL exoskeletonos táp. A kontrolltápban lévő fehérje 15%-át helyettesítették. A teljes zsírtartalmú és a kitinmentesített tápok számszerűen csökkentették a pellet keménységét, a duzzadást és a vízstabilitást. A teljes zsírtartalmú és a kitinmentesített tápok javították a lazacok növekedési ütemét, míg a zsírtalanított liszt, az olaj és az exoskeleton a kontrollhoz hasonló növekedési teljesítményt nyújtott. A takarmányfelvétel és a halak növekedési üteme a teljes zsírtartalmú lisztet tartalmazó táppal etetett halaknál magasabb volt, mint a többi rovaros táppal etetett halaknál, de a zsírtalanított liszt jobb takarmány-hasznosítási arányt adott, mint a teljes zsírtartalmú liszt. Összefoglalva, a teljes zsírtartalmú BSFL-liszt használata javította a takarmányfelvételt és a halak növekedési ütemét, a takarmányfehérje 15%-os helyettesítési arányánál. Ezek az eredmények azt sugallják, hogy a BSFL kevésbé feldolgozott, teljes zsírtartalmú formája optimálisabb a lazacok takarmányozásában. Mindezek a vizsgálatok együttesen azt bizonyítják, hogy a rovarlisztek, különösen a BSFL-ből származó rovarlisztek, a hagyományos fehérjeforrások életképes és fenntartható alternatívái lehetnek a lazactápokban.

A pisztrángfélék, jelesül a szivárványos pisztráng (*Onchorynchus mykiss*), takarmányozásának irodalma szintén gazdag, általában és a rovarlisztek felhasználását illetően is. *Chemello* és munkatársai (2020) szerint a rovarlisztek jó jelöltek arra, hogy az ún. aquatápok új fehérjeforrásaként helyettesítsék a hallisztet, ezért vizsgálatukban a halliszt helyettesítésének hatását értékelték különböző takarmányozási szinteken. Vizsgálták a részben zsírtalanított *Tenebrio molitor* (*L.*) lárváörlemény (TM) hatását szivárványos pisztráng növekedésére, a táplálék emészthetőségére és a máj köztes anyagcseréjére. A 154 napos növekedési kísérletben négy kísérleti táppal etettek, amelyek növekvő mennyiségű TM-et tartalmaztak: 0% (TM0), 25% (TM25), 50% (TM50), és 100%-os (TM100) halliszt-helyettesítést, ami megfelelt 0%-os, 5%-os, 10%-

os, és 20%-os TM aránynak a tápban. Az emészthetőségi vizsgálatot szivárványos pisztráanggal ($94,6 \pm 7,31$ g) végezték. A növekedési paramétereket nem befolyásolta TM-tápok etetése. A látszólagos emészthetőségi együtthatókat tekintve ez csak a nyersfehérje emészthetőségét befolyásolta, a következő tendenciát mutatva: $TM0 = TM25 > TM50 > TM100$. A kulcsfontosságú aminosav-katabolikus és lipogén májenzimek aktivitását nem befolyásolta a takarmány összetétele. Az eredmények azt sugallják, hogy a részben zsírtalanított TM teljes mértékben helyettesítheti a hallisztet a kereskedelmi szivárványos pisztráng tápokban a halak teljesítményére gyakorolt negatív hatások nélkül. *Melenchón* és munkatársai (2022) vizsgálatában a fekete katonalégy lárva és a sárga lisztkukac liszt szerepelt a hallisztet 50%-ban kiváltó arányban a kísérleti (HI ill. TM) tápokban. A kontroll táp nyersfehérje tartalma 43,9% volt. Bár a növekedés abszolút értékeit tekintve a HI vagy a TM használata a szivárványos pisztráng takarmányában egyaránt hatékony volt, a TM-mel etetett halak jobban nőttek, mint a HI-val etetettek. Ezeket a különbségeket a nagyobb takarmányfelvétel jellemezte és az aktívabb emésztési funkció, amit a bél szövettani vizsgálatai is alátámasztottak, különösen a TM esetében a bélbolyhok magasságának növekedésével. Az is figyelemre méltó, hogy az enterociták magasságának kismértékű növekedését írták le a rovaralapú táplálék esetében, ami a rovarzsír eltérő felszívódásával függhet össze. A máj szövetében vagy a köztes anyagcserében nem észleltek változást. Az antioxidáns és immunológiai rendszer aktivitása a rovaralapú takarmányok esetében kismértékben javult, ami a szövetkárosodási mutatók (malondialdehid és savas foszfátáz) csökkenésében tükröződött, de ez nem változtatta meg a halak általános egészségi és jóléti állapotát. A filék összetételében kisebb változásokat figyeltek meg, de a rovarokkal etetett halak fehérjetartalma nagyobb volt. Egy közelmúltban megjelent cikkben *Dietz* és munkatársai (2023) a takarmányfelhasználást és a növekedési teljesítményt értékelték különböző szivárványos pisztrángtörzsek esetében. Kísérletükben a halliszt (FM) helyettesítésére részben zsírtalanított rovarlisztet vagy mikroalga-port alkalmaztak. Az izonitrogén és izoenergetikus tápokkal $495,15 \pm 37$ g kezdeti súlyú fiatal szivárványos pisztrángot etettek. Míg a kontroll táp 20% FM-et tartalmazott, a két kísérleti táp FM-mentes volt. Ehelyett ugyanolyan mennyiségű permetszáraz *Spirulina* por (SP) vagy részben zsírtalanított *Hermetia*-liszt (HM) került alkalmazásra alternatív fehérjeforrásként. A takarmányhasznosítás és növekedés mutatóit egy kereskedelmi fajtán és három helyi törzsen vizsgálták 56 napon keresztül. A tápokat állandó, 1,0%/napos napi adagban etették. Bár a növekedés hasonló volt a különböző tápok között, a növekedés és a takarmányhasznosítás különbözött a fajták között. A fehérje hasznosulása a helyi törzseknél a takarmánytól

függetlenül jobb volt, a kezdeti testtömegek közötti nagy különbségek miatt a kompenzációs növekedés lehetővé tette, ami befolyásolhatta a vizsgálat eredményét. Mindkét alternatív fehérjeforrás megfelelőnek bizonyult a szívárványos pisztráng táplálékában az FM teljes körű helyettesítésére. A nagy mennyiségű HM-et vagy SP-t tartalmazó táplálékhoz való jobb alkalmazkodás az eredmények alapján szelektív tenyésztéssel érhető el.

A rovarlisztek felhasználási lehetőségét a mediterrán tengeri akvakultúra legfontosabb halfajai esetében is vizsgálták. *Randazzo* és munkatársai (2023) vizsgálatának célja a tengeri keszeg (*Sparus aurata*, GSB) és az európai tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax*, ES) növekedési reakciójának, bélrendszeri egészségének és fiziológiai állapotának értékelése volt a teljes mértékben hallisztmentes és alternatív összetevőkkel kiegészített étrenddel történő etetést követően. A halakat (45%) és izolipid (20%) tartalmú tápokkal etették. A fekete katonalégyből származó lisztek (*Hermetia illucens*, H) prepupákból, egész vörös mocsári rákból (*Procambarus clarkii*, RC) vagy mikroalgakeverékből készült lisztekből készült *Tisochrysis lutea* és *Tetraselmis suecica*, MA keverékét használták arra, hogy a 10%-os fehérjetartalmú, hallisztmentes, növényi fehérje alapú, magas szójaliszt-tartalmú kontroll táp (CV) kiegészítésére. Mind-egyik tápot háromszorosan ismétlésben etették, 12 (GSB) és 18 (ES) héten keresztül. Mindkét halfaj esetében az MA-táplálék eredményezte a legrosszabb fajlagos növekedési rátát (SGR), takarmányegyütthatót (FCR) és fehérjehatékonysági arányt (PER) a CV-hez képest. A H diéta csak a GSB esetében javította jelentősen az SGR-t anélkül, hogy az FCR-t befolyásolta volna. A szárazanyag látszólagos emészthetőségi együttható (ADC) a H tápban volt a legmagasabb (kb. 76%), és a kontroll tápban a legalacsonyabb (kb. 73%), míg az RC-táplálék esetében mindkét halfaj esetében köztes értéket mértek. Enyhén gyulladt bél és megváltozott nyálkahártya-morfológiát figyeltek meg mindkét halfajnál, a CV táppal etetett csoportokban, a GSB nagyobb érzékenységgel reagált ezzel a táppal szemben. Viszont a H, RC és MA étrendek a gyulladáshoz vezető gének modulációjához vezettek. Összességében az eredmények azt mutatták, hogy a növényi fehérje alapú étrendben a H és az RC 10%-os fehérjetartalma javítja a halak növekedését és bélrendszerük egészségét mindkét halfaj esetében. Az ES esetében a mikroalgákat tartalmazó étrend szintén kedvezően hatott a halak bélrendszerének egészségére, a CV-hez képest, bár a receptúra további finomítására van szükség a növekedésre és a fiziológiai állapotra gyakorolt kedvezőtlen hatások csökkentése érdekében. Az eredmények azt sugallják, hogy a rovar- és rákeleségek funkcionális összetevőként felhasználhatók a szubadult halak számára készített tápokban mindkét faj esetében, míg a mikroalgák funkcionális takarmányként való felhasználásában további vizsgálatokra van szükség.

Rangel és munkatársainak (2024) vizsgálata a rovarlisztekben különböző arányban jelenlévő kitin emészthetőségének javítását célozta. Megállapították, hogy a szénhidrátbontó spóráképző probiotikumok versenyképes ipari megközelítést kínálnak, mivel képesek ellenállni a takarmánygyártási folyamatnak, a szállításnak, a tárolásnak és az állatok gyomor-bélrendszerének, miközben képesek növelni az egyébként emészthetetlen összetevők emészthetőségét. A kitin emészthetőségének növelése céljából két, a *Bacillus licheniformis* fajjal közeli rokonságban álló, kitinolitikus spóráképző halizolátumot /645-ös (FI645) és 658-as (FI658) halizolátum/ különítettek el az európai tengeri sügér gyomor-bélrendszeréből, és (egyenként vagy keverékként) nagy mennyiségű zsírtalanított *Hermetia illucens* lárvalisztet (HM) tartalmazó sügértápra keverték (30%-os arányban). Az FI izolátumokat a halak növekedési teljesítményére és az emészthetőségére gyakorolt hatásuk alapján értékelték. A spórák a 180 napos, szobahőmérsékleten történő takarmánytárolás során mindig megőrizték életképességüket. A FI645 takarmányba való bevitele magasabb kitin emészthetőséget eredményezett. Ezzel párhuzamosan a szárazanyag (DM), a fehérje és az energia emészthetősége is nőtt, ami összességében magasabb takarmányhatékonyságot és fehérjehatékonysági arányt eredményezett. A FI645 étrendi bevitele a plazma N-acetilglükózamin (GlcNAc) szintjének növekedéséhez vezetett. Ez az első bizonyíték a plazma GlcNAc-koncentrációjának étrend által közvetített modulációjára. A FI645 étrendi bevitele megnövelte az N-acetilglükózamin-kinázt (nagk) és a GlcNAc-foszfomutázt (pgm3), a GlcNAc-mentő útvonal és a hexozamin-bioszintézis útvonal (HBP) kulcsenzimeinek expresszióját is. Másrészt nem találtak különbséget az N-acetil-D-glükózamin-6-foszfát-deacetiláz (amdhd2), a GlcNAc glikolízisbe történő átírányításának előenzimje expressziójának tekintetében. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a megnövekedett kitin emészthetőségből származó szabad GlcNAc a halak sejtjeiben a HBP-n keresztül preferenciálisan a fehérjék O-GlcNAcylation folyamataiba irányulhat át. Továbbá, amikor *Vibrio anguillarum* fertőzésnek tették ki, és miután egy hónapig ugyanazzal a táplálékkal etették őket, az FI645 szintén növelte a halak túlélését 52,5%-ról 77,5%-ra a kontrollhoz képest. Ezek az eredmények együttesen megalapozzák a FI645 probiotikumként való felhasználásának lehetőségét a kitin emésztésének fokozására és a tengeri sügér *V. anguillarum* fertőzéssel szembeni védelmét szolgáló profilaktikus szerként való működésére. Ez a stratégia új lehetőségeket nyithat az alapanyagok felhasználására, beleértve a magas kitinszintet a haltápokban, és az antibiotikumok használatának csökkentésére az akvakultúrában.

A hazánkban is méltán népszerű és jelentős mennyiségben termelt afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) takarmányozása egyre inkább kutatott terület, beleértve a rovarlisztek felhasználási lehetőségeit különböző korcsoportjai számára. Fawole és munkatársai (2020) egy 60 napos kísérletet végeztek annak vizsgálatára, hogy milyen hatással van a halliszt fekete légy lárvával történő helyettesítése az ivadékok növekedési teljesítményére, tápanyag-felhasználására, hematológiájára, szérumbiokémiájára és oxidatív állapotára. Négy tápot állítottak össze izonitrogén (418 g/kg nyersfehérje), izolipid (95 g/kg nyerszsír) és izokalóriás (20,14 MJ/kg bruttó energia) mutatókkal. A kontroll tápot úgy állították össze, hogy a fő fehérjeforrás a halliszt (FM) volt, amelyet fokozatosan helyettesítettek *Hermetia illucens* (a továbbiakban: HP) lárváőrleménnyel 25, 50 és 75 %-ban, egyenértékű fehérjealapon, ami 57, 115 és 172 g/kg táplálékbeviteli szintnek felelt meg. A kísérlethez összesen 180 g indulósúlyú ivadékokat használtak fel. A kísérlet végén a HP 50%-kal etetett halaknál volt a legmagasabb a végső testtömeg, a súlygyarapodás, a súlygyarapodás százalékos aránya és a fajlagos növekedési ráta a többi csoporthoz képest ($p < 0,05$). A tápanyaghasznosítási mutatók, mint például a takarmányegyűtható, a fehérje hatékonysági arány is jobbnak bizonyult a HP 50%-kal etetett halaknál a kontrollhoz képest, de a takarmányfelvételre nem észleltek szignifikáns hatást ($p > 0,05$). Szignifikánsan magasabb teljes testfehérje-tartalmat mértek a HP 50%-ban, míg a lipid- és hamutartalom nem mutatott eltérést ($p > 0,05$). A vérparaméterek és a differenciális leukocitaszámok statisztikailag nem különböztek, azonban a szérumbiokémiájában, globulin, glükóz, trigliceridek és az összes bilirubin szignifikánsan különbözött a takarmányozási csoportok között ($p < 0,05$). A májfunkciós enzim (AST és ALT) azt mutatta, hogy a HP 50%-kal etetett halaknál volt a legalacsonyabb az érték. Az oxidatív stressz biomarker eredményei azt mutatják, hogy a HP-alapú táppal etetett halak malondialdehid tartalma hasonló volt a kontrollhoz, de a szuperoxid-dizmutáz és kataláz enzimaktivitás magasabbnak bizonyult a kontroll és a HP 50%-ban. Összefoglalva, a vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy az afrikai harcsa hatékonyan hasznosíthatja a fekete katonalégy lárváőrleményt 172 g/kg-ig (75%-os FM-helyettesítés) anélkül, hogy a halak növekedése, tápanyag-hasznosítása, antioxidáns- és egészségi állapota romlana.

