



Tudományos közlemény

A mezőhegyesi őshonos lófajták parciális beltenyésztettségének vizsgálata

KLEIN Renáta^{id} 2,3*, MIHÓK Sándor¹, OLÁH János³, POSTA János^{id} 1

¹Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Állattenyésztési Tanszék; 4032 Debrecen, Böszörmény út 138.

²Debreceni Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola, Debrecen; 4032 Debrecen, Böszörmény út 138.

³Debreceni Egyetem, Agrár Kutatóintézetek és Tangazdaság, Debreceni Tangazdaság és Tájkutató Intézet; 4032 Debrecen, Böszörmény út 138.

ABSTRACT - Evaluation of the partial inbreeding of the indigenous horse breeds from Mezőhegyes

Author: Renáta KLEIN^{2,3*}, Sándor MIHÓK¹, János OLÁH³, János POSTA¹

Affiliation: ¹Department of Animal Husbandry, Institute of Animal Science, Biotechnology and Nature Conservation, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Böszörményi Street 138. Hungary; ²Doctoral School of Animal Science, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Böszörményi Street 138., Hungary; ³Institutes for Agricultural Research and Educational Farm, Farm and Regional Research Institute of Debrecen, University of Debrecen, H-4032 Debrecen, Böszörményi Street 138. Hungary

This work aimed to evaluate the inbreeding of the three indigenous horse breeds from Mezőhegyes: Gidran, Furioso-North Star and Nonius. The breeding of these breeds was influenced by a lot of things in the past centuries. Their breeding aims were changed from military purposes to hobby and sport usage which changed their character too. In the last decades population genetics, especially pedigree analysis were highly used methods. The genealogical information was traced back from the actual breeding population back to the founder animals, and the final database contained more than 47,000 horses. The reference populations were defined as the registered breeding sires in 2019. In this work, we estimated the Wright inbreeding coefficient of the animals in the reference populations, and the partial inbreeding coefficients for the breed- and linefounder sires were also computed. The partial inbreeding for these founders was similar. The breeding of these genealogical lines was based on traditions, there were no different coefficients in these examined lines.

Keywords: horse breeding, pedigree analysis, Mezőhegyes, partial inbreeding, Wright coefficient

*CORRESPONDING AUTHOR

Debreceni Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

✉ 4032 Debrecen, Böszörményi út 138., ☎ 52/508-044 (88246);

E-mail: klein.renata@agr.unideb.hu

BEVEZETÉS

Az 1784-ben katonai létesítményként alapított Mezőhegyesi ménesben három őshonos lófajtát tenyésztettek ki: a furioso-north start, a gidránt és a nóniuszt. A gidránt és a furioso-north start a katonaság szükségleteit kielégítő hátszlóként tenyésztették, míg a nóniuszt tüzérhámosként (*Bozsik, 1985*). Az eltelt évtizedekben a fajták populációi dinamikusan változtak, létszámuk csökkent, veszélyeztetetteké váltak. A FAO (2022) adatai szerint 2019-ben 350 girán 905 nóniusz és 556 furioso-north star kancát tartottak tenyésztésben. A ggránban 27, a nóniuszban 73 míg a furioso-north starban 80 mén fedezett. A populációk minél pontosabb genetikai szerkezetének ismerete főként az alacsony egyed számmal rendelkező fajták esetében fontos, mert ezek védelmére, genetikai variabilitásuk megtartására – veszélyeztetettségük okán – kiemelt figyelmet kell fordítani (*Ács és mtsai, 2019*).

A feljegyzett származási adatok, vagy más néven pedigrék, régóta szolgálnak információkat a kvantitatív genetikai becslésekhez (*Čačić és mtsai, 2014*). Az állományok genetikai változatosságának pontos ismerete iránt az utóbbi évtizedekben növekedett meg az érdeklődés (*Wooliams és mtsai, 2002*). Az egyes állományok genetikai hátterét és összetételét a származási adatok ismeretében pedigréelemzéssel vagy genetikai marker vizsgálatok segítségével ismerhetjük meg (*Vígh és mtsai, 2008*). Gazdasági állatfajok tekintetében pedigréanalízissel számított mutatók ismeretében alacsonyan tartható a beltenyésztettség szintje. Különösen fontos ez olyan fajták esetében, ahol intenzív szelekciós munka folyik, vagy melyeket akár évszázadok óta zárt törzskönyvi rendszerben tenyésztnek (*Bokor és mtsai, 2010*).

Egy állományban a beltenyésztési együttható szintje kiemelt jelentőségű a fajta genetikai sokféleségének megőrzésében. Beltenyésztésről akkor beszélünk, ha rokon egyedeket párosítunk egymással. Ha egy populációt genetikai értelemben zártan tenyésztünk, akkor beltenyésztést végzünk, aminek következtében generációról generációra csökken a heterozigóta allélpárok száma, mivel az utódok nagyobb valószínűséggel lesznek homozigóták, mint véletlenszerű párosítás esetén (*Dohy, 1999*).

A beltenyésztettség mérésére legerősebben a Wright-féle beltenyésztési együtthatót használják. Az elmúlt évtizedekben számos pedigréanalízissel készült tanulmányt publikáltak, többek közt magyar állományokról is, felmérve azok beltenyésztettségét. A hazai angol telivér populációt *Bokor és mtsai (2013)*, a lipicai állományt (*Zechner és mtsai, 2002*) a hucul állományt *Posta és mtsai (2020)* vizsgálták.

Nemzetközi viszonylatban a világfajtákon túl, a három mezőhegyesi fajtához hasonlóan helyi jelentőségű fajták beltenyésztettségét is értékelték. A lengyel melegvérű lovak beltenyésztési együtthatója 1,69% volt (*Borowska és mtsai.*, 2011). Ennél magasabb, 3,83%-os, értéket közöltek *Bramante és mtsai* (2022) az olasz murgese fajtára. Míg a kladrubi lovakra *Vostrá-Vydrová és mtsai* (2016) 13%-os értéket számított.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kutatásunkhoz szükséges adatbázis felépítéséhez a származási adatokat a gidrán fajta korábbi fenntartója a Kisbéri és Gidrán Lótenyésztő Országos Egyesület, a furioso-north star fajta fenntartója a Furioso-North Star Lótenyésztő Országos Egyesület valamint a nónius fajta fenntartója a Nonius Lótenyésztő Országos Egyesület bocsátották rendelkezésünkre. A tenyésztőszervezetek adatbázisait egyesítettük, majd a hiányzó egyedeket szakirodalmi források, származási lapok, méneskönyvek és online elérhető adatbázisok használatával kiegészítettük. Az elemzéshez felhasznált végleges adatbázis 47682 egyed adatait tartalmazta, amelyből leválogattuk a 2019-ben aktív, törzskönyvi ellenőrzésben tartott, vonalba sorolt méneket (122 ló). A vonalba sorolt mének pedigradatbázisába 15999 egyed tartozott. Az egyes vonalakba tartozó mének számát az 1. táblázat mutatja be.

1. táblázat

Az egyes vonalakba tartozó mének egyedszáma fajtánként

	Gidrán ¹²	Nóniusz ¹³	Furioso-North Star
Gidrán "A" vonal ¹ (egyed)	8	-	-
Gidrán "B" vonal ² (egyed)	9	-	-
Gidrán "C" vonal ³ (egyed)	5	-	-
Nóniusz "A" vonal ⁴ (egyed)	-	26	-
Nóniusz "B" vonal ⁵ (egyed)	-	15	-
Nóniusz "C" vonal ⁶ (egyed)	-	23	-
Nóniusz "D" vonal ⁷ (egyed)	-	9	-
Furioso "A" vonal ⁸ (egyed)	-	-	5
Furioso "B" vonal ⁹ (egyed)	-	-	14
North Star "A" vonal ¹⁰ (egyed)	-	-	8
Összesen ¹¹ (egyed)	22	73	27

Table 1. Number of sires in lines sort by breed ¹Gidran "A" line, ²Gidran "B" line, ³Gidran "C" line, ⁴Nonius "A" line, ⁵Nonius "B" line, ⁶Nonius "C" line, ⁷Nonius "D" line, ⁸Furioso "A" line, ⁹Furioso "B" line, ¹⁰North Star "A" line, ¹¹Overall, ¹²Gidran, ¹³Nonius,

A beltenyésztesési mutatók számításának megalapozottságát alátámasztja egy korábbi kutatásunkban számított teljes generációs ekvivalens érték, amely a gidrán esetében a 16,45, a furioso-north starban 15,18, míg a nóniusz populációban 12,64 generáció (*Klein és mtsai., 2022*).

A kutatás során vizsgáltuk az egyedek beltenyésztesettségét az összes egyed figyelmebe vételével, illetve kiemelt egyedekre (fajta-, és vonalalapítók) vonatkoztatva. A beltenyésztesési együttható annak a valószínűsége, hogy egy adott génhely két allélja származásilag azonos. Egy egyednek két származásilag azonos allélja akkor lehet, ha legalább egy közös ősök volt (*Szabó és mtsai., 2011*). A beltenyésztesési együttható pontossága függ a származások teljességétől és hosszától is (*Boichard és mtsai., 1997*). Minél teljesebb és minél több nemzedékre visszavezethető a származás, annál pontosabb és megbízhatóbb az együttható értéke.

A beltenyésztesettségét Wright (1922) módszerével számoltuk:

$$F_X = \sum \left(\frac{1}{2}\right)^{n+n'+1} \times (1 + F_A)$$

Ahol:

F_X = X egyed beltenyésztesettségét együtthatója

n és n' = a generációk száma a közös ősig az apa és az anya részéről

F_A = bármelyik ő esetleges beltenyésztesettségét együtthatója

A parciális beltenyésztesettség annak a valószínűsége, hogy az egyed alléljai származásilag azonosak és egy adott őstől származnak. Az összes ő alapján számított parciális beltenyésztesettség értéke egyenlő a Wright-féle együtthatóval (*Lacy és mtsai., 1996, Baumung és mtsai., 2015*). Parciális beltenyésztesettségét az alábbi 15 fajta-, illetve vonalalapító ménre vonatkozóan számoltunk: Gidran Senior, Nonius Senior, Furioso Senior xx, North Star Senior xx, Gidran XXXI (1863) – Gidran "A" vonalalapító, Gidran XXXIII (1868) – Gidran "B" vonalalapító, Gidran XXI (1863) – Gidran "C" vonalalapító, Nonius XXIX (1880) – Nonius "A" vonalalapító, Nonius XXXI (1880) – Nonius "B" vonalalapító, Nonius XXXVI (1883) – Nonius "C" vonalalapító, Nonius XLII (1847) – Nonius "D" vonalalapító, Furioso I (1850) – Furioso "A" vonalalapító, Furioso X (1851) – Furioso "B" vonalalapító, North Star IV (1899) – North Star "A" vonalalapító, North Star VI (1877) – North Star "B" vonalalapító.