Feltétlenül említést érdemelnek még azok az eredmények, amelyeket egy világszerte jelentős mennyiségben tenyésztett faj, a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) takarmányozásában értek el a rovarlisztek alkalmazásával. Fontes és munkatársai (2019) a szárazanyag, fehérje, zsír, energia és kitin (!) látszólagos (ADC) emészthetőségének értékelését hím nílusi tilápia ivadékokkal végezték. Hat takarmányozási kezelést alkalmaztak: (kontroll, *Nauphoeta cinerea*

liszt (NCM) (*Blattodea*), *Zophobas morio* lárva liszt (ZMM) (*Coleoptera*), *Gromphadorhina portentosa* liszt (GPM) (*Blattodea*), *Gryllus assimilis* liszt (GAM) (*Orthoptera*) és *Tenebrio molitor* lárvaőrlemény (TMM) (*Coleoptera*) három isméltésben, tartályonként 50 hallal. A kontrolltáp nem tartalmazott rovarlisztet, a másik öt kezelés pedig 80%-ban kereskedelmi forgalomban kapható tápot és 20% vizsgálati összetevőt tartalmazott, 0,1% krómoxiddal mint inert markerrel. A TMM magasabb ADC-t eredményezett a szárazanyag, a fehérje, a korrigált fehérje és a kitin tekintetében, mint a többi kezelés ($p < 0,01$). A GPM viszont a legmagasabb ADC-t mutatta a lipidek esetében ($p < 0,01$). Általánosságban elmondható, hogy a TMM mutatta a legjobb emészthetőséget a tápanyagok, az energia tekintetében, de az összes vizsgált rovareledel potenciális takarmány a nílusi tilápia ivadékok számára. Kiemelendő még az a tény, hogy a kitin emészthetősége is kiválóan bizonyult, 60-81%-s ADC értéket mutatva. Ezt a kedvező képet árnyalják egyébként *Eggink* és munkatársai (2022) kísérletének eredményei, akik fekete katonalégy lárvainak lisztjét, mint új haltakarmány összetevőt tesztelték 8 ill. 50 grammos nílusi tilápia és szivárványos pisztráng ivadékkal. A BSFL lisztet három méretfrakcióra szitálták, és így különböző kitintartalmat kaptak: 0-200 μm (finom), 200-400 μm (közepes), >400 μm (durva), 1,8, 2,7 és 15,4% kitin szárazanyag alapján. Minden faj számára négy izoenergetikus és izonitrogén-mentes takarmányt állítottak össze, beleértve egy kísérleti referenciátápot is. Három olyan tápban, amely a kísérleti referencia-táplálék 25%-át egy olyan tápanyaggal helyettesítette, amely a három BSFLM méretfrakció egyikét tartalmazta. A durva BSFLM-frakció étrendi beiktatása szignifikánsan alacsonyabb DM, nyersfehérje, nitrogén-mentes kivonat és kitin emészthetőséget eredményezett mindkét halfaj esetében, ami alátámasztja azt a hipotézist, hogy a kitin antitápanyagként működhet. Ugyanakkor, azt is megállapították, hogy mindkét faj képes megemészteni a kitint, de annak emészthetősége csökkent a táplálékban lévő kitin magasabb szintjével. *Tippayadara* és munkatársai (2021) a fekete katonalégy lárvainak lisztjét egy 12 hetes kísérletben tesztelték nílusi tilápián. Négy százhusz (14,77 \pm 2,09 g) halat hét csoportban hétféle táppal etettek: kontroll (0% BSFLM-100% FM), illetve az FM-et BSFLM-mel helyettesítő FM 10%, 20%, 40%, 60%, 80% és 100%-os arányban. A növekedési mutatók, a takarmányhasznosítási mutatók, a takarmányfelvétel és a túlélési arány nem különbözött szignifikánsan az FM és a BSFLM kezelések között. A vörös vértest, fehér vérsajt, hemoglobin, hematokrit, vérlemezke értékeket nem befolyásolta a BSFLM alkalmazás. A bőr, a nyálkahártya lizozim és peroxidáz aktivitási értékei javultak a rovarliszttel etetett halaknál. Tehát kísérletünk eredményei alapján a

BSFLM káros hatások nélkül használható a halliszt helyettesítésére a nilusi tilápia esetében akár 100%-os arányban is.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az akvakultúrának a jövőben tovább kell csökkentenie a halliszt és halolaj függőséget a fenntartható ágazati növekedés biztosítása érdekében. Az újszerű akvakultúra takarmányösszetevők (rovarok mellett a makroalgák, baktériumok, élesztők) globális bevezetése jelentősen csökkentheti az akvakultúra tengeri fogásokból származó takarmányhal szükségletét, az optimális takarmányegyütthatók és az omega-3 zsírsavprofilok fenntartása mellett. Az ökoszisztéma-szolgáltatások mellett a rovarok további alapvető előnye, hogy akár mezőgazdasági és egyéb szerves hulladékokon is tömegesen termelhetők, így a körforgásos gazdaság elvét alkalmazva ezeket hatékonyan alakítják át új termékekké. Ez olyan előnyöket tesz lehetővé, mint a hulladékgazdálkodási költségek csökkentése és a rovarokból származó termékek (liszt és olaj) felhasználása a halliszt, sőt a szójaliszt helyettesítésére.

Bár önmagában a rovarfajok egyike sem helyettesíti tökéletesen a hallisztet, az aminosav összetétel és a fehérje emészthetőségét tekintve a fekete katonalégylárvá liszt hasonlít leginkább a hallisztre. A legtöbb rovarfajnak alacsonyabb a kéntartalmú aminosav (cisztein, cisztin és a metionin) tartalma, mint a halliszté és zsírjuktól hiányzik az EPA és DHA, ezért felhasználásukkor az ezekkel történő kiegészítés nélkülözhetetlen. Ugyanakkor a rovarok nem csak hal- és húslisztpótlók, hanem kitin és adenzin monofoszfát tartalmuk miatt prebiotikumok is, így a rovarliszteknek a takarmányokba keverése, még viszonylag alacsony mennyiségben is, javíthatja az immunrendszer működését és növelheti a teljesítményt.

Az akvakultúra legfontosabb rák- és halfajai számára legújabban fejlesztett tápokban a rovarlisztek felhasználhatóságának lehetőségeit intenzív kutatások alapozzák meg. Ugyanakkor igazi áttörést globálisan csak a rovartenyésztés gazdaságilag életképes méretűre történő bővítése hozhat, ami ipari mennyiségben képes rovarterméket biztosítani, lehetővé téve a versenyképes halliszt árak elérését.

IRODALOMJEGYZÉK

- Aaqillah-Amr, M., Ariffin Hidir, M., Azra, N. et al. (2021) "Use of Pelleted Diets in Commercially Farmed Decapods during Juvenile Stages: A Review" *Animals* 11(6), 1761. DOI: [10.3390/ani11061761](https://doi.org/10.3390/ani11061761)
- Alfiko, Y., Xie, D., Astuti, R.T., Wong, J., Wang, L. (2022) Insects as a feed ingredient for fish culture: Status and trends. *Aquaculture and Fisheries*. 7(2), 166-178. DOI: [10.1016/j.aaf.2021.10.004](https://doi.org/10.1016/j.aaf.2021.10.004).

- Badiola, M., Basurko, O.C., Piedrahita, R., Hundley, P. and Mendiola, D. (2018) Energy use in Recirculating Aquaculture Systems (RAS): A review. *Aquaculture Engineering* 81, 57-70. DOI: [10.1016/j.aquaeng.2018.03.003](https://doi.org/10.1016/j.aquaeng.2018.03.003)
- Baskar K., Gawade S. (2021) Aquatic insects and their importance in assessing ecosystem health. *MOJ Eco Environ Sci.* 6(4), 136–137. DOI: [10.15406/mojes.2021.06.00226](https://doi.org/10.15406/mojes.2021.06.00226)
- Belghit, I., Liland, N.S., Waagbø, R., Biancarosa, I., Pelusio, N., Li, Y., Krogdahl, Å., Lock, E.-J. (2018) Potential of insect-based diets for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 491, 72–81. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2018.03.016](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.03.016)
- Chemello, G., Renna, M., Caimi, C., Oliva-Teles, A. et al. (2020) Partially Defatted *Tenebrio molitor* Larva Meal in Diets for Grow-Out Rainbow Trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum): Effects on Growth Performance, Diet Digestibility and Metabolic ResHuponses. *Animals*, 10(2), 229–. DOI: [10.3390/ani10020229](https://doi.org/10.3390/ani10020229)
- Cortes Ortiz, J.A. et al. (2016) Insect Mass Production Technologies. In: *Insects as Sustainable Food Ingredients*. Edited by: Aaron T. Dossey, Juan A., Morales-Ramos and M. Guadalupe Rojas Chapter 6, 153–201. DOI: [10.1016/B978-0-12-802856-8.00006-5](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802856-8.00006-5)
- Cottrell, R. S., Blanchard, J. L., Halpern, B. S., Metian, M., Froehlich, H. E. (2020) Global adoption of novel aquaculture feeds could substantially reduce forage fish demand by 2030. *Nature Food*, 1(5), 301–308. DOI: [10.1038/s43016-020-0078-x](https://doi.org/10.1038/s43016-020-0078-x)
- Dietz, C., Wessels, S., Sünder, A., Sharif, R., Gährken, J., Liebert, F. (2023) Does Genetic Background of Rainbow Trout Impact Growth and Feed Utilisation following Fishmeal Substitution by Partly Defatted Insect Meal (*Hermetia illucens*) or Microalgae Powder (*Arthrospira platensis*)? *Aquaculture Research*. Article ID 4774048, 11 page.
- Dunkel, F.V. and Payne C. (2016) Introduction to Edible Insects. in *Insects as Sustainable Food Ingredients* Edited by: Aaron T. Dossey, Juan A., Morales-Ramos and M. Guadalupe Rojas. Chapter 1, 1–27. DOI: [10.1016/B978-0-12-802856-8.00001-6](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802856-8.00001-6)
- Eggink, K. M., Pedersen, P. B., Lund, I., Dalsgaard, J. (2022) Chitin digestibility and intestinal exochitinase activity in Nile tilapia and rainbow trout fed different black soldier fly larvae meal size fractions. *Aquaculture Research*, 53(16), 5536–5546. DOI: [10.1111/are.16035](https://doi.org/10.1111/are.16035)
- FAO (2013) The contribution of insects to food security, livelihoods and the environment (fao.org)
- FAO (2022) Is the time ripe for using insect meal in aquafeeds? Bangkok [Link](#)
- Fawole, Femi J., Adeoye, Ayodeji A., Tihamiyu, Lateef O. et al. (2020) Substituting fishmeal with *Hermetia illucens* in the diets of African catfish (*Clarias gariepinus*): Effects on growth, nutrient utilization, haemato-physiological response, and oxidative stress biomarker. *Aquaculture*, 518, DOI: [10.1016/j.aquaculture.2019.734849](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2019.734849)
- Finke, M.D. (2015) Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. *Zoo Biology* 34, 554–564. DOI: [10.1002/zoo.21246](https://doi.org/10.1002/zoo.21246)
- Fontes, T.V., de Oliveira, K.R.B., Gomes Almeida, I.L. et al. (2019) Digestibility of Insect Meals for Nile Tilapia Fingerlings. *Animals*, 9(4), 181–. DOI: [10.3390/ani9040181](https://doi.org/10.3390/ani9040181)
- Francuski, L. and Beukeboom, L. W. (2020) Insects in production: An introduction. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(6-7), 422-431. DOI: [10.1111/eea.12935](https://doi.org/10.1111/eea.12935)
- Freccia, A., Bee Tubin, J. S., Nishioka, A. R., Coelho, M. G. E. (2020) Insects in Aquaculture Nutrition: An Emerging Eco-Friendly Approach or Commercial Reality? (Chapter 9) in *Emerging Technologies, Environment and Research for Sustainable Aquaculture*. Qian, L., Mohammad, S. 10.5772/intechopen.82887, DOI: [10.5772/intechopen.90489](https://doi.org/10.5772/intechopen.90489)
- Gasco, L., Biancarosa, I., Liland, N. S. (2020) From waste to feed: a review of recent knowledge on insects as producers of protein and fat for animal feeds. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*, 23, 67–79, DOI: [10.1016/j.cogsc.2020.03.003](https://doi.org/10.1016/j.cogsc.2020.03.003)

- Guiné, R., Correia, P., Coelho, C., Costa, C. (2021) The role of edible insects to mitigate challenges for sustainability. *Open Agriculture*. DOI: [10.1515/opag-2020-0206](https://doi.org/10.1515/opag-2020-0206)
- Halloran, A., Roos, N., Eilenberg, J., Cerutti, A., Bruun, S. (2016) Life cycle assessment of edible insects for food protein: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 36(4), 57–. DOI: [10.1007/s13593-016-0392-8](https://doi.org/10.1007/s13593-016-0392-8)
- Henry, M., Gasco L, Piccolo, G., Fountoulaki, E. (2015) Review on the use of insects in the diet of farmed fish: past and future. *Animal Feed Science and Technology* 203, 1–22. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2015.03.001)
- Hu, Z., Li, R., Xia, X., Yu, C., Fan, X. and Zhao, Y., (2020) A method overview in smart aquaculture. *Environmental Monitoring and Assessment* 192, 1-25. DOI: [10.1007/s10661-020-08409-9](https://doi.org/10.1007/s10661-020-08409-9)
- Jankielsohn, A. (2018) The Importance of Insects in Agricultural Ecosystems. *Advances in Entomology*, 6, 62-73. DOI: [10.4236/ae.2018.62006](https://doi.org/10.4236/ae.2018.62006)
- Koutsos, L. (2021) Applications of Insect-derived Ingredients in Animal Diets, *Journal of Animal Science*, Volume 99, Issue Supplement_3, DOI: [10.1093/jas/skab235.218](https://doi.org/10.1093/jas/skab235.218)
- Lock, E.R., Arsiwalla, T., Waagbø, R. (2015) Insect larvae meal as an alternative source of nutrients in the diet of Atlantic salmon (*Salmo salar*) postsmolt. *Aquaculture Nutrition*, 22, 1202-1213. DOI: [10.1111/anu.12343](https://doi.org/10.1111/anu.12343)
- Maino, J. and Kearney, M. (2015) Testing mechanistic models of growth in insects. *proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. DOI: [10.1098/rspb.2015.1973](https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1973)
- Makkar, H.P.S., et al. (2014) State-of-the-art on use of insects as animal feed. *Anim. Feed Sci. Tech.* DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2014.07.008)
- Melenchón, F., de Mercado, E., Pula, H.J., Cardenete, G., Barroso, F.G., Fabrikov, D., Lourenço, H.M., Pessoa, M.-F., Lagos, L. et al. 2022. Fishmeal Dietary Replacement UpPino to 50%: A Comparative Study of Two Insect Meals for Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Animals*. 12(2), 179. DOI: [10.3390/ani12020179](https://doi.org/10.3390/ani12020179)
- Meneguz, M., Schiavone, A., Gai, F., Dama, A., Lussiana, C., Renna, M. et al. (2018) Effect of rearing substrate on growth performance, waste reduction efficiency and chemical composition of black soldier fly (*Hermetia illucens*) larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. DOI: [10.1002/jsfa.9127](https://doi.org/10.1002/jsfa.9127)
- Mustapha, U.F., Alhassan, A., Jiang, D. and Li, G. (2021) Sustainable aquaculture development: a review on the roles of cloud computing, internet of things and artificial intelligence (CIA). *Reviews in Aquaculture* 13, 2076-2091. DOI: [10.1111/raq.12559](https://doi.org/10.1111/raq.12559)
- Nogales-Mérida, S., Gobbi, P., Józefiak, D., Mazurkiewicz, J. et al. (2018) Insect meals in fish nutrition. *Reviews in Aquaculture*. 11, 1080–1103. DOI: [10.1111/raq.12281](https://doi.org/10.1111/raq.12281)
- Noriega, J.A., Hortal, J., Azcárate, F.M. et al. (2017) Research trends in ecosystem services provided by insects. *Basic and Applied Ecology*, (26), 8-23. DOI: [10.1016/j.baaec.2017.09.006](https://doi.org/10.1016/j.baaec.2017.09.006)
- Pinotti, L., Giromini, C., Ottoboni, M., Tretola, M., Marchis, D. (2019). Review: Insects and former foodstuffs for upgrading food waste biomasses/streams to feed ingredients for farm animals. *Animal: an international journal of animal bioscience*, 13(7), 1365-1375. DOI: [10.1017/S1751731118003622](https://doi.org/10.1017/S1751731118003622)
- Pippinato, L., Gasco, L., Di Vita, G., Mancuso, T. (2020) Current scenario in the European edible-insect industry: a preliminary study. *Journal of Insects as Food and Feed* 6, 371-381. DOI: [10.3920/JIFF2020.000](https://doi.org/10.3920/JIFF2020.000)
- Ramos-Elorduy J. (2008) Energy supplied by edible insects from Mexico and their nutritional and ecological importance. *Ecol Food Nutr.* 47, 280–297. DOI: [10.1080/03670240701805074](https://doi.org/10.1080/03670240701805074)
- Randazzo, B., Di Marco, P., Zarantonello, M., Daniso, E. et al. (2023) Effects of supplementing a plant protein-rich diet with insect, crayfish or microalgae meals on gilthead sea bream (*Sparus aurata*)

- and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) growth, physiological status and gut health, *Aquaculture*. 575, DOI: [10.1016/j.aquaculture.2023.739811](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.739811)
- Rangel, F., Monteiro, M., Santos, R.A., Ferreira-Martins, D. et al. (2024) Novel chitinolytic *Bacillus* spp. increase feed efficiency, feed digestibility, and survivability to *Vibrio anguillarum* in European seabass fed with diets containing *Hermetia illucens* larvae meal, *Aquaculture*, Volume 579, DOI: [10.1016/j.aquaculture.2023.740258](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2023.740258)
- Richardson, A., Dantas-Lima, J., Lefranc, M. and Walraven, M. (2021) Effect of a Black soldier fly ingredient on the growth performance and disease resistance of juvenile Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Animals*. 11, 1450. DOI: [10.3390/ani11051450](https://doi.org/10.3390/ani11051450)
- Röthig, T., Barth, A., Tschirner, M. et al. (2023) Insect feed in sustainable crustacean aquaculture. *Journal of Insects as Food and Feed*. in press DOI: [10.3920/jiff2022.0117](https://doi.org/10.3920/jiff2022.0117)
- Rumbos, C., Adamaki-Sotiraki, C., Gourgouta, M., Karapanagiotidis, I., Asimaki, A., Mente, E., Athanasios, C. (2021) Strain matters: strain effect on the larval growth and performance of the yellow mealworm, *Tenebrio molitor* L. *Journal of Insects as Food and Feed*. DOI: [10.3920/JIFF2021.0035](https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0035)
- Sánchez-Muros, M.-J., Barroso, F.G., Manzano-Agugliaro, F. (2014) Insect meal as renewable source of food for animal feeding: a review. *Journal of Cleaner Production*, 65, 16–27.
- Shin, J. and Lee, K.-J. (2021) Digestibility of insect meals for Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) and their performance for growth, feed utilization and immune responses. *PLOS ONE* 16, e0260305. DOI: [10.1371/journal.pone.0260305](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0260305)
- Tippayadara, N., Dawood, M.A.O., Krutmuang, P., Hoseinifar, S.H. et al. (2021) Replacement of Fish Meal by Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Meal: Effects on Growth, Haematology, and Skin Mucus Immunity of Nile Tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Animals*, 11(1), 193. DOI: [10.3390/ani11010193](https://doi.org/10.3390/ani11010193)
- van Huis, A. (2022) Edible insects: Challenges and prospects. *Entomological Research*, 52, 161– 177. DOI: [10.1111/1748-5967.12582](https://doi.org/10.1111/1748-5967.12582)
- Varelas, V. (2019) Food Wastes as a Potential New Source for Edible Insect Mass Production for Food and Feed: A review. *Fermentation*, 5(3), 81–. DOI: [10.3390/fermentation5030081](https://doi.org/10.3390/fermentation5030081)
- Waldbauer, G.P. (1968). The Consumption and Utilization of Food by Insects. p. 229–288. in *Advances in Insect Physiology*. 5, DOI: [10.1016/s0065-2806\(08\)60230-1](https://doi.org/10.1016/s0065-2806(08)60230-1)
- Weisser W.W., and Siemann E. (Eds.) *Insects and Ecosystem Function*. Ecological Studies, Vol. 173. © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004
- Weththasinghe, P., Hansen, J.Ø., Rawski, M., Józefiak, D., Ghimire, S.H., Øverland, M. (2021) Insects in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diets – comparison between full-fat, defatted, and de-chitinised meals, and oil and exoskeleton fractions. *Journal of Insects as Food and Feed*. DOI: [10.3920/jiff2021.0094](https://doi.org/10.3920/jiff2021.0094)





© Copyright 2023 by the authors. This is an open access article under the terms and conditions of the Creative Commons attribution ([CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)) license 4.0.



Irodalmi áttekintés

A nyulak kokcidióziisa

DEMETER Csongor¹, NÉMET Zoltán László^{2*}, DEMETER-JEREMIÁS Anett³, GERENCSÉR Zsolt¹ , MAYER András¹, SÁNDOR Máté³, MATICS Zsolt¹ 

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Kaposvári Campus, Állattenyésztési Tudományok Intézet, 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40

²Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék, Haszonállat Diagnosztikai Központ, 2225 Üllő, Dóra major

³S&K-Lap Kft, 2173 Kartal, Császár út 135.

ABSTRACT - Coccidiosis of rabbits - Review

Author: Csongor DEMETER¹, Zoltán László NÉMET^{2*}, Anett DEMETER-JEREMIÁS³, Zsolt GERENCSÉR¹, András MAYER¹, Máté SÁNDOR³, Zsolt MATICS¹

Affiliation: ¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Animal Sciences, Kaposvár Campus, H-7400 Kaposvár, Guba S. str. 40; ²University of Veterinary Medicine, Department of Pathology, Livestock Diagnostic Center, H-2225 Üllő, Dóra major; ³S&K-Lap Ltd, H-2173 Kartal, Császár str. 135.

The most common disease in growing rabbits is diarrhoea, in the development of which parasites can also play a role in addition to bacteria. Among endoparasites, Eimeria species responsible for coccidiosis are detected in most cases in the digestive system of rabbits. This review collects and discuss the scientific literature on different Eimeria species identified in rabbits, such as their life cycles and pathogeneity or their location in the different parts of the digestive system, and possible alternatives to prevention and treatment.

Keywords: coccidiosis, oocyst, Eimeria, rabbit

BEVEZETÉS

A korszerű, nagyüzemi nyúlhús termelés egyik fontos és kritikus eleme a modern tartástechnológia, amely az anyák és növendéknyulak igényeit minden tekintetben kielégíti. Európa nyúltenyésztéssel foglalkozó országaiban, így Magyarországon is több száz-, vagy több ezer anyás telepeken tartják a nyulakat, általában olasz, francia vagy spanyol, hazánkban legnagyobb arányban olasz ketrecekben (Szendrő, 2016). Sajnálatos módon, a mai korszerű tartástechnológiai, takarmányozási és higiéniai feltételek biztosítása mellett is hátráltathatják a termelést a nyulak emésztőszervi megbetegedései. Az Eimeria fajok gyakran előforduló paraziták a nyulak bélrendszerében, amelyek egyből

*CORRESPONDING AUTHOR

Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék, Haszonállat Diagnosztikai Központ

✉ 2225 Üllő, Dóra major., ☎ +36 (1) 478-4100

E-mail: nemet.zoltan@univet.hu

tünetek mellett hasmenést, súlyos esetekben pedig elhullást is okozhatnak (Sioutas és mtsai, 2021).

A nagyüzemekben tartott nyulak is komoly állategészségügyi kockázatnak vannak kitéve, hiszen hasonlóan más gazdasági állatfajokhoz megtámadhatják őket vírusok (Myxomatózis és a nyulak vérzéses betegsége (RHD)), légzőszervekre is veszélyes baktériumok (*Pasteurella multocida*, *Bordetella bronchiseptica*, *Staphylococcus sp.*), emésztőrendszert is támadó baktériumok (*Clostridiumok*, *Escherichia coli*), gombák (*Dermatophytosis*, *Saccharomycosis*) és paraziták (Eimeria fajok, férgek, *Encephalitozoon cuniculi*, tetvesség, rühösség).

A leggyakoribbak a gyomor-bélrendszeri problémák, hasmenést legtöbb esetben a fiatal nyulaknál észlelnek (*URL1*). Az emésztőszervi megbetegedések hátterében a baktériumok mellett jelentős százalékban a paraziták játszanak szerepet (Vetési, 1990). Ezen belül a nagyüzemben termelő házinyulak leggyakoribb endoparazitás fertőzöttsége a kokcidiózis, amelynek előidézésében több Eimeria faj játszik szerepet. Jelentőségére az intenzív nyúltenyésztés térhódítása hívta fel a figyelmet, de fontosságának megítélésében a szakemberek véleménye eltérő (Vetési, 1990).

Mind a klinikai, mind a szubklinikai kokcidiózis fertőzések jelentős gazdasági veszteségeket okozhatnak a nyúlfarmokon, úgy, mint emésztési rendellenességek, a táplálóanyagok rossz felszívódása, kiszáradás, hasmenés, súlycsökkenés, fokozott fogékonyság a bakteriális és vírusos fertőzésekre, és a jelentősen fertőzött állományokban nagy arányú elhullás (Pakandl, 2009).

Almozott tartás esetén, Jekkel és mtsai (2007) valamint Dal Bosco és mtsai (2002) szerint a nyulak fogyasztnak a vizelettel és bélsárral szennyezett alomanyagból, ezért nagyobb az emésztőszervi megbetegedések, elsősorban a kokcidiózissal történő fertőződés esélye. A fertőzés mindig jelen van a nyúlfarmokban, és gyakorlatilag lehetetlen megszüntetni (Van Craeynest és mtsai, 2008).

A nyúltenyésztésben az Eimeria fertőzés elleni védekezésben rendkívül fontosak a hatékony gyógyszerek és a higiéniai intézkedések helyes alkalmazása. Vereecken és mtsai (2012) szoros összefüggést figyeltek meg az Eimeria fertőzés, a higiénés állapot és a megelőző kezelések között. A legmagasabb morbiditási és mortalitás arány általában az elválasztott állatoknál figyelhető meg (El-Ashram és mtsai, 2020).

A magyarországi nagyüzemi vizsgálataink is alátámasztják a kutatók fenti állításait. A termelési eredmények és a bélsárban jelenlévő oociszták számának vizsgálata, valamint a fajok felismerése jelentős szerepet tölt be a jelen és a jövő tudatos, hatékony, precíziós nyúltenyésztésében.

Általános áttekintés a kokcidiumokról és a kokcidiózisról

A Coccidiomorpha, bélben élő spórás egysejtűek okozzák a háziállatok kokcidiózisait és számos más betegségét. Valamennyi háziállatnak és gazdasági állatnak van egy vagy több Coccidiomorpha parazitája. Az állatok kedvezőtlen tartási körülmények között (mint zsúfoltság, vagy bélsár szennyezés), sokkal nagyobb gyakorisággal fogyasztják el a fertőző oocisztákat mint a természetben, ezért a háziállatok, vagy gazdasági állatok körében gyakrabban fordulnak elő fatális kimenetelű fertőzések, mint a vadonélő rokonaiknál. Különösen a fiatal állatoknál jellemző a Coccidiomorpha okozta kórok elhullással járó lefolyása (Török, 2012).

A kokcidiózis a nagyüzemi baromfitermelésnek is világszerte jelenlévő problémája. A zárt rendszerű, intenzív baromfitermelés fejlődésével párhuzamosan e betegség gazdasági jelentősége is növekszik. A betegség szubklinikai formája jelentős hatást gyakorol a hústermelés céljából tartott madarak teljesítményére, továbbá káros hatással van az állományok homogenitására a tojók és tenyészcék esetében is. A nem megfelelően menedzselt kokcidiózis termelési eredményromlást és elhullásokat okozhat (McDougald és Fitz-Coy, 2013).

A bél kokcidiózisa világszerte gyakori nyúlbetegség (Varga, 1982). A nyúl, mint gazdasági állatfaj agrárgazdasági jelentőségében eltörpül világviszonylatban a monogasztrikus (sertés, baromfi), vagy akár a szarvasmarha ágazatok nagyságához képest. Ezzel párhuzamosan, a múltban és a jelenben is relatív kevés figyelmet fordítottak a nyúl állategészségügyi kutatásaira és ezen belül az egyik legnagyobb gazdasági kárt okozó fertőzésre, a kokcidiózisra. A fertőzöttségi szint és a jelen lévő fajok telepi ismerete pedig alapvető feltétele a gazdaságos termelésnek.

Levine (1973) leírása szerint Leeuwenhoek már 1674-ben megfigyelte a nyúlmájban lévő oocisztákat, vagyis az *Eimeria stiedai*-t, a nyulak máj- és bélkokcidiumainak megkülönböztetését pedig 1879-ben Leuckart írta le legelőször, *Coccidium oviforme* (mai nevén *Eimeria stiedai*; az epeér kokcidiózis kórokozója) és *Coccidium perforans* (mai napig is a perforans nevet alkalmazzuk a faj azonosításban) néven nevezte el őket.

A XX. század eleje óta számos neves kutató foglalkozott a nyúl kokcidióziséval és nyúl oociszták diagnosztikájával. Megfigyeléseik a bélrendszerben való elhelyezkedés mellett a morfológiai, a sporulációs és a prepatens időszak feltérképezésén túl a fajazonosításra is kiterjedtek. Közöttük magyar vonatkozásban főként Pellérdy L. és Vetési F., nemzetközi viszonylatban pedig Coudert, Norton, Gregory, Cheissin, Balicka-Ramis, Szkucik, Vancraeynest,

Yin és Chao Li említendők, akik tudományos tevékenységüket részben vagy egészben a nyúl parazitológiájának szentelték.

Coudert és *mtsai* (1995) és *Eckert* és *mtsai* 1995-ben már 11 *Eimeria* faj azonosítását és leírását végezték el. *Cui* és *mtsai* 2017-ben további 1 fajjal bővítették az *Eimeria* fajok listáját, ugyanis a filogenetikai analízisük kimutatta, hogy az új faj ITS-1 szekvenciája csak csekély hasonlóságot mutatott (27,1–30%) a nyúlnál korábban azonosított 11 *Eimeria* fajéval. Az új fajt Fanyao Kong kínai parazitológus tiszteletére *Eimeria kongi* n. sp.-nak nevezték el.

A nyulaknál ezidáig azonosított *Eimeria* fajok és azonosításuk időpontja:

<i>E. stiedai</i>	1865-1907
<i>E. perforans</i>	1879-1912
<i>E. magna</i>	1925
<i>E. media</i>	1929
<i>E. irresidua</i>	1931
<i>E. exigua</i>	1934
<i>E. piriformis</i>	1934
<i>E. flavescens</i>	1941
<i>E. coecicola</i>	1947
<i>E. intestinalis</i>	1948
<i>E. vejnovskyi</i>	1988
<i>E. kongi</i>	2017

A jelenleg ismert fajok mellett felmerült további *Eimeria* fajok jelenléte is, úgy mint az *E. neoleporist*, az *E. nagpurensis*, az *E. oryctolagi*, vagy az *E. matsubayashi*, azóta azonban kimutatták, hogy ezek a fajok megegyeznek korábban már azonosított fajokkal.

Bélszakaszok szerinti elhelyezkedés

A nyúl *Eimeria* oocisztái az emésztőrendszer különböző, jól lokalizált részein, valamint a nyálkahártya különböző mélységeiben találhatóak. A kifejlődés sok esetben átfedést és hasonlóságot mutat, de ennek ellenére elmondható, hogy bizonyos fajok többnyire egyes speciális bélszakaszokban élnek (1. táblázat).

Kokcidiumok életciklusa

Az *Eimeria* fajok a gazdaállat bélcsatornájának különböző szakaszaiban, ezen belül pedig a nyálkahártya hámsejtjeiben élőködnek. A nyúl és a lúd esetében vannak kivételek: az *E. stiedai* a nyúl epeér falának a hámjában (*Pakandl*, 2009), az *E. truncata* pedig a lúd vesecsatornájának hámjában szaporodik (*Entzeroth* és *mtsai*, 1981).

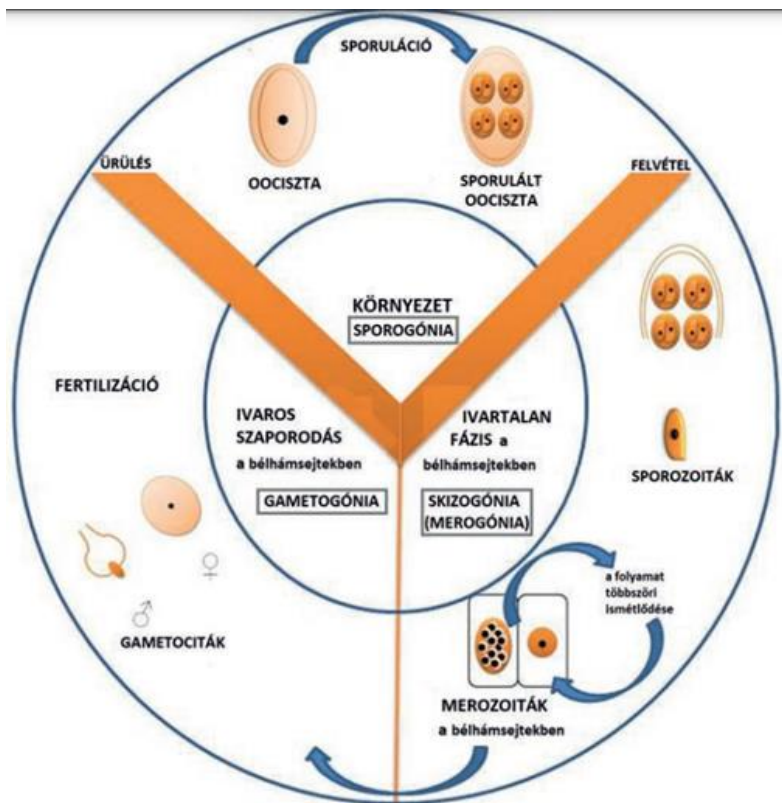
1. táblázat

Az egyes Eimeria fajok bélszakaszok szerinti elhelyezkedése

Eimeria faj	Elhelyezkedés	Forrás
<i>E. coecicola</i>	vakbél féreg nyúlványában	<i>Pakandl és mtsai, 1993, 1996a</i>
<i>E. exigua</i>	paktóbélben, csípőbélben	<i>Jelíneková és mtsai, 2008</i>
<i>E. flavescens</i>	vékonybélben, vakbélben	<i>Norton és mtsai, 1979</i> <i>Gregory és Catchpole, 1986</i> <i>Pakandl és mtsai, 2003</i>
<i>E. intestinalis</i>	csípőbélben, éhbélben	<i>Licois és mtsai, 1992</i>
<i>E. irresidua</i>	csípőbélben, éhbélben	<i>Norton és mtsai, 1979</i>
<i>E. magna</i>	csípőbélben, éhbélben	<i>Ryley és Robinson, 1976</i>
<i>E. media</i>	éhbélben, patkóbélben	<i>Pakandl és mtsai, 1996b</i>
<i>E. perforans</i>	csípőbélben, éhbélben	<i>Streun és mtsai, 1979</i>
<i>E. piriformis</i>	vastagbélben	<i>Pakandl és Jelíneková, 2006</i>
<i>E. vej dovskyi</i>	csípőbélben	<i>Pakandl és Coudert, 1999</i>
<i>E. stiedai</i>	máj hámszövetében	<i>Pellérdy és Dürr, 1970</i>

Az Eimeria fajok életciklusa nagyjából hasonló, a különbségek az aszexuális (ivartalan) nemzedékek számában, továbbá az egyes fejlődési stádiumok létrejöttéhez szükséges időben vannak (*Pellérdy, 1974; McDougald és Fitz-Coy, 2013*). A cikluson belül három fő fázist lehet megkülönböztetni (1. ábra): a környezetben zajló exogén stádium, az ún. sporogónia, valamint a gazdaszervezeten belül zajló endogén stádium, amelynek további két része a skizogónia (merogónia), mint aszexuális fázis és a gametogónia, mint ivaros fázis (*Horváth-Papp, 2008; McDougald és Fitz-Coy, 2013; Quiroz-Castaneda és Dantán-González, 2015; Ahmad és mtsai, 2016*).

A bélsárral ürülő sporulálatlan oociszták az ivaros fázis eredményeként jönnek létre. A sporuláció egy sejtosztódás (meiózis), amelynek következtében a zigótát tartalmazó oocisztában mozgásra és sejtekbe való behatolásra képes sporozoiták alakulnak ki. Ehhez optimális hőmérsékletre és páratartalomra, továbbá elegendő mennyiségű oxigénre van szükség. A sporulált oociszták e parazita fertőzőképes formái. Az átalakulási folyamat Eimeria fajokként hosszabb-rövidebb időt (2–4 napot) igényel. Az oociszták környezeti ellenálló képessége kiváló, és akár több mint 1 évig képesek túlélni a szárazságot és a hideget. A gazdatest száján át fertőződik a sporulált oocisztákkal. Majd az oociszta burka a gyomorban részben feloldódik, a benne található 4 sporocisztából a fertőzőképes sporozoiták kiszabadulnak. Minden oocisztából 8 sporozita szabadul ki. A kiszabadult sporozoiták a bél nyálkahártyáján keresztül a sejtekbe hatolnak, ahol megkezdik a sejten belüli aszexuális fejlődési szakaszukat (*McDougald és Fitz-Coy, 2013; Ahmad és mtsai, 2016*).