Az adatbázist a Microsoft Access 2016 program használatával készítettük el. Az elkészült pedigrífájl a Pedigree Viewer 6.0 (Kinghorn, 1994) használatával ellenőriztük és kódoltuk. A beltenyésztettség mutatószámait a GRain 2.2 (Doekes és mtsai., 2015) használatával számítottuk, minden esetben egymillió ismétlést beállítva.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

Gidrán

A gidrán fajta tenyésztése során a genealógiai vonalak szerinti tenyésztés egy fontos rendező elv, mivel megléte a fajtaidentitás egyik eleme. A tenyésztők három genealógiai vonalat tartanak fent, melyek alapítóit a XX. század fordulója előtt jelölték ki. Az egyes vonalakba tartozó mének átlagos parciális beltenyésztettségét az alapító Gidran Seniorra, és a három vonalapító ménre a 2. táblázat mutatja be.

2. táblázat

Az egyes gidrán vonalakba tartozó mének átlagos Wright-féle beltenyésztettsége és parciális beltenyésztettsége a fajta- és vonalapító egyedekre (%)

	Wright-féle mutató ⁴	Gidran Senior ⁵	"A" vonalapító ⁶	"B" vonalapító ⁷	"C" vonalapító ⁸
"A" vonalú mének ¹ (%)	4,87±1,92	0,03±0,01	0,32±0,17	0,11±0,07	0,02±0,01
"B" vonalú mének ² (%)	3,51±2,10	0,02±0,02	0,27±0,19	0,07±0,08	0,03±0,04
"C" vonalú mének ³ (%)	3,52±1,33	0,02±0,01	0,34±0,10	0,11±0,04	0,01±0,01

Table 2 The Wright coefficient and the partial inbreeding for the breed founder and line founder stallions of each Gidran stallion lines ¹"A" line sires, ²"B" line sires, ³"C" line sires, ⁴Wright coefficient, ⁵Breed founder, ⁶"A" line founder, ⁷"B" line founder, ⁸"C" line founder

A fajta hazai tenyésztéstörténete során a "C" vonal megléte többször veszélybe került, így a "C" vonalat alapító Gidran XXI törzsménre számolt parciális beltenyésztés alacsony értékei az előzetesen vártak szerint alakultak. A három genealógiai vonal közül az "A" vonal átlagos Wright-féle beltenyésztettsége a legmagasabb, majdnem eléri az 5%-ot, ebből kevesebb, mint 0,50% a négy ménre összesen kimutatható érték. A "B" és "C" vonal esetében ez az érték szinte megegyezik. A "B" vonal esetén 0,39% parciális beltenyésztettség oszlik el a vizsgált egyedekre. Ez az érték a "C" vonalba tartozó mének esetén a legmagasabb, 0,49%, azonban ez is alacsonynak mondható. Mindhárom genealógiai vonal esetében az "A" vonal alapító ménjére számítottuk a legmagasabb, míg a "C" vonalapítóra a legalacsonyabb parciális beltenyésztettség értéket.

Mindhárom vonal 0,02% parciális beltenyészettiséget mutatott Nonius Seniorra is, mely a közös mezőhegyesi eredetre utal.

A számértékek azt bizonyítják, valóban a pedigrek szélső apai ágának őrzéséről beszélünk, a vonalakba tartozó ménnek a legtöbb esetben nem mutatnak számottevő beltenyészettiséget vonalalapítójukra.

Nóniusz

A nóniusz fajtában ma is létezik mind a 4 genealógiai vonal, azonban ezek nincsenek egyensúlyban. Míg a "D" vonalba csupán 9 mén tartozott, addig a legnépesebb "A" vonalban 26 mént tartottak nyilván. Ez a 3. táblázat értékein is meglátszik, mely az egyes vonalakba tartozó nóniusz ménnek átlagos parciális beltenyészettiségét mutatja a fajta-, illetve a négy vonalalapítóira.

Mind a négy vonal esetén az "A" vonal alapító ménjére számítottuk a legmagasabb beltenyészettiséget, míg a "D" vonal alapítójára a legalacsonyabbat. Sőt, a "D" vonalalapító átlagos értéke minden vonal esetében alacsonyabb a Nonius Seniorra számított értéknél is.