1. ábra. Az Eimeria fajok fejlődési ciklusa (Ahmad és mtsai, 2016 nyomán)

A skizonták az ivartalan szaporodási szakasz első lépése, amelynek következtében sok utódsejtre hasadó, óriási sejtek jönnek létre (David, 1998). Az első generációs skizonták nagyszámú ún. második invazív állapotú, merozoitát termelnek, hogy azok átjutva más bélsejtekbe, a skizonták következő generációját képezzék. A merozoiták tehát megfertőzik a bél nyálkahártya más sejtjeit is (URL2). Egy idő után tömegük megrepeszti a fertőzött sejtet, ami természetesen elpusztul. A kiszabadult fejlődési alakok ismét – többször – újabb hámszövetekbe hatolva sokszorozódnak és újabb sejteket pusztítanak el (URL3). Ez a folyamat legalább kétszer, de előfordulhat, hogy négyszer is ismétlődik. Az aszexuális megsokszorozódás és növekedés mértéke arányos a mennyiséggel, azaz exponenciálisan növekvő számú utódsejthez vezet. Végül ivaros formát (gametocita) képeznek, amelyek egyesülnek, és zigótát alkotva hozzák létre az

oocisztákat. Ez a szexuális szakasz, amelyben az apró, mozgékony mikrogaméták (hímivarsejtek) keresik fel a makrogamétákat (női ivarsejteket) és egyesülnek azokkal. A folyamat eredménye a zigóta, amely egy nem sporulált oocisztává érik, és a bél nyálkahártyáján átjutva a bélsárba kerül. A nem sporulált oociszták több napon keresztül is ürülhetnek. Ezzel a folyamatos körforgással növekszik a környezetben az oociszták száma (Horváth-Papp, 2008; McDougald és Fitz-Coy, 2013).

Patogenitás

Coudert és mtsai (1993) SPF nyulakon végzett kísérletek alapján, a kokcidiумokat patogenitásuk szerint öt csoportba sorolták:

- nem patogén (*E. coecicola*);
- enyhén patogén (*E. perforans*, *E. exigua* és *E. vejdotszkyi*);
- enyhén patogén vagy patogén (*E. media*, *E. magna*, *E. piriformis* és *E. irresidua*);
- magas patogenitású (*E. intestinalis* és *E. flavescens*);
- „fertőző dózistól függő patogenitású” (*E. stiedai*).

A kórszövettani leletek azonban nem minden esetben korrelálnak a meghatározott patogenitással, a mortalitással vagy a testtömeg-gyarapodás változásával. Például, az *E. coecicola* súlyos elváltozásokat okoz a vakbélben (Vítovéc és Pakandl, 1989), de az egész szervezetre gyakorolt hatása alapján, nem tekinthető patogénnek.

Összefüggéseket találhatunk a patogenitás és a kokcidiумok elhelyezkedése között. A legmagasabb patogenitással rendelkező nyúl kokcidiумok, az *E. intestinalis* és *E. flavescens*, a vékonybél vagy a vakbél kripta sejtjeit fertőzik (Norton és mtsai, 1979; Licois és mtsai, 1992; Pakandl és mtsai, 2003). Gregory és Catchpole (1986) úgy vélik, hogy az a folyamat, amikor az *E. flavescens* elpusztítja a kripta sejtjeit, döntő tényező a megbetegedés súlyosságában. A Coudert és munkatársai (1995) szerint patogénnek osztályozott *E. irresidua*, *E. magna* és *E. piriformis* endogén fejlődése, legalábbis az utolsó merogónia és gametogónia szakaszban a kripta sejtjeiben történik meg, az enyhén vagy nem patogén fajok (az *E. perforans* kivételével, amely kriptákban és bolyhokban egyaránt fejlődik) a bélbolyhokban élőködnek.

A bél kokcidiумjai többé-kevésbé súlyos megbetegedést okozhatnak nyulakban, elsősorban a fertőző dózistól, a parazita fajoktól, az állatok immunállapotától és életkorától függően. A bél kokcidiózisának jellegzetes tünetei a has-

menés, a táplálékfelvétel és bélsár ürítés csökkenése, a fogyás és súlyos esetben az elhullás. A kokcidiózis általában nem okoz kiszáradást, de befolyásolja az ionanyagcserét, valamint a hasmenés által gyorsan és nagy mennyiségben ürülő bélsár káliumvesztéséhez, hypokalaemiához vezet a vérplazmában (*Licois és mtsai, 1978a,b; Peeters és mtsai, 1984*).

A két leginkább patogén nyúl kokcidium faj által okozott patomorfológiai elváltozásokról kísérleti eredmények is rendelkezésre állnak. *Peeters és mtsai (1984)* *E. intestinalis* fertőzés után súlyos bélboly atrófiát figyeltek meg a 7. és 10. nap között. A bélbolyok megduzzadtak, a hámsejtek többnyire leváltak, és a mikrovillusok szabálytalanná váltak, megvastagodtak. Amint azonban a parazita fejlődése majdnem befejeződött, azaz körülbelül a 12. nap körül, a nyálkahártya visszanyerte a normális morfológiai mintázatot.

Látványos, de csak néhány napig tartó elváltozások többnyire a parazita fejlődésének gametogónia fázisában fordulnak elő. A kokcidiumok által okozott bélgyulladást gyakran kíséri az *E. coli* és a rotavírus számának jelentős növekedése a gazdaszervezet emésztőrendszerében (*Licois és Guillot, 1980; Peeters és mtsai, 1984*) és így a kórokozók közötti kölcsönhatás is egy fontos tényező lehet.

A kokcidiumokkal való megfertőződés és annak súlyossága életkorfüggő, a 20 naposnál fiatalabb nyulak általában nem fertőződnek meg kokcidiumokkal (*Pakandl és Hlásková, 2007*). *Dürr és Pellérdy (1969)* meg tudták fertőzni a szopós nyulakat az első és a kilencedik életnap között, de ehhez nagyon nagy számú májkokcidiumot alkalmaztak, ennek ellenére az oociszta ürítés nagyon alacsony volt.

Pakandl és Hlásková (2007) kimutatták, hogy az *E. intestinalis* és az *E. flavescens*-fajokkal fertőződött szopósnyulak oociszta ürítése az állatok életkorával nőtt. Nagy különbséget figyeltek meg a 19 és 22 napos korban fertőződött nyulak között. Ebben a korban a szopósnyulak a tej mellett általában már szilárd takarmányt is fogyasztanak, ami jelentős emésztésélettani változásokhoz vezet.

Immunitás

Az immunrendszer a születéstől felnőtt korig folyamatosan fejlődik. A vakbél döntő szerepet játszik az immunrendszerben. *Renaux és munkatársai (2003)* különböző immunológiai paramétereket vizsgáltak nyulakon, és arra a következtetésre jutottak, hogy a fertőzés elleni védelem a hatékony nyálkahártya-immunválasznak köszönhető, míg a szisztémás válaszok csak az egymást követő fertőzések után növekednek és csak a parazita antigénekkal való ismételt találkozások következményei.

Pakandl és munkatársai (2008) összehasonlító vizsgálatot végeztek fertőzés által kiváltott immunválaszról az erősen immunogén *E. intestinalis* és gyengén immunogén *E. flavescens* kokcidiumokkal. Az egyetlen látható különbség az immunválaszokban az ún. CD8+ sejtek százalékos arányának markáns növekedése volt az ileum epitheliumban, amely az *E. intestinalis* specifikus helye. Az *E. flavescens* fajjal történt fertőzés után nem észleltek jelentős változásokat a vakbélben. Ezek az eredmények a helyi immunválasz fontosságára utalnak.

Higiénia, fertőtlenítés

A környezetben a kokcidiumok dekontaminálása kihívást jelent, ezért a prevenció kiemelten nagy jelentőségű (*URL4*). A sporulált oociszták – hasonlóan a spórás baktériumokhoz – vastag burokkal körülvett, rendkívül stabil, hosszú ideig (hónapokig) túlélő, környezeti hatásoknak, szokványos tisztításnak és sok fertőtlenítő szernek ellenálló sejtek. A 60°C feletti hőmérséklet elpusztíthatja őket, tehát alapos takarítás után a forrásban levő víz vagy lúg alkalmazásával kell fertőtleníteni (*URL5*). Hatékony elpusztításukhoz az épületek és berendezések gondos takarításán kívül speciális, ún. oocid fertőtlenítőszerre van szükség (*URL6*). Sajnos manapság már több, közönséges fertőtlenítő szerrel szemben tapasztalható rezisztencia az *Eimeria* fajok esetében is (*McDougald és Fitz-Coy, 2013*).

A nagyüzemi nyúltelepeken az oociszták gyérítése céljából jelenleg alkalmazott fertőtlenítőszernek a következők: GERMICIDAN® KOK, GERMICIDAN® KOK Forte, AGAKOK 2.5, ALDECOC ® CMK.

Minden fertőző megbetegedés esetén, így a kokcidiózisnál is első és legfontosabb a tisztítás és fertőtlenítés hatékony módon történő elvégzése, és az előkészített istállóknál a megfelelő hosszúságú üresen állási idő megléte (*Chapman, 2008; Hafez, 2008; Peek és Landman, 2011*).

A kokcidiózis inkább a környezetben történő feldúsulás miatt jelent nagyobb gondot, nem pedig valamilyen ökológiai niche megürülése miatt. A nagyüzemi baromfityenyésztés gyakorlatára jellemző, hogy miközben elérjük számos kártékony parazita visszaszorítását, addig ezzel egy időben akaratlannul elősegítjük egyéb élősködők térhez jutását – hiszen ezek között a paraziták között is versengés zajlik a mind nagyobb életterek elnyeréséért (*McDougald és Fitz-Coy, 2013*).

A gyakorlatban szinte lehetetlen eltávolítani az összes oocisztát, de számuk jelentős csökkenése a környezetben csökkentheti a fertőzés dóziséját és ezáltal

a betegség klinikai tüneteit. Nyúl esetében a kis dózisokkal történő napi fertőzés a legjobb módja annak, hogy akár jelentős immunitás alakuljon ki a nyulak szervezetében.

Gyógykezelés - Takarmányozás

Több mint 50 éven keresztül a kokcidiózis elleni védekezés a folyamatosan fejlesztett újabb és újabb gyógyszereken alapult. A kokcidiosztatikumok alkalmazása során előnyös tulajdonságaik mellett azonban számos hátrányuk is kiderült. Baromfinál az új szerek alkalmazása esetén egyre rövidebb idő alatt jelennek meg rezisztens *Eimeria* törzsek (*URL7*).

A nyúl esetében viszonylag szűk a választható antimikrobiális készítmények listája, így a rotálására is szűkebb lehetőségek állnak rendelkezésre. Az Európai Unióban takarmányba kevert ionoforok csak baromfi kokcidiosztatikumként és hisztomonosztatikumként használhatók, nyúlnál viszont nem. A tagállamokban – a korábbi gyakorlattól eltérően – 2006. január 1. után a kérődzők, a sertés és a nyúl ionofor hatóanyagot tartalmazó takarmánnyal nem etethetők. Az ionoforokra, vagy a takarmány ionofor szennyezésére különösen érzékeny fajok közé tartozik a nyúl is (saját gyűjtés, 2022).

A gyakorlatban 3 antikokcidiális gyógyszert használtak nyulakban, ezek a szalinomicin, a robenidin és 2008 vége óta a diklazuril, ami a nyulak takarmány-adalékanyagaként engedélyezett Franciaországban, Olaszországban és Spanyolországban (*Pakandl, 2009*).

Vanparijs és *mtsai* (1989a,b) által végzett kutatások hatékonynak ítélték meg a diklazuril használatát takarmányadalékként, ahogyan *Coudert* (1978) is pozitív eredményekről számolt be a robenidinnel végzett kutatásai során. *Coudert* (1981) és *Varga* (1982) egyaránt igazolta a szalinomicin-nátrium hatékonyságát.

Gyógykezelés - Itatás

A nyulak ivóvizében, gyógykezelési céllal három terméket alkalmaznak jelenleg a hazai nagyüzemek: Baycox (Toltrazuril), szulfanomid (antibiotikum) és amprolium.

A Baycox egy parazitaellenes készítmény, amely megzavarja a parazitáknak az energia előállításához szükséges enzimeit. Ennek következtében fejlődésük valamennyi szakaszában képes elpusztítani a parazitákat, valamint képes megelőzni a kokcidiózist és a fertőzés terjedését. A Baycox a kokcidiumok összes intracellurális fejlődési alakjára hat, így a skizonták és gamonták proliferáló

alakjaira is. *Vanparijs* és *mtsai* (1989) szerint a termék hatékonyan alkalmazható a nyúltenyésztésben és csökkenti az oociszták számát.

Az amprolium egy tiamin analóg, amely kompetitív módon gátolja a tiamin aktív transzportját, negatívan befolyásolva az *Eimeria* fajokat anélkül, hogy károsítaná a gazdaszervezet szöveteit (*McDougald* és *Reid*, 1997). *Fitzgerald* (1972) és *Joyner* és *mtsai* (1983) kevésbé hatékonynak értékelték az amprolium alkalmazását.

A szulfonamid antibiotikumok hatásosnak bizonyultak a kokcidiózis kezelésére. Ezek csak a betegség gyógyítására használhatóak, megelőző intézkedésként nem. A termék hatékonyságát több kutató igazolta (*Coudert*, 1981; *Daněk* és *mtsai*, 1978; *Joyner* és *mtsai*, 1983). Saját integrációnkban elvégzett kezeléseink eredménye is pozitív hatást mutatott és radikálisan csökkentette az oociszták számát.

Vakcinázás

A jövő nagy kihívása, hogy – hasonlóan a baromfifajokhoz (*Williams*, 2006) – a nyúl kokcidiumokban is rezisztencia alakulhat vagy alakult már ki az antikokcidiális szerekkel szemben, ezért felmerül nyúl esetében is a vakcinázás lehetőségére. Az élő, legyengített kokcidium vonalakkal történő vakcinázás egy lehetséges módszer a kokcidiózis kontrolljára. A nagyüzemi baromfi esetében ez már egy gyakorlatban is alkalmazott lehetőség. Például a LIVACOX T 300-500 oocisztát tartalmaz az *E. acervulina*, *E. maxima* és *E. tenella* fajokból, a Paracox-5 vakcina minden adagja 500-650 *E. acervulina*, 200-260 *E. maxima* CP, 100-130 *E. maxima* MFP, 1000-1300 *E. mitis* és 500-650 *E. tenella* sporulált oocisztát tartalmaz.

A nyúl esetében is kutatták a vakcinázás lehetőségét. Az oltási kísérleteket *Drouet-Viard* és *mtsai* (1997a,b) *E. magna* vonallal végezték. Rámutattak, hogy a teljes immunitás nagyon gyorsan, akár a parazitával való első érintkezés után 9 nappal megszerezhető. A 25 napos korig elvégzett vakcinázás elegendő időt biztosított a szopósnyulaknak arra, hogy elválasztás idejére megfelelő immunitást alakítsanak ki. A vakcinázás azonban a fejlesztés magas költségei miatt sajnos egyelőre nem jelent meg a nagyüzemi nyúltenyésztés gyakorlatában.

KÖVETKEZTETÉSEK

A parazitológiai monitoring vizsgálat elengedhetetlen a nyúltelepeken, hiszen az oociszták egyértelműen igazoltan jelen vannak a nagyüzemi gazdaságokban. A hazai, nagyüzemi farmokról származó bélsármintákból szükséges elvégezni az oociszták mennyiségi vizsgálatát, azonosítását, mérettartományainak,

sporulációinak megfigyelését és más kutatók által leírtakkal való összehasonlítását.

A vizsgálatok kivitelezését a gyorsabb és hatékonyabb prevenció miatt termelésközelivé szükséges tenni, hogy a farmokon akár napi rendszerességgel is nyomon tudják követni az oociszták számának alakulását, az oociszták sporulátását követően pedig a fajok azonosítását.