3. táblázat

Az egyes nóniusz vonalakba tartozó ménnek átlagos Wright-féle beltenyészettisége és parciális beltenyészettisége a fajta- és vonalalapító egyedekre (%)

	Wright-féle mutató ⁵	Nonius Senior ⁶	"A" vonal-alapító ⁷	"B" vonal-alapító ⁸	"C" vonal-alapító ⁹	"D" vonal-alapító ¹⁰
"A" vonalú ménnek ¹ (%)	6,09±3,16	0,05±0,02	1,12±0,61	0,69±0,35	0,60±0,35	0,01±0,01
"B" vonalú ménnek ² (%)	4,01±2,24	0,03±0,03	0,62±0,29	0,46±0,19	0,29±0,12	0,01±0,01
"C" vonalú ménnek ³ (%)	4,30±3,05	0,03±0,03	0,73±0,55	0,46±0,30	0,42±0,31	0,01±0,01
"D" vonalú ménnek ⁴ (%)	7,96±4,45	0,10±0,06	1,07±0,43	0,62±0,25	0,64±0,30	0,02±0,02

Table 3 The Wright coefficient and the partial inbreeding for the breed founder and line founder stallions of each Nonius stallion lines ¹"A" line sires, ²"B" line sires, ³"C" line sires, ⁴"D" line sires ⁵Wright coefficient, ⁶Breed founder, ⁷"A" line founder, ⁸"B" line founder, ⁹"C" line founder, ¹⁰"D" line founder

A nóniusz fajtára számított Wright-féle beltenyészési együttható értékei magasabbak voltak, mint a gidrán fajtánál számított. A "D" vonalba tartozó ménnek esetén átlagosan majdnem elérte a 8%-ot. Ehhez mérten a parciális beltenyészettiségek értékei is magasabbak voltak. Az "A" vonalba tartozó 6505 Nonius XIV-15 (Dante) Wright-féle együtthatója 10,57%, a megjelölt ősökre számolt parciális beltenyészettisége 4,52%, melyből 2,09% az "A" vonal alapító ménjére vonatkozik.

Ahogy a gidrán esetében is a nóniusz fajtánál is tenyésztési rendező elvet jelent a genealógiai vonalak szerinti megkülönböztetés. Az egyes ménvonalakba tartozó egyedek szintjén ez a parciális beltenyésztettségben nem mutatkozik meg.

Furioso-North Star

A furioso-north star fajta négy tradicionális mén vonallal rendelkezik, azonban ezekből napjainkra egy kihaltnak tekinthető, továbbá a Furioso "A" vonal ménlétszáma is drasztikusan lecsökkent. A "B" vonal két ágra oszlik, a ménnek elegendő létszámban állnak rendelkezésre, azonban átlagéletkoruk növekszik. A North Star "A" vonal az 1980-as években jelentősen visszaszorult, fenntartása a mai napig komoly tenyésztői figyelmet és fegyelmet igényel. Ez a 4. táblázat értékein is meglátszik, mely az egyes vonalakba tartozó furioso-north star ménnek átlagos parciális beltenyésztettségét mutatja a fajta-, illetve a vonalalapító ménekre. Mindhárom ménvonal a legkisebb parciális beltenyésztettséget a már kihalt North Star "B" vonal alapítójára mutatta.

4. táblázat

Az egyes furioso-north star vonalakba tartozó ménnek átlagos Wright-féle beltenyésztettsége és parciális beltenyésztettsége a fajta- és vonalalapító egyedekre (%)

	Wright-féle mutató ⁴	Furios Senior ⁵	North Senior ⁶	Furioso "A" vonal-alapító ⁷	Furioso "B" vonal-alapító ⁸	North-Star "A" vonal-alapító ⁹	North-Star "B" vonal-alapító ¹⁰
Furioso "A" vonalú ménnek¹ (%)	3,11±1,87	0,02±0,02	0,07±0,06	0,16±0,14	0,07±0,06	0,12±0,14	0,12±0,10
Furioso "B" vonalú ménnek² (%)	4,06±1,46	0,02±0,01	0,10±0,06	0,23±0,10	0,09±0,05	0,17±0,09	0,04±0,09
North Star "A" vonalú ménnek³ (%)	4,01±1,55	0,02±0,01	0,07±0,04	0,19±0,09	0,06±0,04	0,14±0,09	0,11±0,07

Table 4 The Wright coefficient and the partial inbreeding for the breed founder and line founder stallions of each Furioso-North Star stallion lines, ¹Furioso "A" line sires, ²Furioso "B" line sires, ³North-Star "A" line sires, ⁴Wright coefficient, ⁵Breed founder stallion ⁶Breed founder stallion, ⁷Furioso "A" line founder, ⁸Furioso "B" line founder, ⁹North Star "A" line founder, ¹⁰North Star "B" line founder

A fajtaazonosság egyik sarokköve a Furioso vagy a North Star törzshöz való tartozás, azonban a Furioso törzshez tartozó ménnek nagyobb parciális beltenyésztettséget mutattak North Star Seniorra, mint Furioso Seniorra. Az egyes ménvonalak kapcsán a legmagasabb átlagos parciális beltenyésztettséget minden esetben a Furioso "A" vonalalapító ménjére vonatkozóan számoltuk. Ahogy az előző két fajta esetében, úgy a genealógiai vonalak megléte furioso-north starnál is egy tenyésztéstechnikai eszköz. A törzsek és vonalak parciális beltenyésztettségükben nem térnek el.

A Wright-féle beltenyésztettség alacsonyabb, mint a nóniusz ménnek esetében, a legmagasabb együtthatóval rendelkező Furioso "B" és North Star "A" vonalba tartozó méneknél éppen 4% feletti. A parciális beltenyésztettség értékei a gidránnál tapasztaltakhoz hasonló.

Köszönetnyilvánítás: A szerzők szeretnék megköszönni a fajták tenyésztő-egyesületeinek, hogy rendelkezésükre bocsátották adataikat.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ács V., Bokor Á., Nagy I. (2019). Population Structure Analysis of the Border Collie Dog Breed in Hungary, *Animals*. 9, 250. DOI: [10.3390/ani9050250](https://doi.org/10.3390/ani9050250)
- Boichard, D., Maignel, L., Verrier, E. (1997). The value of using probabilities of gene origin to measure genetic variability in a population. *Genet. Sel. Evol.* 29, 5–23. DOI: [10.1186/1297-9686-29-1-5](https://doi.org/10.1186/1297-9686-29-1-5)
- Bokor Á., Jónás D., Bart D., Nagy, I.; Bokor J., Szabari, M. (2013). Pedigree analysis of the Hungarian Thoroughbred population. *Livestock Science*. 151, 1-10. DOI: [10.1016/j.livsci.2012.10.010](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2012.10.010)
- Bokor Á., Jónás D., Pongrácz L., Bokor J., Szabari M. (2010). Populáció-genetikai vizsgálatok a magyarországi angol telivér állományban. *Állattenyésztés és Takarmányozás*. 59(4), 311–332.
- Borowska, A., Wolc, A., Szwaczkowski, T. (2011). Genetic variability of traits recorded during 100-day stationary performance test and inbreeding level in Polish warmblood stallions. *Arch. Tierzucht*. 54 (4), 327-337. DOI: [10.5194/aab-54-327-2011](https://doi.org/10.5194/aab-54-327-2011)
- Bramante, G., Pieragostini, E., Ciani, E. (2022). Genetic Variability within the Murgese Horse Breed Inferred from Genealogical Data and Morphometric Measurements. *Diversity*. 14, 422. DOI: [10.3390/d14060422](https://doi.org/10.3390/d14060422)
- Čačić, M, Cubric-Curik, V., Ristov, S, Curik, I. (2014). Computational approach to utilisation of mitochondrial DNA in the verification of complex pedigree errors. *Livest. Sci.* 169, 42-47. DOI: [10.1016/j.livsci.2014.09.009](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.09.009)
- Doekes, H. P., Curik, I., Nagy I., Farkas J., Kövér Gy., Windig, J. J. (2020). Revised Calculation of Kalinowski's Ancestral and New Inbreeding Coefficients, *Diversity*. 12, 155. DOI: [10.3390/d12040155](https://doi.org/10.3390/d12040155)
- Dohy J. (1999). *Genetika állattenyésztőknek*. Mezőgazda kiadó, Budapest, Magyarország, pp. 341.
- FAO (2022). Domestic Animal Diversity Information System. LINK: <https://www.fao.org/dad-is/browse-by-country-and-species/en/>
- Kinghorn, B. P. (1994). Pedigree Viewer – a graphical utility for browsing pedigreed datasets. Fifth World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Guelph, 7–12 August 1994 (22), 85–86.
- Klein R., Oláh J., Mihók S., Posta J. (2022). Pedigree-Based Description of Three Traditional Hungarian Horse Breeds. *Animals* 12(16), 2071. DOI: [10.3390/ani12162071](https://doi.org/10.3390/ani12162071)

- Lacy, R. C., Alaks, G., Walsh, A. (1996). Hierarchical analysis of inbreeding depression in *Peromyscus polionotus*. *Evolution*, 50, 2187-2200. DOI: [10.3390/d12040155](https://doi.org/10.3390/d12040155)
- Posta J., Somogyvári E., Mihók S. (2020). Historical Changes and Description of the Current Hungarian Hucul Horse Population. *Animals*, 10, 1242. DOI: [10.3390/ani10071242](https://doi.org/10.3390/ani10071242)
- Sz. Bozsik N. (1985). Mezőhegyes lótenyésztésének története 1785-től 1985-ig. Mezőhegyesi Mezőgazdasági Kombinát Munkaközössége, Mezőhegyes, Magyarország, 83 p.
- Szabó F., Komlósi I., Posta J. (2011). Állattenyésztési genetika. Letöltve: LINK: <https://dtk.tan-konyvtar.hu/xmlui/handle/123456789/8541> (Utolsó letöltés: 20/11/2022)
- Vígh Zs., Csató L., Nagy I. (2008). A pedigré analízisben alkalmazott mutatószámok és értelmezésük. Szakirodalmi áttekintés Állattenyésztés és Takarmányozás. 57(6), 549-564.
- Vostrá-Vydrová, H., Vostrý, L., Hofmanová, B., Krupa, E., Zavadilová, L. (2016). Pedigree analysis of the endangered Old Kladruber horse population. *Livest. Sci.* 185, 17-23. DOI: [10.1016/j.livsci.2016.01.001](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2016.01.001)
- Wooliams, J. A., Pong-Wong, R., Villaneueva, B. (2002). Strategic optimisation of short and long term gain and inbreeding in MAS and non-MAS schemes, in: Proc. 7th World Cong. Genet. Appl. Livest. Prod., Montpellier, INRA, Castanet-Tolosan, France, CD-Rom, comm. (23) 02.
- Wright, S. (1922). Coefficients of inbreeding and relationship. *The American Naturalist*. 56, 330-338.
- Zechner, P., Sölkner, J., Bodó I., Druml, T., Baumung, R., Achmann, R., Marti, E., Habe, F., Brem, G. (2002). Analysis of diversity and population structure in the Lipizzan horse breed based on pedigree information. *Livest. Prod. Sci.* 77 (2-3), 137-146. DOI: [10.1016/S0301-6226\(02\)00079-9](https://doi.org/10.1016/S0301-6226(02)00079-9)



© Copyright 2022 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

Feed preference and feeding behavior of different mouse species in laboratory housing

Boróka BÁRDOS^{1,2}, György KÖVÉR², András SZABÓ³,
Zsolt GERENCSÉR², István NAGY^{2*}

¹Institute for Wildlife Management and Nature Conservation, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Kaposvár Campus, Kaposvár, 7400 Guba S. 40.