A gyógyszerhasználat csökkentésére irányuló intézkedések és a bélsárból kimutatható oociszták relatív nagyarányú jelenléte alapján, nyitottnak kell lennünk új természetes, kokcidiosztatikumként használható takarmánykiegészítők kipróbálására és vizsgálnunk szükséges azok hatékonyságát és telepi felhasználásának lehetőségeit.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmad, T. A. – El-Sayed, B. A. – El-Sayed, L. H. 2016. Development of immunization trials against *Eimeria* spp. *Trials Vaccinol.*, 5: 38–47. DOI: [10.1016/j.trivac.2016.02.001](https://doi.org/10.1016/j.trivac.2016.02.001)
- Carvalho J.C. 1942. *Eimeria neoleporis* n. sp. occurring naturally in the cottontail and transmissible to the tame rabbit. *Iowa State DOI: 10.31274/rtd-180813-14738*
- Chapman, H. D. 2008. Coccidiosis in the turkey. *Avian Pathol.*, 37: 205–223. DOI: [10.1080/03079450802050689](https://doi.org/10.1080/03079450802050689)
- Coudert P. 1978. Evaluation comparative de l'efficacité de 10 médicaments contre 2 coccidioses graves du lapin. *Journées de la Recherche Cunicole*, Toulouse, April 1978. Comm. No. 31.
- Coudert P. 1981. Chemoprophylaxe von Darm- und Gallen gangkokcidiosen beim Kaninchen. 4. Tagung der Fachgruppe Kleintierkrankheiten in Verbindung mit dem Institut für Kleintierzucht der Fal und der Deutschen Gruppe der WRSA, Celle, 18.–20. June 1981, pp. 106–121.
- Coudert P., Licois D., Drouet-Viard F. 1995. *Eimeria* species and strains of the rabbits. In: J. Eckert, R. Braun, M.W. Shirley and P. Coudert (Eds.), *Guidelines on techniques in coccidiosis research*. European Commission, Directorate-General XII, Science, Research and Development Environment Research Programme, pp. 52–73.
- Coudert P., Licois D., Provôt F., Drouet-Viard F. 1993. *Eimeria* sp. from rabbit (*Oryctolagus cuniculus*): pathogenicity and immunogenicity of *Eimeria intestinalis*. *Parasitol. Res.* 79: 186–190. DOI: [10.1007/bf00931890](https://doi.org/10.1007/bf00931890)
- Cui P., Liuc H., Fang S., Gu X., Wanga P., Liu C., Tao G., Liu X., Suo X. 1997. A new species of *Eimeria* (*Apicomplexa: Eimeriidae*) from Californian rabbits in Hebei Province, China Volume 66 (5): 677–680. DOI: [10.1016/j.parint.2017.06.009](https://doi.org/10.1016/j.parint.2017.06.009)
- Dal Bosco A., Castellini C., Mugnai D. 2002. Rearing rabbits on a wire net floor or straw litter: behaviour, growth and meat quality traits. *Livestock Production Science*, 75: 149–156. DOI: [10.1016/s0301-6226\(01\)00307-4](https://doi.org/10.1016/s0301-6226(01)00307-4)
- Daněk J., Ševčík B., Štrosová Z., Firmanová A., Vyhňálek J. 1978. The use of Sulfakombin in suppression of rabbit coccidiosis. *Biol. Chem. Vet.* 24: 151–169.
- David A. Stevens 1998. *Encyclopedia of Immunology* (Second Edition), 1998
- Drouet-Viard F., Coudert P., Licois D., Boivin M. 1997a. Acquired protection of the rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) against coccidiosis using a precocious line of *Eimeria magna*, effect of vaccine dose and age at vaccination. *Vet. Parasitol.* 69: 197–201. DOI: [10.1016/S0304-4017\(96\)01133-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)01133-8)

- Drouet-Viard F., Coudert P., Licois D., Boivin M. 1997b. Vaccination against *Eimeria magna* coccidiosis using spray dispersion of precocious line oocysts in the nest box. *Vet. Parasitol.* 70: 61–66. DOI: [10.1016/s0304-4017\(96\)01134-x](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(96)01134-x)
- Dürr U., Pellérdy L. 1969. The susceptibility of suckling rabbits to infection with coccidia. *Acta Vet. Acad. Sci. Hung.* 19: 453–462.
- Eckert, J., Taylor, M., Catchpole, J., Licois, D., Coudert, P., Bucklar, H., 1995. Morphological characteristics of oocysts, in: European Cooperation in the field of Scientific and Technical Research (COST). European Commission, Luxembourg, Report 89/820: Biotechnology—Guidelines on techniques in coccidiosis research, pp. 103–119.
- El-Ashram S. – Aboelhadid S.M. – Abdel-Kafy E.M. – Hashem S.A. – Mahrous L.N. – Farghly E.M. – Kamel A.A. (2020): Investigation of pre- and post-weaning mortalities in rabbits bred in Egypt, with reference to parasitic and bacterial causes. *Animals*, 2020, 10, 537. DOI: [10.3390/ani10030537](https://doi.org/10.3390/ani10030537)
- Entzeroth, R., Scholtyssek, E. & Sezen, I.Y. 1981. Fine structural study of *Eimeria truncata* from the domestic goose (*Anser anser dom.*). *Z. Parasitenkd.* 66: 1–7. DOI: [10.1007/BF00941939](https://doi.org/10.1007/BF00941939)
- Fitzgerald P.R. 1972. Efficacy of monensin or amprolium 1972 in the prevention of hepatic coccidiosis in rabbits. *J. Protozool.* 19: 332–334. DOI: [10.1111/j.1550-7408.1972.tb03469.x](https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1972.tb03469.x)
- Gregory M.W., Catchpole J. 1986. Coccidiosis in rabbits: the pathology of *Eimeria flavescens* infection. *Int. J. Parasitol.* 16:131–145. DOI: [10.1016/0020-7519\(86\)90098-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(86)90098-6)
- Hafez, H. M. 2008. Poultry coccidiosis: prevention and control approaches. *Arch. Geflügelk.*, 72: 2–7.
- Horváth-Papp I. 2008. Practical guide to broiler health management. Betűvető Ltd. Budapest, Magyarország, 259–283.
- Jekkel G., Milisits G., Nagy I. 2007. Effects of floor type and stocking density on the behaviour modes of growing rabbits. *Agriculture*, 13: 150–154.
- Jelínková A., Licois D., Pakandl M. 2008. The endogenous development of the rabbit coccidium *Eimeria exigua* Yakimoff, 1934. *Vet Parasitol.* 156(3-4): 168–72. DOI: [10.1016/j.vetpar.2008.06.008](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.06.008)
- Joyner L.P., Catchpole J., Berret S. 1983. *Eimeria stiedai* in rabbits: the demonstration of responses to chemotherapy. *Res. Vet. Sci.* 34: 64–67. DOI: [10.1016/s0034-5288\(18\)32285-9](https://doi.org/10.1016/s0034-5288(18)32285-9)
- Levine N.D. 1973. Introduction, history and taxonomy. In: D.M. Hammond and P.L. Long (Eds.), *The Coccidia*. University Park Press, Baltimore, pp. 1–22.
- Licois D., Coudert P., Mongin P. 1978a. Changes in hydromineral metabolism in diarrhoeic rabbits. 1. A study of the changes in water metabolism. *Ann Rech Vet.* 9(1): 1–10.
- Licois D., Coudert P., Mongin P. 1978b. Changes in hydromineral metabolism in diarrhoeic rabbits. 2. Study of the modifications of electrolyte metabolism. *Ann Rech Vet.* 9(3): 453–64.
- Licois D., Coudert P., Bahagia S., Rossi G.L. 1992. Characterisation of *Eimeria* species in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*): endogenous development of *Eimeria intestinalis* Cheissin, 1948. *J. Parasitol.* 78: 1041–1046. DOI: [10.2307/3283227](https://doi.org/10.2307/3283227)
- Licois D., Guillot J.F. 1980. Évolution de nombre de colibacilles chez les lapereaux atteints de coccidiose intestinale. *Rec. Med. Vét.* 156: 555–560.
- McDougald L.R., Fitz-Coy S. H. 2013. Coccidiosis. In: Swayne, D. E. (ed.): *Diseases of Poultry*, 13th ed. Wiley-Blackwell Publishing, Ames, USA, 1148–1166.
- McDougald L.R., Reid W.M. 1997. *Coccidiosis Diseases of Poultry*, Ames Publishing, Iowa State University Press, IA, USA
- Norton C.C., Catchpole J., Joyner L.P. 1979. Redescriptions of *Eimeria irresidua* Kessel & Jankiewicz, 1931 and *E. flavescens* Marotel & Guilhon, 1941 from the domestic rabbit. *Parasitology*, 79: 231–248. DOI: [10.1017/s0031182000053312](https://doi.org/10.1017/s0031182000053312)
- Pakandl M. 2009. Coccidia of rabbit: a review. *Folia Parasitol.*, 56(3): 153–166. DOI: [10.14411/fp.2009.019](https://doi.org/10.14411/fp.2009.019)

- Pakandl M., Černík F., Coudert P. 2003. The rabbit coccidium *Eimeria flavescens* Marotel and Guilhon, 1941: an electron microscopic study of its life cycle. Parasitol. Res. 91: 304–311. DOI: [10.1007/s00436-003-0946-y](https://doi.org/10.1007/s00436-003-0946-y)
- Pakandl M., Coudert P. 1999. Life cycle of *Eimeria vejvodskyi*. Parasitol. Res. 85(10): 850–854. DOI: [10.1007/s004360050644](https://doi.org/10.1007/s004360050644)
- Pakandl M., Coudert P., Licois D. 1993. Migration of sporozoites and merogony of *Eimeria coecicola* in the gut-associated lymphoid tissue. Parasitol. Res. 79: 593–598. DOI: [10.1007/bf00932244](https://doi.org/10.1007/bf00932244)
- Pakandl M., Eid Ahmed N., Licois D., Coudert P. 1996a. *Eimeria magna* Pérard, 1925: life cycle studies with parental and precocious strains. Vet. Parasitol. 65: 213–222. DOI: [10.1016/S0304-4017\(96\)00975-2](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(96)00975-2)
- Pakandl M., Gaca K., Licois D., Coudert P. 1996b. *Eimeria media* Kessel 1929: comparative study of endogenous development between precocious and parental strains. Vet. Res. 27(4-5): 465–472.
- Pakandl M., Hlášková L. 2007. The reproduction of *Eimeria flavescens* and *Eimeria intestinalis* in suckling rabbits. Parasitol. Res. 101: 1435–1437. DOI: [10.1007/s00436-007-0646-0](https://doi.org/10.1007/s00436-007-0646-0)
- Pakandl M., Hlášková L., Poplštejn M., Chromá V., Vodička T., Salát J., Mucksová J. 2008. Dependence of the immune response to coccidiosis on the age of rabbit suckling. Parasitol. Res. 103: 1265–1271. DOI: [10.1007/s00436-008-1123-0](https://doi.org/10.1007/s00436-008-1123-0)
- Pakandl M., Jelínková A. 2006. The rabbit coccidium *Eimeria piriformis*: selection of a precocious line and life-cycle study. Vet. Parasitol. 137: 351–354. DOI: [10.1007/s00436-008-1123-0](https://doi.org/10.1007/s00436-008-1123-0)
- Peek, H. W., Landman, W. J. M. 2011. Coccidiosis in poultry: Anticoccidial products, vaccines and other prevention strategies. Vet. Quart., 31: 143–161. DOI: [10.1080/01652176.2011.605247](https://doi.org/10.1080/01652176.2011.605247)
- Peeters J. E., Pohl P., Charlier G. 1984. Infectious agents associated with diarrhoea in commercial rabbits: a field study. Ann. Rech. Vét. 15, 335–340.
- Pellérdy L.P. 1974. Coccidia and Coccidiosis. Akadémiai Kiadó, Budapest, 959 pp.
- Pellérdy L.P., Dürr U. 1970. Zum endogenen Entwicklungszyklus von *Eimeria stiedai* (Lindemann, 1865) Kisskalt, Hartman 1907. Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 20: 227–244.
- Quiroz-Castañeda, R. E., Dantán-González, E. 2015. Control of Avian Coccidiosis: Future and Present Natural Alternatives. BioMed Res. Int., 1–11. DOI: [10.1155/2015/430610](https://doi.org/10.1155/2015/430610)
- Renaux S., Quéré P., Buzoni-Gatel D., Sewald B., Le Vern Y., Coudert P., Drouet-Viard F. 2003. Dynamics and responsiveness of T-lymphocytes in secondary lymphoid organs of rabbits developing immunity to *Eimeria intestinalis*. Vet. Parasitol. 110: 181–195. DOI: [10.1016/s0304-4017\(02\)00305-9](https://doi.org/10.1016/s0304-4017(02)00305-9)
- Ryley J.F., Robinson T.E. 1976. Life cycle studies with *Eimeria magna* Pérard, 1925. Z. Parasitenkd. 50: 257–275. DOI: [10.1007/bf02462971](https://doi.org/10.1007/bf02462971)
- Sioutas G., Evangelou K., Vlachavas A., Papadopoulos E. 2021. Deaths Due to Mixed Infections with *Pas-salurus ambiguus*, *Eimeria* spp. and *Cyniclomyces guttulatus* in an Industrial Rabbit Farm in Greece. Pathogens. 10(6): 756. DOI: [10.3390/pathogens10060756](https://doi.org/10.3390/pathogens10060756)
- Streun A., Coudert P., Rossi G.L. 1979. Characterization of *Eimeria* species. II. Sequential morphologic study of the dogenous cycle of *Eimeria perforans* (Leuckart, 1879; Sluiter and Swellengrebel, 1912) in experimentally infected rabbits. Z. Parasitenkd. 60: 37–53. DOI: [10.1007/bf00928970](https://doi.org/10.1007/bf00928970)
- Szendró Zs. 2016. A házinylül viselkedésével és jóllétével kapcsolatos kísérleti eredményeink. Hol érzi jól magát a nyúl? Kérdezzük meg a nyulakat is! Az MTA levelező tagjának székfoglaló előadása Török J. K. 2012. Bevezetés a protisztológiába. Eötvös Loránd Tudományegyetem
- Vanraeynest D., De Gussem M., Marien M., Maertens L. 2008. The anticoccidial efficacy of robenidine hydrochloride in *Eimeria* challenged rabbits. Pathology and hygiene, In proc.: 9th World Rabbit Congress, 10-13, June 2008, Verona, Italy, 1103-1106.
- Vanparijs O., Desplenter L., Marsboom R. 1989a. Efficacy of diclazuril in the control of intestinal coccidiosis in rabbits. Vet. Parasitol. 34: 185–190. DOI: [10.1016/0304-4017\(89\)90049-6](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90049-6)

- Vanparijs O., Hermans L., van der Flaes L., Marsboom R. 1989b. Efficacy of diclazuril in the prevention and cure of intestinal and hepatic coccidiosis in rabbits. *Vet. Parasitol.* 32: 109–117. DOI: [10.1016/0304-4017\(89\)90111-8](https://doi.org/10.1016/0304-4017(89)90111-8)
- Varga I. 1982. Large-scale management systems and parasite populations: coccidia in rabbits. *Vet. Parasitol.* 11(1):69-84. DOI: [10.1016/0304-4017\(82\)90122-4](https://doi.org/10.1016/0304-4017(82)90122-4)
- Vereecken M., Lavazza A., de Gussem K., Chiari M., Tittarelli C., Zuffellato A., Maertens L. 2012. Activity of diclazuril against coccidiosis in growing rabbits: Experimental and field experiences. *World Rabbit Sci.*, 20: 223-230. DOI: [10.4995/wrs.2012.1232](https://doi.org/10.4995/wrs.2012.1232)
- Vetési F. 1990. Házinyúl-egészségstan. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest. 208-215.
- Vítovec J., Pakandl M. 1989. The pathogenicity of rabbit coc The pathogenicity of rabbit coccidium *Eimeria coecicola* Cheissin, 1947. *Folia Parasitol.* 36: 289–293.
- Williams R. B. 2006. Tracing the emergence of drug-resistance in coccidia (*Eimeria* spp.) of commercial broiler flocks medicated with decoquinate for the first time in the United Kingdom. *Vet Parasitol.* 135(1):1-14. DOI: [10.1016/j.vetpar.2005.10.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.10.012)

URL1: [Link](#)

URL2: [Link](#)

URL3: [Link](#)

URL4: [Link](#)

URL5: [Link](#)

URL6: [Link](#)

URL7: [Link](#)



© Copyright 2023 by the authors. This is an open access article under the terms and conditions of the Creative Commons attribution ([CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)) license 4.0.



Article

Epidemiological tools to assess the spread of *Fascioloides magna*

Tibor HALÁSZ^{1,2}, Gábor NAGY^{2*}, Tamás TARI³, Erika CSÁNYI⁴,
Dávid VICZE⁴, Sándor NÉMETH⁴, Ágnes CSIVINCSIK²

¹SEFAG Forest Management and Wood Industry Share Co.,
Department of Game Management, Kaposvár, Hungary

²Hungarian University of Agriculture and Life Sciences Kaposvar Campus,
One Health Working Group, Kaposvár, Hungary

³University of Sopron, Faculty of Forestry, Institute of Wildlife Management and Wildlife Biology,
Sopron, Hungary

⁴'Fauna' South Transdanubian Hunting Party, Nagybjajom, Hungary

ABSTRACT – The giant liver fluke (*Fascioloides magna*) has four continuously expanding focus endemics in Europe. The parasite is considered an invasive species in our continent and could affect the local host populations or, after host switching, it can infect other potential host species. Therefore it is important to track this alien species' presence. The authors compared the gold standard test with the effectiveness of two potential screening tests, the conventional sedimentation method and an illustrated guideline-based approach, which could be applicable in the field. The gold standard test was based on the necropsy detection of adult flukes in the liver tissue of hunted animals (N=319). Besides applying the linear regression, the sensitivity and specificity were determined in both approaches. The analysis showed that the shed egg number was moderately associated with the fluke burden ($R^2=0.5679$; $p<0.0001$) and the flukes' dry mass ($R^2=0.6016$; $p<0.0001$). The final results of sensitivity (100%; CI95%: 97.2 – 100) and specificity (96.3%; CI95%: 92.5 – 98.5) confirmed that the illustrated guideline-based approach is a capable method for monitoring the *F. magna* expansion in endemic areas.

Keywords: *Fascioloides magna*, giant liver fluke, red deer, expansion, southwestern Hungary

INTRODUCTION

The European distribution of *F. magna* is well known. So far as we know, the presence of two independent phylogenetic lineages is verified, the Italian population and a second one containing the fluke populations of the other endemics, namely the Czech-Poland (CZ-PL) focus and the Danube floodplain forests (DFF). Although the giant liver fluke dispersion is well confirmed in CZ-PL and DFF foci, DFF seems to be the only continuously expanding focus in our continent (Králová-Hromadová et al., 2016). The characteristics of these abutting

*CORRESPONDING AUTHOR

Hungarian University of Agriculture and Life Sciences Kaposvar Campus, One Health Working Group

✉ H-7400 Kaposvár, Guba Sándor str. 40., ☎ 82/505-800; 82/505-900

E-mail: gabor.nagy.oh@gmail.com

habitats provide optimal conditions for intermediate and final hosts of the giant liver fluke as well (Malcicka, 2015).