²Institute of Animal Science, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Kaposvár Campus, Kaposvár, 7400 Guba S. 40.

³Institute of Physiology and Nutrition, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Kaposvár Campus, Kaposvár, 7400 Guba S. 40.

ABSTRACT – The feed preference of two species of wild mice, the house mouse (*Mus musculus*), and the mound-building mouse (*Mus spicilegus*) was investigated (kept in our laboratory for 25 generations). Our interest focused on the feed preference (i.e. if the mice choose the type of feed closest to their natural food). The proximate composition of the two granulated feeds offered to mice differed minimally; the crude fat and crude fibre content of the natural feed mixture was higher, and only this feed contained insect protein. Based on the obtained results, both wild mice species approached the natural feed mixture more frequently than the two other granulated feeds. The same tendency was observed for feed consumption where the animals mostly consumed the natural feed mixture. During the 5-day long study, the consumption of the natural feed mixture increased continuously, while the consumption of the granulated laboratory feed decreased significantly. The average feed consumption was also influenced by room temperature. Our studies can help to develop the optimized indoor keeping and breeding of small domesticated mammals.

Keywords: wild mouse species, *Mus musculus*, *Mus spicilegus*, feed preference, natural feed mixture

INTRODUCTION

Mice have been used in biomedical research since the 17th century, and since the 19th century, they have been bred in many places in Europe and the United States based on different fur colors (Hedrich, 2004). Although today's classical laboratory mouse strains probably originate from several subspecies of *Mus musculus* (Bonhomme et al., 1987; Wade et al., 2002), genetic studies have revealed four parental components, *Mus m. domesticus*, *Mus m. musculus*, *Mus m. castaneus* and *Mus musculus molossinus* (Wade et al., 2002). Since the beginning of the 20th century, mice have been sold in large numbers to research

*CORRESPONDING AUTHOR

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Kaposvári Campus

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

E-mail: naqy.istvan.prof@uni-mate.hu

institutes and universities, thus necessarily bringing with them the development of keeping and feeding mice. The feeding and nutrient requirements of laboratory mice from the species *Mus musculus* were determined based on numerous research results by the Subcommittee on Laboratory Animal Nutrition, Committee on Animal Nutrition, Board on Agriculture, National Research Council (Coates, 1987). The house mouse (*Mus musculus*) is generally known to eat various plant and animal-origin foods (Calhoun, 1941). However, mice are opportunistic omnivores and eat both materials of both plant and animal origin. Wild mice eat a wide variety of seeds, grains, and other plant matter, as well as invertebrates, smaller vertebrates, and carrion. In the course of Whitaker's (1966) studies, we can get accurate information on the food composition of the house mouse, where it was shown that about 42% of the wild house mouse's food is composed of seeds of wild grasses (*Setaria sp.*). The seeds of cultivated cereals, such as wheat, corn, and sorghum, make up about 23% of the mice's natural diet, and they consume 15% of animal food, mainly insects and their larvae, and 20% of plant roots, fruits, and fresh green vegetable parts are consumed. In general, it can be stated that the feed composition determined based on Whitaker's (1966) studies and the composition of the feeds intended for laboratory mice do not entirely overlap. The protein content of laboratory feeds mainly comes from plants and contains minimal animal components.

In the present study, we investigated two species of mice native to Hungary and belonging to the *Mus* genus, the house mouse (*Mus musculus*) and the mound-building mouse (*Mus spicilegus*), kept in the laboratory for 25 generations, focusing on the question: which of three offered feeds they prefer in a free-choice test. Among the three feeds offered, one was a laboratory rodent feed in granulated form, the other is a feed containing tall green plant parts also in granulated format, and the third is a seed mix with fruit and dried insect ingredients.

MATERIAL AND METHODS

Animals and experimental design

The study was conducted in the Rodent House of the Kaposvár Campus of the Hungarian University of Agricultural and Life Sciences. The rodent house has its own mouse farm, where individuals of known age, sex, and origin can be found. The current population consists of laboratory-born offspring of wild individuals captured from several parts of the country. For the feed preference study, we used house mice and mound-building mice; a total of 72 individuals

were randomly selected, 36 house mice and 36 house mice, within which we selected equal sex ratio. The test took place simultaneously at temperatures of 10 and 21°C in two separate test rooms with similar lighting (Light:Dark=12:12) for five days. During the study, the mice were housed individually in a T4 laboratory mouse box, provided with litter and nest-building material. On the test days, at 8:00 a.m., the three types of feed were placed in the feeding bowls in amounts between 5 and 6 grams, weighed in hundredths of a gram, and after 6 hours, the feeds were re-weighed every day.

Test feeds

Table 1

The name and composition of the feeds used for the test

Feed name	Components
Versele-Laga Nature Mouse	grain (wheat) derivatives of plant origin vegetables (peas, beets, carrots) seeds fruit vegetable protein extracts insects nuts minerals herbs MOS FOS marigold grape seed
Versele-Laga Complete Rat and Mouse	grain derivatives of plant origin vegetables (peas) fruits oils and fats seeds montmorillonite clay yeast eggs and egg derivatives fructo-oligo-saccharides marigold yucca rosemary green tea
<i>Continue in the next page</i>	

<i>SAFE</i> [®] 132 Laboratory mouse feed	wheat barley corn soy flour extruded soybeans wheat bran calcium-carbonate vitamin premix minerals inactivated brewer's yeast L-lysine DL-methionine
---	---

Table 2
Analytical composition of feeds.

Nutrient	Versele-Laga Nature	Versele-Laga Complete	<i>SAFE</i> [®] 132 Laboratory
Crude protein	16,5%	14,9%	18,6%
Crude fat	8,2%	4,1%	4,0%
Crude fiber	6%	3,6%	4,2%
Raw ash	5,2%	5,7%	5,5%
Moisture content	8,8%	6,3%	8,7%

Statistical analyses

To determine whether the choice rates of different feeds were similar, a Chi-square test was used, assuming equal contribution. Afterward, the effects of species and room temperature were evaluated with Generalized Linear Mixed Model. In case of the latter analysis, the distribution was multinomial and the generalized logit link function was set. The five-days-test was analyzed in Repeated Measures ANOVA The SAS 9.4 software was used for all types of analysis applying the PROC FREQ, the PROC GLIMMIX, and the PROC CORR procedures, respectively.

RESULTS AND DISCUSSION

Based on the Chi-square test, we showed a significant difference between the consumption of the three feed types ($p < 0.005$). The mice chose the natural feed type (Nature) in 73% of the three feeds, laboratory (Laboratory feed) in 26% and complete feed (Com-plete) in only 1%.

Based on the Generalized Linear Mixed Model, we found no significant difference between the choice of feed types for the two mouse species ($p = 0.57$). Between the two species, we found no significant difference in the choice of

natural feed type ($p=0.68$), nor in the choice of complete feed ($p=0.67$), nor did we find any difference in the choice of laboratory feed ($p=0.52$) for the two species.

Based on the estimated probabilities, mound-building mouse and house mouse also chose the natural feed in the highest proportion (Table 3.).

Table 3

Probability of choosing feeds during the choice test for the two species

Feed	Species	Probability	Standard Error
Nature	mound-building mouse	0.7247	0.0340
	house mouse	0.7689	0.0320
Complete	mound-building mouse	0.000024	0.0049
	house mouse	0.000036	0.0075
Laboratory feed	mound-building mouse	0.2753	0.0338
	house mouse	0.2311	0.0320

We found a significant difference in feed choices between the two different room temperatures ($p=0.04$), within feed type (laboratory feed). At the two different temperatures, we did not find a significant difference in the choice of the natural feed type ($p=0.97$), nor in the complete feed type ($p=0.88$), only a significant difference was found in the choice of the laboratory feed ($p=0.01$). At a temperature of 10 °C, the probability of consuming laboratory feed increased (Table 4).

Table 4

During the choice test, the probability of choosing the feeds at the two different room temperatures

Feed	Temperature	Probability	Standard Error
Nature	10	0.7247	0.0340
	21	0.7689	0.0325
Complete	10	0.0252	0.0235
	21	0.0267	0.0122
Laboratory feed	10	0.3156	0.0347
	21	0.1932	0.0295

Based on the Repeated Measures ANOVA, we found a significant difference in the daily consumption of natural feed during the 5 days ($p=0.001$), the consumption of natural feed increased on consecutive days (Figure 1, Figure 2). The amount consumed from natural feed showed no significant difference between the species ($p=0.791$), as well as between the temperatures ($p=0.128$). No significant difference was found in the interaction between time, species, and temperature ($p=0.480$).

No significant difference was found in the consumption of complete feed during the 5 days ($p=0.755$). The amount of complete feed consumed did not show a significant difference between the species ($p=0.921$), just as we did not find a significant difference in consumption between the two different temperatures ($p=0.724$). No significant difference was found in the interaction between time, species and temperature ($p=0.745$).

A significant difference was found in the consumption of the laboratory mouse feed during the 5 days ($p=0.001$), the consumption of the laboratory feed decreased during the 5 days. We found no significant difference between the species ($p=0.329$) in the consumption of the laboratory feed, but we found a significant difference in the consumption of the laboratory feed between the two different temperatures ($p=0.001$). The consumption of the laboratory feed increased at colder temperature. No significant difference was found in the interaction between time, species, and temperature ($p=0.405$).