The knowledge about the parasite expansion in Hungary is a bit incomplete because the first studies show the spread as a large-scale process. Studies conducted in DFF suggested the continuous spread of this parasite in the adjacent countries (Novobilský et al., 2007; Florijančić et al., 2010). The appearance of *F. magna* ensued at the beginning of the 1990s. The worm dispersion was verified after almost 15 years and approximately 300 km farther (Majoros and Sztojkov, 1994; Giczi, 2008). A subsequent study revealed that giant liver fluke reached the River Drava and moved towards the west and north within southwestern Transdanubia (Nagy et al. 2018).

The giant liver fluke is considered an invasive species in Europe. The parasite was transported via different deer species at least twice from the American continent (Králová-Hromadová et al., 2011). In the indirect life cycle *F. magna*, few hosts can be involved. The definitive hosts are usually deer species in Europe, mainly red deer (*Cervus elaphus*) and fallow deer (*Dama dama*), while the main intermediate hosts belong to the lymnaeid snails (Malcicka, 2015). Due to the quick expansion in our continent, the fluke appeared in new habitats, and its spread seems being continuous (Nagy et al. 2018). Introducing an emerging parasite into new geographic territories could affect the local host populations or, after host switching, it can infect other potential host species. Any situation can threaten the stability of the concerned host species and cause severe economic losses in wild and domesticated ungulates (Laaksonen et al., 2009; Lymbery et al., 2014; Sattmann et al. 2014). For this reason, it is important to systematically track this alien species' presence and range expansion (Hulme, 2014).

The Hungarian hunting regulation does not allow the continuous shooting of red deer. The hunting season lasts from the 1st of September to the end of the next February. Therefore the monitoring, based on necropsies, does not suit for continuous surveying. For this reason, this study aimed to compare the effectiveness of two different methods, which could be applicable all year round. We compared the conventional sedimentation method and an illustrated guideline-based approach to evaluate the *F. magna* infection in red deer populations living in Hungary's new Transdanubian endemic area.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Our study involved the investigation of red deer populations from southwestern Hungary between September 2020 and January 2021. The animals were

shot for hunting purposes, and none of them was killed for accomplishing the research.

Parasitological examination

The participant hunting estates covered about 768 km² area from Somogy County (*Figure 1*).

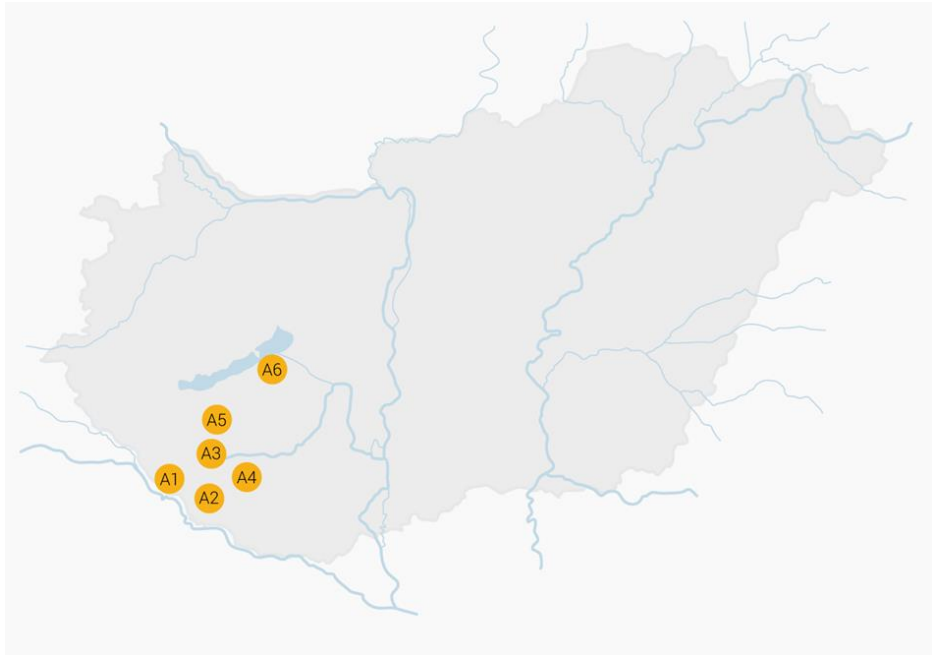


Figure 1. Location of sampling areas of the present study (Yellow circles named A1-A6 indicated the involved hunting areas.)

We involved areas where the worm's presence was not confirmed until the beginning of this study. For this reason, we prepared an illustrated guideline (IG) for hunters to confirm the presence of giant liver fluke infection (*Appendix 1*). Based on IG, after evisceration, the hunters identified the infected animals. Liver and fecal pellets were collected from every animal to confirm the sensitivity and specificity of IG and the conventional sedimentation method. The organs were cut into 1.5 cm slices, and after gentle washing, the collected *F. magna* specimens were counted (FM). Using the fecal material, we performed a sedimentation method to determine the egg number in one gram (EPG) faeces (*Zajac and Conboy, 2012*). The gathered worms were dried at 65°C until

constant weight and measured with 0.0001 g accuracy to determine the total dried fluke matter (TDFM).

Statistical analyses

We evaluated the associations between EPG and the other variables, viz. FM and TDFM. Linear regressions were performed using the SPSS statistical software version 27.0 after logarithmic transformation to stabilize the variance. In the case of FM and EPG, we added 1 to each count before taking the log10 transformation (Alexander, 2012). Only those deer samples were involved in the linear regression analyses, which were characterized by fluke burden after evaluating the surface of the organs (N=137; 45 stag and 92 hind samples).

The sensitivity, specificity, positive predictive value, negative predictive value, and accuracy (with 95% confidence interval; CI95%) of IG and fecala sedimentation methods were calculated using MedCalc online software version 20.110. (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php). Liver fluke detection by necropsy was considered a gold standard test. For determining true positives (TP), false positives (FP), true negatives (TN), and false negatives (FN), we followed the general epidemiological rules by Trevethan (2017). The method was presented in Table 1.

Table 1

Determination of true positives (TP), false positives (FP), true negatives (TN), and false negatives (FN)

	Gold standard test (necropsy) results	
	+	-
New screening test +	TP	FP
New screening test -	FN	TN

Sensitivity (SENS), specificity (SPEC), positive predictive value (PPV), and negative predictive value (NPV) were calculated by the following formulas (Trevethan, 2017):

$$SENS(\%) = \frac{TP}{TP + FN} \times 100$$

$$SPEC(\%) = \frac{TN}{TN + FP} \times 100$$

$$PPV(\%) = \frac{TP}{TP + FP} \times 100$$

$$NPV(\%) = \frac{TN}{TN + FN} \times 100$$

The test accuracy (ACC) viz overall probability that a new screening test result correctly demonstrates the gold standard test result was also calculated by the MedCalc online software version 20.110. as follows:

$$ACC(\%) = SENS \times prevalence + SPEC \times (1 - prevalence)$$

RESULTS

The regression analysis showed that the EPG was associated with both other variables, the FM and TDFM. The most definite relationship was observed between TDFM and EPG ($R^2=0.6016$; $p<0.0001$), while fluke burden showed a moderate connection with EPG ($R^2=0.5722$; $p<0.0001$) (*Figure 2*).

Using the IG, hunters confirmed the fluke presence in 137 animals, but after necropsies, flukes were collected only from 130 organs. We found eggs in 50 fecal materials from the 137 IG-confirmed animals during the sedimentation. The true and false positive and negative values used for sensitivity and specificity calculation showed in *Table 2*. The sensitivity, specificity and characteristics differed between the two methods (*Table 3*).

Table 2

The true positive (TP), false positive (FP), true negative (TN), and false negative (FN) values in IG (illustrated guideline) and sedimentation methods.

	Gold standard test (necropsy) results		Total
	+	-	
IG +	130 (TP)	7 (FP)	137
IG -	0 (FN)	182 (TN)	182
Sedimentation +	50 (TP)	0 (FP)	50
Sedimentation -	80 (FN)	189 (TN)	269
Total	130	189	319

Table 3.

Sensitivity (SENS), specificity (SPEC), positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), and accuracy (ACC) values for IG (illustrated guideline) and sedimentation methods (screening tests).

	IG test	Sedimentation test
SENS	100% (CI95%: 97.2 – 100)	38.5% (CI95%: 30.1 – 47.4)
SPEC	96.3% (CI95%: 92.5 – 98.5)	100% (CI95%: 98.1 – 100)
PPV	94.9% (CI95%: 90.0 – 97.5)	100%
NPV	100%	70.3% (CI95%: 67.3 – 73.0)
ACC	97.8% (CI95%: 95.5 – 99.1)	74.9% (CI95%: 69.8 – 79.6)

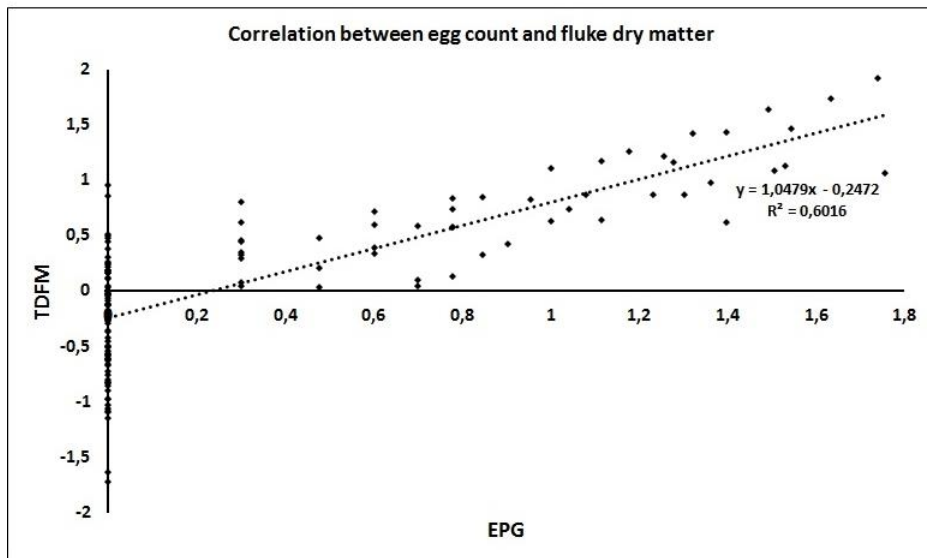
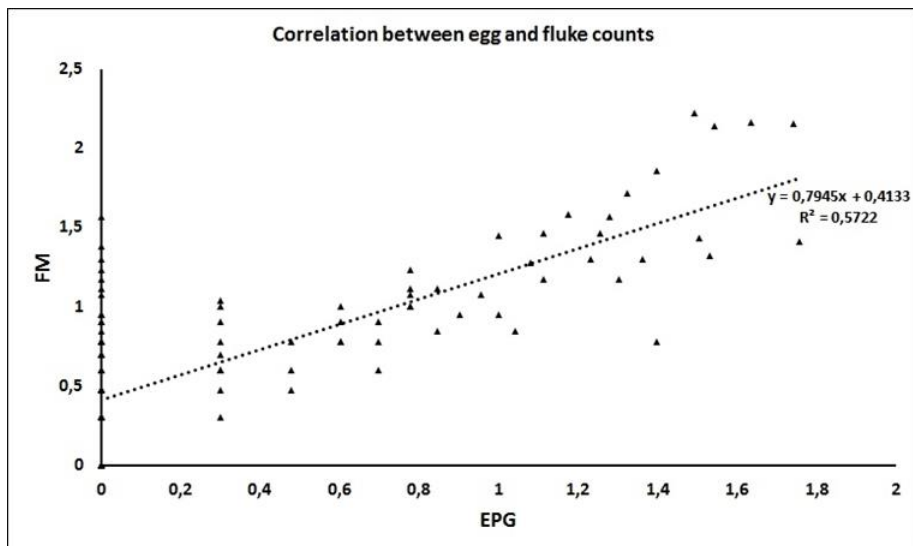


Figure 2. Linear regressions between egg count (EPG), fluke count (FM) and total dried fluke matter (TDFM).

DISCUSSION

The study aimed to develop a simple, cost-effective field method for monitoring the occurrence and spread of *F. magna* at the borders of an endemic area. For this reason, we compared two new screening methods with the gold standard, necropsy detection of adult *F. magna* parasites in the liver tissue. The first screening method was based on a photo-illustrated guideline, which was provided to the hunters who worked in the study area. The hunters evaluated all hunted animals by comparing the livers to photos of characteristic lesions caused by *F. magna* infection.

The second method was developed by fecal egg count determination in all hunter-evaluated and necropsied carcasses. By this double comparison, we could investigate whether visual-only evaluation by hunting personnel or counting fecal egg numbers could be a more efficient method for investigating epidemiological trends of *F. magna* on a hot spot.

In comparison to the gold standard, screening by hunting personnel proved to have a high sensitivity; whereas fecal egg number counting had high specificity and a very weak sensitivity. The diagrams of *Figure 1* explained this phenomenon as few flukes and/or a small amount of fluke dry matter can produce very different numbers of eggs, indeed no eggs at all. In the case of a more severe infection, the fecal egg count can represent the scale of infection moderately. Despite the fair average correlation, field-collected fecal samples cannot provide appropriate information about the epidemiological situation. Especially on the borders of an endemic area where plenty of animals should be mildly infected.

Visual-only evaluation of the eviscerated livers resulted in 100% sensitivity and 96.3% specificity. The hunting personnel claimed 137 liver samples to be infected following the photo-illustrated guideline. Though only 130 of the samples proved to be positive by necropsy detection of adult flukes. The difference originated in the gold standard test chosen for comparison. In the early stages of infection, characteristic lesions can confirm the presence of *F. magna*; though adult worms cannot be detected. In these cases, hunters seemed to evaluate the samples falsely positive. If we had chosen molecular confirmation of *F. magna* DNA in the livers as the gold standard test, false positives might have proved true positives. In the future, it is worth investigating how the initial lesions are characteristic for *F. magna* and how different they are from those caused by *Fasciola hepatica*.

Positive and negative predictive values (PPV & NPV) could better represent the two tests' usefulness. *Table 3* demonstrated that in IG test, the probability

of true positive results (PPV) was 94.9%; while for negative results, this value proved 100% (NPV). On the other hand, PPV and NPV in the sedimentation test were 100% and 70.3%, respectively. This means that in the IG test, both the positive and negative results appropriately showed the true condition of the investigated samples. In the case of the sedimentation test, the positive results were correct, while the negative results would have needed additional tests to confirm the disease-free statement. This phenomenon could be demonstrated by the accuracy of the two investigated screening tests, as IG test showed much better accuracy than the sedimentation test, 97.8%, and 74.9%, respectively.

Comparing the two potential screening tests, hunters' evaluation of eviscerated livers (IG) proved appropriate for monitoring the epidemiological trends of *F. magna* within and on the borders of an endemic area. Though we attempted to develop a method that can be applied outside of the hunting seasons, fecal egg count, which can be measured in field-collected samples, could not fulfill the expectations. On the other hand, the photo-illustrated guideline is a very simple tool to involve hunters in the monitoring activity. This method has some disadvantages. It cannot run all year round and it needs contributors who are trained in neither parasitology nor pathology. This monitoring requires close cooperation between the stakeholders. Before the initiation of the fieldwork, all contributing hunters must go through practical training on the use of the photo-illustrated guideline and theoretical training on the importance of *F. magna* infection in deer. Without the recognition of *F. magna* as potential harm to the managed deer population, any efforts to teach monitoring skills will remain useless.

In Hungary, the endemic area of *F. magna* is continuously extending. The epidemiological role of the River Danube (*Králová-Hromadová* et al. 2016) and the River Drava is known (*Nagy* et al., 2018). On the other hand, the northward spread in Transdanubia needs ongoing monitoring. This activity should focus on the frontlines, the northern borders of the endemic area where newly infected animals are expected to be found. In these conditions, those methods could be suitable to detect the early stages of the infection. The hunters' visual-only evaluation of eviscerated livers is a very sensitive and specific method of monitoring even initially infected populations. Unfortunately, this method can be carried out exclusively during the hunting season in cooperation with non-professional stakeholders. For this reason, it needs strict organization and interdependent collaboration between the parasitologist and the hunting personnel.

Acknowledgments: The publication is supported by the EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 project. We are very thankful to the Hunting Department of SEFAG Plc. and the hunters of 'Fauna' South Transdanubian Hunting Party for their professional advice and help.

REFERENCES

- Alexander, N. (2012). Analysis of parasite and other skewed counts. *Tropical Medicine and International Health*, 17(6), 684-693. DOI: [10.1111/j.1365-3156.2012.02987.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.02987.x)
- Florijančić, T., Ozimec, S., Opačak, A., Boskovic, I., Jelkic, D., Marinculic, A., Janicki, Z. (2010). Importance of the Danube River in spreading the infection of red deer with *Fascioloides magna* in eastern Croatia. *Proceedings of the 38th IAD Conference*, 22-25 June Dresden, Germany, pp. 1-5.
- Giczi, E. (2008). *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) infection of Hungarian red deer and roe deer stock and the possibility of protection. PhD Thesis, University of West Hungary, Sopron, Hungary.
- Hulme, P. E. (2014). Invasive species challenge the global response to emerging diseases. *Trends in Parasitology*, 30(6), 267-270. DOI: [10.1016/j.pt.2014.03.005](https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.03.005)
- Králová-Hromadová, I., Bazsalovicsová, E., Stefka, J., Spakulová, M., Vávrová, S., Szemes, T., Tkach, V., Trudgett, A., Pybus, M. (2011). Multiple origins of European populations of the giant liver fluke *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae), a liver parasite of ruminants. *International Journal for Parasitology*, 41, 373-383. DOI: [10.1016/j.ijpara.2010.10.010](https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2010.10.010)
- Králová-Hromadová, I., Bazsalovicsová, E., Demiaszkiewicz, A. W. (2015). Molecular characterisation of *Fascioloides magna* (Trematoda: Fasciolidae) from southwestern Poland based on mitochondrial markers. *Acta Parasitologica*, 60, 544-547. DOI: [10.1515/ap-2015-0077](https://doi.org/10.1515/ap-2015-0077)
- Králová-Hromadová I, Juhászová, L., Bazsalovicsová, E. (2016). The giant liver fluke, *Fascioloides magna*: past, present and future research. Springer International Publishing, eBook ISBN 978-3-319-29508-4.
- Laaksonen, S., Solismaa, M., Orro, T., Kuusela, J., Saari, S., Kortet, R., Nikander, S., Oksanen, A., Sukura, A. (2009). *Setaria tundra* microfilariae in reindeer and other cervids in Finland. *Parasitology Research*, 104(2), 257-65. DOI: [10.1007/s00436-008-1184-0](https://doi.org/10.1007/s00436-008-1184-0)
- Lymbery, A. J., Morine, M., Kanani, H. G., Beatty, S. J., Morgan, D. L. (2014). Co-invaders: The effects of alien parasites on native hosts. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(2), 171-7. DOI: [10.1016/j.ijppaw.2014.04.002](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2014.04.002)
- Majoros, G., Sztojkov, V. (1994). Appearance of the large American liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi, 1875) (Trematoda: Fasciolata) in Hungary. *Parasitologia Hungarica*, 27, 27-38.
- Malcicka, M. (2015). Life history and biology of *Fascioloides magna* (Trematoda) and its native and exotic hosts. *Ecology and Evolution*, 5(7), 1381-1397. DOI: [10.1002/ece3.1414](https://doi.org/10.1002/ece3.1414)
- Nagy, E., Jócsák, I., Csinicsik, Á., Zsolnai, A., Halász, T., Nyúl, A., Plucinszki, ZS., Simon, T., Szabó, SZ., Turbók, J., Nemes, CS., Sugár, L., Nagy, G. (2018). Establishment of *Fascioloides magna* in a new region of Hungary: case report. *Parasitology Research*, 117, 3683-3687. DOI: [10.1007/s00436-018-6099-9](https://doi.org/10.1007/s00436-018-6099-9)
- Novobilský, A., Horáčková, E., Hirtová, L., Modrý, D., Koudela, B. (2007). The giant liver fluke *Fascioloides magna* (Bassi 1875) in cervids in the Czech Republic and potential of its spreading to Germany. *Parasitology Research*, 100, 549-545. DOI: [10.1007/s00436-006-0299-4](https://doi.org/10.1007/s00436-006-0299-4)
- Sattmann, H., Hörweg, C., Gaub, L., Feix, A. S., Haider, M., Walochnik, J., Rabitsch, W., Prosl, H. (2014). Wherefrom and whereabouts of an alien: the American liver fluke *Fascioloides magna* in Austria: an overview. *Wiener klinische Wochenschrift*.126, Suppl 1, S23-31. DOI: [10.1007/s00508-014-0499-3](https://doi.org/10.1007/s00508-014-0499-3)

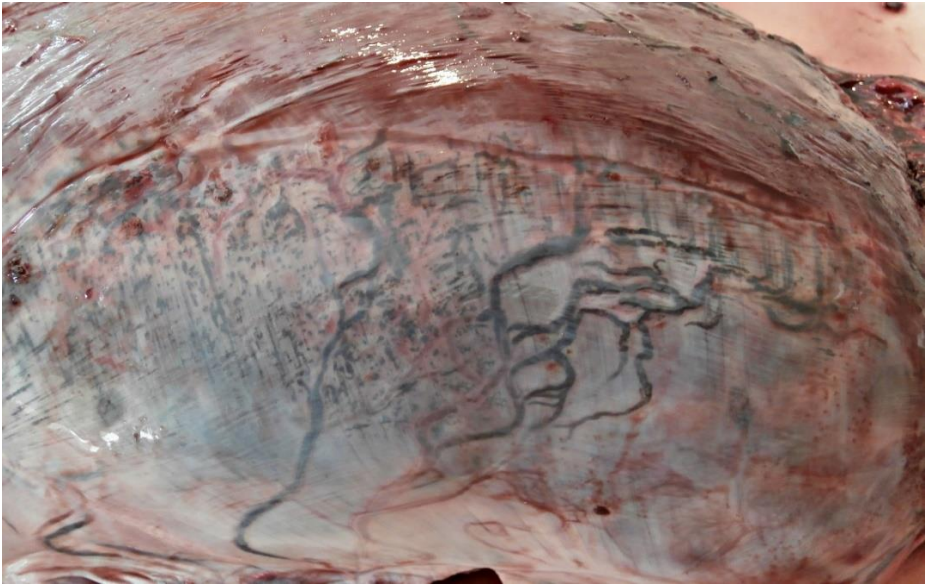
- Trevethan, R. (2017). Sensitivity, specificity, and predictive values: foundations, pliabilities, and pitfalls in research and practice. *Frontiers in Public Health*, 5, 307. DOI: [10.3389/fpubh.2017.00307](https://doi.org/10.3389/fpubh.2017.00307)
- Zayac, A. M., G. A. Conboy (2012). *Veterinary clinical parasitology*, 8th ed., Wiley-Blackwell Publishing, Chichester, West Sussex, England, pp. 13-14.



© Copyright 2023 by the authors. This is an open access article under the terms and conditions of the Creative Commons attribution ([CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)) license 4.0.



Appendix



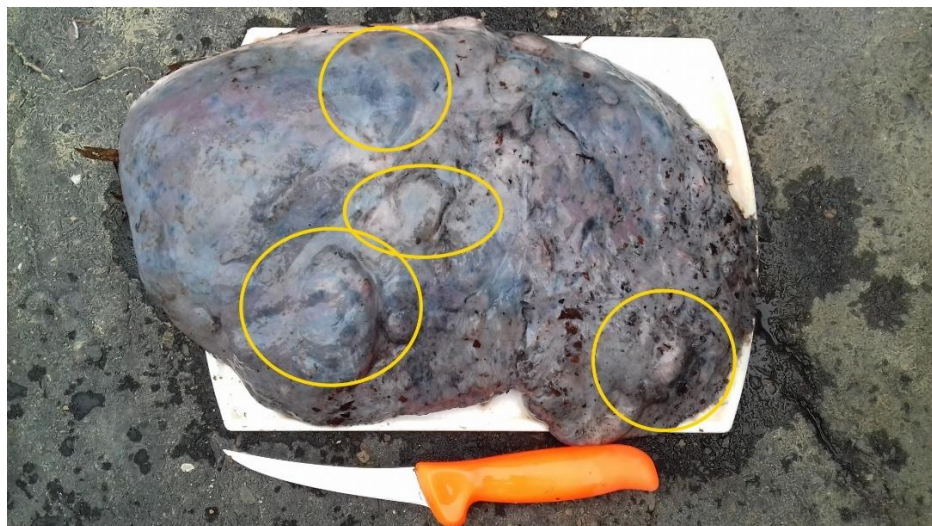
Mételyek vándorlásának nyoma a rekeszizom ín lemezében.

Characteristic of fluke migration on the diaphragm.



Mételyek vándorlásának nyoma a máj felszínén.

Characteristic of fluke migration on the liver surface.



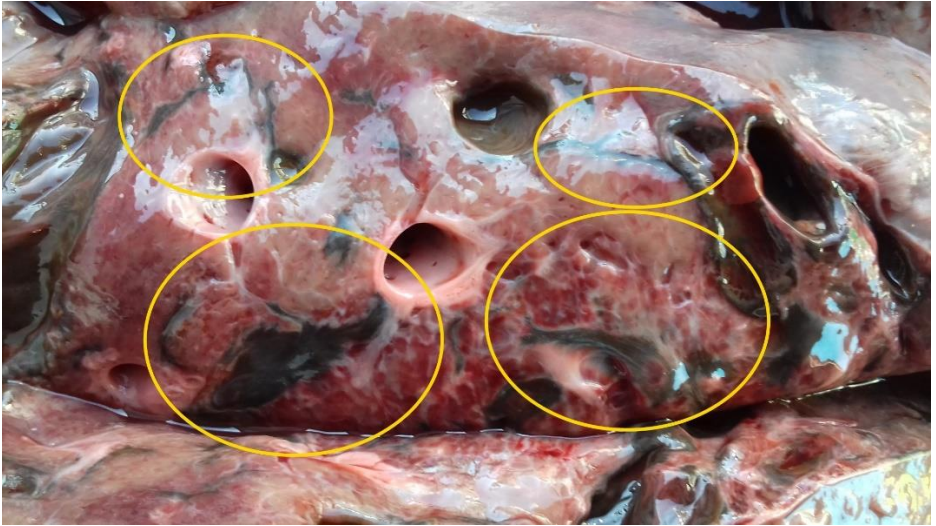
Mételyeket tartalmazó pszeudociszták a máj felszínén.

Fluke contained pseudocysts on the liver surface.

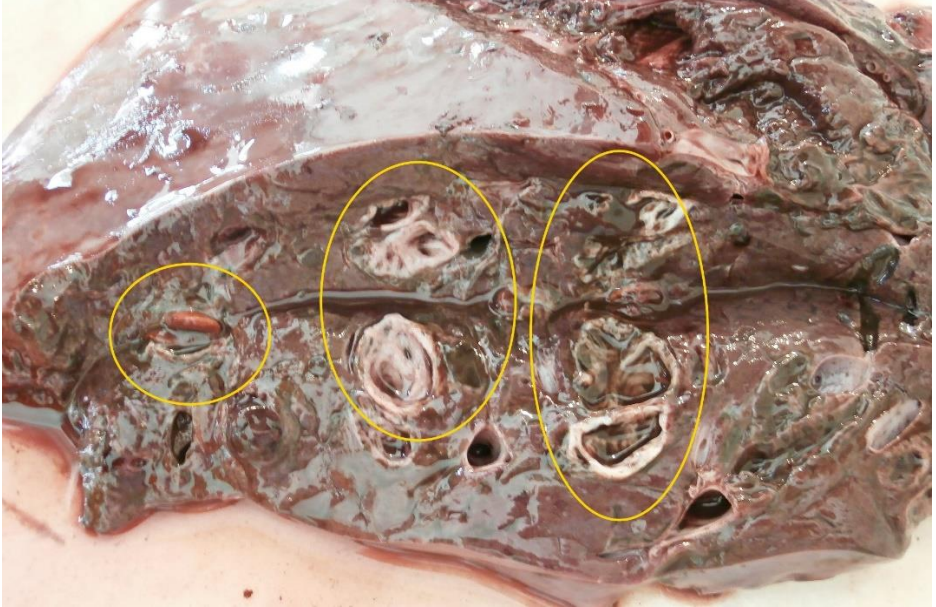


Métely vándorlás nyoma a máj metszészlapjára.

Characteristic of fluke migration on cutting surface of the liver.



Métely vándorlás nyoma a máj metszéslapjára.
Characteristic of fluke migration on cutting surface of the liver.



Pseudociszták a máj metszéslapján.
Pseudocysts on cutting surface of the liver.



Kifejlett amerikai májmételyek (*F. magna*) és közönséges májmétely (*Fasciola hepatica*).
Adult giant liver flukes (*F. magna*) and common liver fluke (*Fasciola hepatica*)



© Copyright 2023 by the authors. This is an open access article under the terms and conditions of the Creative Commons attribution ([CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)) license 4.0.



Review

Closed-chest occlusion of the left anterior descending artery in swine infarction model

Dénes KŐRÖSI^{1*}, András VOROBCSUK², Dániel FAJTAI³, Ottó TÁTRAI²,
Emőke BODOR², Rita GARAMVÖLGYI^{1,4}

¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Doctoral School in Animal Science,
7400 Kaposvár, Guba Sándor str. 40., Hungary

²Kaposi Moritz Teaching Hospital, Department of Cardiology,
7400 Kaposvár, Tallián Gy. str. 20-32., Hungary

³Medicopus Health Care Services Public Benefit Nonprofit Ltd.,
7400 Kaposvár, Guba Sándor str. 40.

⁴Auvel Pharma Co. 7400 Kaposvár, Dombóvári str. 3.

ABSTRACT – Pigs have played a significant role in biological and medical research for many years. In the case of non-rodent models, pigs are the primary choices as experimental animals in the cardiovascular studies. Accumulating data indicate that the closed-chest coronary balloon-occlusion technique is one of the most successful method for creating ischemic heart failure (HF). However, consistent and thoroughly characterized large animal models of HF are a critical translational tool for drug development and toxicology. The knowledge of the different catheterization protocols is crucial to ensure a suitable animal model which can serve as a human-related preclinical validation process. Therefore it is essential to follow an optimized and standardized experimental protocol on a homogenous animal population, which help to obtain reliable and useful data for the translational large animal research programs.

Keywords: myocardial infarction in pigs, translational research, coronary occlusion, large animal modeling

INTRODUCTION

The cardiovascular diseases are increasing health problems worldwide; they accounted for 18.6 million deaths globally in 2019, which amounted to an increase of 17.1% since 2010 (Virani et al., 2021). Myocardial ischemia is the most prevalent cause of death within the spectrum of cardiovascular illnesses. Myocardial ischemia occurs when blood flow to the myocardium is obstructed by a partial or complete blockage of the coronary artery. Coronary artery narrowing causes insufficient oxygen delivery to the myocardium, causing myocardial infarction (MI). The American Heart Association estimates that a new MI case is diagnosed every 40 s in the United States (Virani et al., 2021). This

*CORRESPONDING AUTHOR

Kőrösi-Vet Kft

✉ H-7523 Kaposfő, Zrínyi Miklós str. 10., ☎ +36 30 202 9859

E-mail: korosidenes@gmail.com

number make a strong argument for the development of new cardioregenerative treatments that rely on a reproducible and reliable large animal myocardial infarction model that accurately mimics the human scenario (*Koudstaal et al., 2014*).

Over the past several decades, the pathophysiological mechanisms driving these cardiovascular complications have extensively been studied in animal models (*Shin et al., 2021*). These facts justify the search for an ideal myocardial infarction animal model to test new treatments and optimize diagnostic tests (*Munz et al., 2011*).

Swine infarction model

Establishing an appropriate disease model that represents the complexities of human cardiovascular disease is critical for evaluating the clinical efficacy and translation success. The multifaceted and complex nature of human ischemic heart disease is difficult to recapitulate in animal models. This difficulty is often compounded by the methodological biases introduced in animal studies. Considerable variations across animal species, modifications made in surgical procedures, and inadequate randomization, sample size calculation, blinding, and heterogeneity of animal models used often produce preclinical cardiovascular research that looks promising but is irreproducible and not translatable. Moreover, many published papers are not transparent enough for other investigators to verify the feasibility of the studies and the therapeutics' efficacy. (*Shin et al., 2021*).

The domestic pig is considered an ideal experimental choice to study human myocardial ischemia for several reasons: the heart size of pigs and its weight relative to body weight is similar to those of the human heart; cardiac and vascular anatomy, ventricular performance, and electrophysiology of pigs are similar to those of humans, pigs have meager collateral circulation, so each coronary artery supplies a specific cardiac region.

Open chest methods

Open- and closed-chest methods have been used for induction of MI in pigs. Open-chest models have the advantage of easy access for precise control of site of occlusion and direct visual assessment of contractile function. These techniques are however especially invasive, with high peri- and postoperative mortality risks. *Lubberding et al. (2020.)* demonstrated differences in hemodynamic parameters and ventricular arrhythmias in open chest model compared

to closed chest method. The myocardial infarction by thoracotomy and subsequent ligation decreased blood pressure and cardiac output and delayed the onset of ventricular arrhythmia.

Closed chest methods

More recently, to avoid the trauma associated with thoracotomy or sternotomy and its possible effects on cardiac function, several closed-chest techniques, mainly by means of percutaneous catheterization, have been developed. Nevertheless, these methods present important limitations: the exact location, length, and duration of arterial occlusion; rate of thrombolysis; and reflux of the injected agent cannot be controlled reliably. Therefore, the correct standardization of the infarct size is not possible. In addition, most closed-chest models require substantial and expensive instrumentation to perform the occlusion, identify its location, and assess the size of the coronary artery. Furthermore, percutaneous models induce endothelial damage, and the time required to perform the procedure can vary substantially, depending on the operator's experience and anatomical variability of the coronary vessels (Munz et al., 2011). Catheter-based occlusion is often used as a non-invasive way to induce MI, but there is a significant variation in the occlusion sites and durations followed by reperfusion across different studies.

Shin et al. (2021) published a detailed summary about the current status and limitations of the large animal infarction models. The balloon-occlusion for 30, 45, 60 or 90 minutes of the middle of Left Anterior Descending Artery (LAD) or distal to the second largest diagonal branch are the mainly used closed-chest models. Some studies have demonstrated that the longer occlusion duration resulted in bigger infarct sizes and more severe left ventricular dysfunction (Garcia-Dorado et al., 1987; Ghugre et al., 2013; Thomas et al., 2021). However, besides the occlusion site and duration, the inconsistent infarct size and ventricular remodeling were likely to be affected by the subsequent reperfusion. Myocardial reperfusion using thrombolytic therapy or primary percutaneous coronary intervention is a treatment option for human MI patients. It is known that the reperfusion of myocytes irreversibly injured by ischemia following coronary occlusion may accelerate the necrotic process, a phenomenon called "myocardial ischemia-reperfusion injury." This could consequently affect the infarct size and lead to adverse cardiac remodeling (Braunwald and Kloner, 1985; Yellon and Hausenloy, 2007; Hausenloy and

Yellon, 2013; Hausenlov and Yellon, 2016; Acharya, 2020). All these situational specifics of a surgical procedure as part of MI preclinical study design (for example, method, site, and duration of coronary artery occlusion, and presence and duration of reperfusion following occlusion) potentially limit the generalizability and reproducibility of scientific results and likely contribute to the failure of subsequent clinical trials (Shin et al., 2021).

Krombach et al. (2005) performed a closed-chest infarction model in 44 pigs, where a balloon catheter was advanced into the left descending coronary artery (LAD) under fluoroscopic guidance. The balloon was inflated and occlusion of the vessel angiographically confirmed while ECG was continuously monitored. In case of ventricular fibrillation, direct current defibrillation was performed. In 6 animals, the balloon was left inflated during the following experiments, to obtain occlusive MI. In all other cases, the balloon was deflated after 45 minutes. After the experiments were finished, the hearts were stained with 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) for assessment of infarct size. In this study MI was successfully induced in 34 animals (28 reperfused and 6 occlusive). Mean size of MI was $15.8 \pm 5.1\%$ of left ventricular surface area for reperfused and $21.5 \pm 8.7\%$ for occlusive infarcts. In one pig, 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride did not confirm infarction. In 26 pigs, ventricular fibrillation occurred. Defibrillation was successful in 17 pigs. Failure rate because of ventricular fibrillation decreased from 42% (6) in the first 14 to 10% (3) in the next 30 animals. One animal died due to technical failure of the ventilator. After initial experiences, balloon catheters with a diameter of 2–3 mm were used, instead of 4 mm. The smaller balloon sizes were used so as to decrease the incidence of fibrillation. This technique of LAD occlusion presented a less invasive alternative to open chest models. The major pitfall, causing fatal arrhythmia was over-dilatation of the LAD with the balloon catheter.

Suzuki et al. (2008) placed a balloon catheter in the left descending coronary artery (LAD) in 78 juvenile Yorkshire swine and used to occlude the LAD. To evaluate this model, left ventricular ejection fraction (LVEF), infarct size, incidence of ventricular fibrillation (VF), and mortality was compared among three groups: 60-min proximal LAD occlusion (60P), 60-min mid LAD occlusion (60M), and 30-min proximal LAD occlusion (30P). Both mortality and incidence of VF were highest in the 60P group (66.7% and 91.7%, respectively). Myocardial infarction was successfully induced in all 72 animals and in situ double-staining with Evans blue dye and TTC was performed to delineate area

at risk for ischemia and infarcted myocardium. There was no difference in infarct size, expressed as a percentage of the area at risk, between the 60P and 60M groups ($49.5\% \pm 3.9\%$ vs. $45.4\% \pm 13.3\%$, respectively). Serial changes in LVEF of the 60M group demonstrated that until 14 days after reperfusion, LVEF improved naturally over time ($36.4\% \pm 6.6\%$ at 24 hr, and $47.3\% \pm 10.1\%$ at 14 days). In this study, most deaths (81.3%) were observed within 24 hr after induction of myocardial infarction, with the mortality of 60P group being significantly higher (66.7%) than that of other groups. Since massive infarct size was induced in this group, the main cause of mortality must be infarct-related complications, such as fatal arrhythmia and heart failure. The mortality of other groups were acceptable (16.3% in 60M group, and 0% in 30P group), and are similar to those in previous reports. One of the important observations in this study was that no difference in %infarct/area-at-risk (AAR) between 60P and 60M group was seen, despite the infarct size of the 60P group being the highest in %infarct/LV among all groups. When therapeutic efficacy will be compared between a treated group and placebo using a small infarction model such as the 30P group in this series (%infarct/AAR 5 16.8% 6 19.5%), it can be difficult to interpret the efficacy of the intervention and treatment. The %infarct/AAR of both the 60P and 60M group was approximately 50%, thus these models can evaluate therapeutic efficacy more precisely. According to the current study's results, the 60M LAD occlusion seems to be the most feasible for a porcine reperfused myocardial infarction model. Also, to evaluate therapeutic procedures and drugs aimed at modulating infarct size, it is important not only to measure the size of myocardial infarction but also to know how much myocardium was at risk. The percentage of infarcted myocardium within the area at risk can provide an index that controls for factors that modulate infarct size other than the intervention or treatment.

In a study of *Silvis et al.* (2021) a total of fifty-one female Landrace pigs were subjected to closed chest LAD balloon occlusion and evaluated in three substudies with varying protocols. To assess the relationship between time of occlusion and the infarct size (IS), 18 pigs were subjected to 60-, 75- and 90 min of occlusion and terminated after 24 h of follow-up. Influence of prolonged follow-up on IS was studied in 18 pigs after 75 min of occlusion that were terminated at 1, 3 and 7 days. The relation between AAR and IS was studied in 28 pigs after 60 min of occlusion and 24 h of follow-up. The relation between VF,

number of shocks and IS was studied in the same 28 pigs after 60 min of occlusion. Increasing occlusion time resulted in an increased IS as a ratio of the AAR (IS/AAR). This ranged from $53 \pm 23\%$ after 60 min of occlusion to $88 \pm 2.2\%$ after 90 min ($P = 0.01$). Increasing follow-up, from 1 to 3 or 7 days after 75 min of occlusion did not effect IS/AAR. Increasing AAR led to a larger IS/AAR ($r^2 = 0.34, P = 0.002$), earlier VF ($r^2 = 0.32, P = 0.027$) and a higher number of shocks ($r^2 = 0.29, P = 0.004$) in pigs subjected to 60 min of occlusion.

Koudstaal et al. (2014) presented a standardized model that used a 90 min closed-chest coronary balloon occlusion of the left anterior descending artery (LAD) followed by reperfusion, thereby creating reproducible myocardial infarction covering the anteroapical, septal and inferoseptal walls of the left ventricle. Out of 32 pigs (Female Dalland Landrace, 6 months old, ~70 kg) that were subjected to this MI protocol, five (15.6%) died due to refractory ventricular fibrillation during ischemia. This protocol created an infarct covering approximately 10-15% of the left ventricle, located in the anteroseptal, septal and inferoseptal walls. Four weeks after MI, global and regional parameters reflecting cardiac function should be decreased compared to healthy baseline values. Specifically, left ventricular ejection fraction (LVEF) should decrease to approximately ~35-45% four weeks post-MI. Besides global systolic function, several parameters reflecting post-MI adverse remodeling can also be measured, such as left ventricular (LV) morphology and diameters using Cardiac Magnetic Resonance Imaging (CMR) and echocardiography. Four weeks after MI, an increase in end diastolic volume (EDV) as a sign of adverse remodeling can be expected. The 90 min balloon occlusion of the LAD led to extensive myocardial damage and scar formation visualized by TTC staining at 1 month follow up. The infarction was located in the anterior, anteroseptal and inferoseptal segments of the heart. The success of the described protocols is dependent on the myocardial ischemia. Correct placement of the balloon distal to the second diagonal branch of the LAD is crucial for reaching adequate infarct size whilst ensuring a high survival rate. Based on this MI model, a ~15% mortality rate was observed, while extensive mid and apical segments of the anterior, septal and inferior walls were infarcted as seen on contrast-enhanced MR images (CMR) and TTC staining. The duration of ischemia can be tailored according to the desired infarct size.

CONCLUSION

There are several disadvantages of using pig models, which can limit the reproducibility of the research. One of the most important factors are the high

cost required for performing the experiments, housing/maintenance and care, and lower acceptance as model animals by society (Freedman et al., 2015; Camacho et al., 2016; Spannauer et al., 2019). Additionally, swine, especially the meat-type landrace pigs, dramatically gain weight in adulthood, which makes nearly impossible the long-term follow-up and makes it an unsuitable model for chronic heart failure studies (Schuleri et al., 2008; Tohyama and Kobayashi, 2019). Anesthetized swine of MI models often display high mortality rates due to fatal arrhythmia, such as ventricular fibrillation, during or shortly after the coronary artery occlusion or ischemia (Halkos et al., 2008; Lim et al., 2018), which may introduce sample size bias and confound experimental results (Shin et al., 2021).

The aim of the closed-chest techniques is to create a significant and easy-to-follow heart failure with the possible lowest mortality (~15%). Despite the increasing knowledge about the etiologies of MI and relevant therapeutic strategies, the translational gap between basic science and clinical research is widening. Lack of experimental rigor and quality in preclinical research has been accused as the main cause of slow translation of “promising” preclinical results, and various issues regarding reproducibility have been raised across different biomedical and social science fields (Shin et al., 2021).

The closed-chest mid LAD coronary occlusion is a well-circumscribed and standardized method in large animal infarction models. The longer occlusion time resulted in bigger infarct sizes and more severe left ventricular dysfunction. The myocardial ischemia-reperfusion injury could consequently affect the infarct size and lead to adverse cardiac remodeling, which is a well-known phenomenon in the swine infarction models. The used method, site, and duration of coronary artery occlusion, and presence and duration of reperfusion following occlusion can limit the generalizability and reproducibility of scientific results. Therefore it is essential to follow a standardized experimental protocol on a homogenous animal population, which help to obtain reliable and useful data for the translational research programs.

REFERENCES

- Acharya D. (2020). Unloading and Reperfusion in Myocardial Infarction: A Matter of Time. *Circulation. Heart failure*, 13(1), e006718. DOI: [10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006718](https://doi.org/10.1161/CIRCHEARTFAILURE.119.006718)
- Braunwald, E., & Kloner, R. A. (1985). Myocardial reperfusion: a double-edged sword?. *The Journal of clinical investigation*, 76(5), 1713–1719. DOI: [10.1172/JCI112160](https://doi.org/10.1172/JCI112160)
- Camacho, P., Fan, H., Liu, Z., & He, J. Q. (2016). Large Mammalian Animal Models of Heart Disease. *Journal of cardiovascular development and disease*, 3(4), 30. DOI: [10.3390/jcdd3040030](https://doi.org/10.3390/jcdd3040030)
- Freedman, L. P., Cockburn, I. M., & Simcoe, T. S. (2015). The Economics of Reproducibility in Preclinical Research. *PLoS biology*, 13(6), e1002165. DOI: [10.1371/journal.pbio.1002165](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002165)

- Garcia-Dorado, D., Théroux, P., Elizaga, J., Galiñanes, M., Solares, J., Riesgo, M., Gomez, M. J., Garcia-Dorado, A., & Fernandez Aviles, F. (1987). Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovascular research*, 21(7), 537–544. DOI: [10.1093/cvr/21.7.537](https://doi.org/10.1093/cvr/21.7.537)
- Ghugre, N. R., Pop, M., Barry, J., Connelly, K. A., & Wright, G. A. (2013). Quantitative magnetic resonance imaging can distinguish remodeling mechanisms after acute myocardial infarction based on the severity of ischemic insult. *Magnetic resonance in medicine*, 70(4), 1095–1105. DOI: [10.1002/mrm.24531](https://doi.org/10.1002/mrm.24531)
- Halkos, M. E., Zhao, Z. Q., Kerendi, F., Wang, N. P., Jiang, R., Schmarkey, L. S., Martin, B. J., Quyyumi, A. A., Few, W. L., Kin, H., Guyton, R. A., & Vinten-Johansen, J. (2008). Intravenous infusion of mesenchymal stem cells enhances regional perfusion and improves ventricular function in a porcine model of myocardial infarction. *Basic research in cardiology*, 103(6), 525–536. DOI: [10.1007/s00395-008-0741-0](https://doi.org/10.1007/s00395-008-0741-0)
- Hausenloy, D. J., & Yellon, D. M. (2013). Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target. *The Journal of clinical investigation*, 123(1), 92–100. DOI: [10.1172/JCI62874](https://doi.org/10.1172/JCI62874)
- Hausenloy D. J., Yellon D. M. (2016). Ischaemic conditioning and reperfusion injury. *Nat. Rev. Cardiol.* 13 193–209. DOI: [10.1038/nrcardio.2016.5](https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.5)
- Koudstaal, S., Jansen of Lorkeers, S., Gho, J. M., van Hout, G. P., Jansen, M. S., Gründeman, P. F., Pasterkamp, G., Doevendans, P. A., Hoefer, I. E., & Chamuleau, S. A. (2014). Myocardial infarction and functional outcome assessment in pigs. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (86), 51269. DOI: [10.3791/51269](https://doi.org/10.3791/51269)
- Krombach, G. A., Kinzel, S., Mahnken, A. H., Günther, R. W., & Buecker, A. (2005). Minimally invasive close-chest method for creating reperfused or occlusive myocardial infarction in swine. *Investigative radiology*, 40(1), 14–18.
- Lim, M., Wang, W., Liang, L., Han, Z. B., Li, Z., Geng, J., Zhao, M., Jia, H., Feng, J., Wei, Z., Song, B., Zhang, J., Li, J., Liu, T., Wang, F., Li, T., Li, J., Fang, Y., Gao, J., & Han, Z. (2018). Intravenous injection of allogeneic umbilical cord-derived multipotent mesenchymal stromal cells reduces the infarct area and ameliorates cardiac function in a porcine model of acute myocardial infarction. *Stem cell research & therapy*, 9(1), 129. DOI: [10.1186/s13287-018-0888-z](https://doi.org/10.1186/s13287-018-0888-z)
- Lubberding, A. F., Sattler, S. M., Flethøj, M., Tfelt-Hansen, J., & Jespersen, T. (2020). Comparison of hemodynamics, cardiac electrophysiology, and ventricular arrhythmia in an open- and a closed-chest porcine model of acute myocardial infarction. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 318(2), H391–H400. DOI: [10.1152/ajpheart.00406.2019](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00406.2019)
- Munz, M. R., Faria, M. A., Monteiro, J. R., Aguas, A. P., & Amorim, M. J. (2011). Surgical porcine myocardial infarction model through permanent coronary occlusion. *Comparative medicine*, 61(5), 445–452.
- Schuleri, K. H., Boyle, A. J., Centola, M., Amado, L. C., Evers, R., Zimmert, J. M., Evers, K. S., Ostbye, K. M., Scorpio, D. G., Hare, J. M., & Lardo, A. C. (2008). The adult Göttingen minipig as a model for chronic heart failure after myocardial infarction: focus on cardiovascular imaging and regenerative therapies. *Comparative medicine*, 58(6), 568–579.
- Shin, H. S., Shin, H. H., & Shudo, Y. (2021). Current Status and Limitations of Myocardial Infarction Large Animal Models in Cardiovascular Translational Research. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 9, 673683. DOI: [10.3389/fbioe.2021.673683](https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.673683)
- Silvis, M.J.M., van Hout, G.P.J., Fiolet, A.T.L., Dekker, M., Bosch, L., van Nieuwburg, M.M.J., Visser, J., Jansen, M.S., Timmers, L., de Kleijn, D.P.V. (2021). Experimental parameters and infarct size in closed chest pig LAD ischemia reperfusion models; lessons learned. *BMC Cardiovasc Disord* (2021) 21, 171. DOI: [10.1186/s12872-021-01995-7](https://doi.org/10.1186/s12872-021-01995-7)
- Spannbauer, A., Traxler, D., Zlabinger, K., Gugerell, A., Winkler, J., Mester-Tonczar, J., Lukovic, D., Müller, C., Riesenhuber, M., Pavo, N., & Gyöngyösi, M. (2019). Large Animal Models of Heart Failure With

- Reduced Ejection Fraction (HFrEF). *Frontiers in cardiovascular medicine*, 6, 117. DOI: [10.3389/fcvm.2019.00117](https://doi.org/10.3389/fcvm.2019.00117)
- Suzuki, Y., Lyons, J. K., Yeung, A. C., & Ikeno, F. (2008). In vivo porcine model of reperfused myocardial infarction: in situ double staining to measure precise infarct area/area at risk. *Catheterization and cardiovascular interventions: official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions*, 71(1), 100–107. DOI: [10.1002/ccd.21329](https://doi.org/10.1002/ccd.21329)
- Thomas, R., Thai, K., Barry, J., Wright, G. A., Strauss, B. H., & Ghugre, N. R. (2021). T2-based area-at-risk and edema are influenced by ischemic duration in acute myocardial infarction. *Magnetic resonance imaging*, 79, 1–4. DOI: [10.1016/j.mri.2021.02.011](https://doi.org/10.1016/j.mri.2021.02.011)
- Tohyama, S., & Kobayashi, E. (2019). Age-Appropriateness of Porcine Models Used for Cell Transplantation. *Cell transplantation*, 28(2), 224–228. DOI: [10.1177/0963689718817477](https://doi.org/10.1177/0963689718817477)
- Yellon, D. M., & Hausenloy, D. J. (2007). Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*, 357(11), 1121–1135. DOI: [10.1056/NEJMra071667](https://doi.org/10.1056/NEJMra071667)
- Virani, S. S., Alonso, A., Aparicio, H. J., Benjamin, E. J., Bittencourt, M. S., Callaway, C. W., Carson, A. P., Chamberlain, A. M., Cheng, S., Delling, F. N., Elkind, M., Evenson, K. R., Ferguson, J. F., Gupta, D. K., Khan, S. S., Kissela, B. M., Knutson, K. L., Lee, C. D., Lewis, T. T., Liu, J., (2021). American Heart Association Council on Epidemiology and Prevention Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee Heart Disease and Stroke Statistics-2021 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation*, 143(8), e254–e743. DOI: [10.1161/CIR.0000000000000950](https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000950)



© Copyright 2023 by the authors. This is an open access article under the terms and conditions of the Creative Commons attribution ([CC-BY-NC-ND](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)) license 4.0.