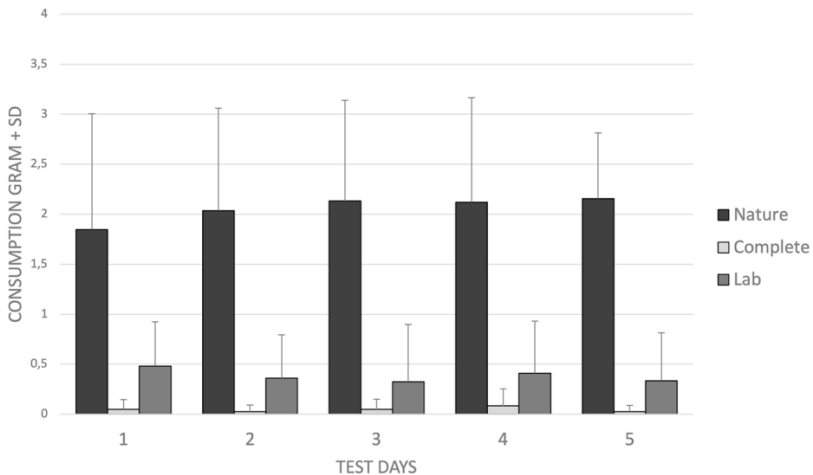


Figure 1. The daily consumption of different types of feed in grams at 21 degrees Celsius during the 5 days.

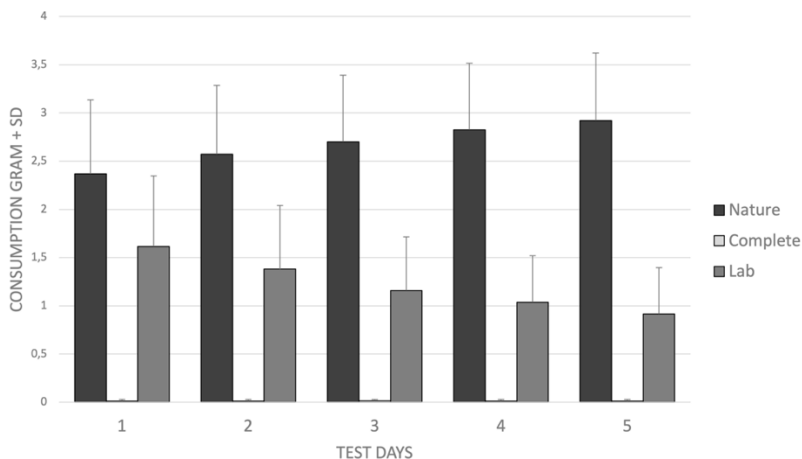


Figure 2. The daily consumption of different types of feed in grams at 10 degrees Celsius during the 5 days.

Our tests revealed that the mice chose the food (Nature) closest to their natural food in the three-way choice test. The chosen feed is closest in both proximate composition and physical structure to the food that mice eat in nature. Both the mound-building mouse and the house mouse chose the natural feed (Nature) mixture under laboratory conditions. Examining the analytical composition of the feeds, we can see that the natural feed mixture is not the highest in protein content, but this feed contains only insect protein, which is an important element of the rodents' natural diet (*Whitaker, 1966*). The natural feed mixture (Nature) has the highest percentage of crude fiber and crude fat. The result of choosing a diet with a higher crude fat composition is consistent with another study in mice, where mice were shown to prefer diets and liquids with higher oil and fat content in a two-way choice test, over fat-free diets (*Rowe et al., 1974; Takeda et al., 2000*). According to some studies, fatty appearance contributes to the preference for certain feeds in rodents (*Ramirez, 1994*). Another study reported possible orosensory recognition of fatty acids in rodents (*Gilbertson et al., 1997; Gilbertson, 1998; Tsuruta et al., 1999*), so the presence of esterified or free fatty acids increases the preference for the given feed, also termed as oleogustus.

In rodents, the percentage of crude fat in the feed is also an essential factor from the point of view of reproductive biology and offspring sex ratio. According to some studies, female house mice fed a low-fat diet gave birth to fewer

male offspring (*Rivers & Crawford, 1974; Labov et al., 1986*). In addition, studies conducted with golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) revealed that females fed a diet of a lower fat content gave birth to smaller litters and that the male offspring from such litters developed more slowly than the male offspring of females fed a diet of higher fat content (*McClure, 1981*).

The Nature feed mix used for our study is a feed composed of seed mixtures; its preference was the same as in the study with laboratory rats, where it was found that the rats prefer grain feed more than granulated feed (*Abdel-Kader et al., 2014*). Based on another study on rats, those preferred mixed feed in choice tests over homogeneous feed containing only one type of ingredient (*Ito, 2001; Schein and Orgain, 1953*).

In rodent food preference tests, it is common for the animals to be warier of the unknown food at first, and then the consumption of the unknown food increases as the test days pass (*Pennycook & Cowan, 1990*). This phenomenon was also observed in our tests; the consumption of the feed mixture most preferred by the animals (Nature) increased with the test days, while the consumption of the laboratory feed known to the animals gradually decreased over the days. During the tests carried out at two different temperatures, it was revealed that in the colder environment, feed intake increased minimally, but overall, which was significantly detectable in the case of laboratory feeds. Due to their small body size and very high metabolic activity, mice are relatively sensitive to heat loss (*Lisk, 1969*); therefore, in colder environments, animals must take in more feed and probably more lipids in order to meet their energy needs due to heat retention (*Lenzhofer et al., 2020*).

CONCLUSIONS

We can say that even the wild mouse species that have been bred and kept in the laboratory for 25 generations have chosen the feed closest to their natural diet, which is identical in composition and structure to the food of their wild counterparts. For small mammals kept in the laboratory, it would be worthwhile to carry out further tests involving insect protein since currently available small mammal feeds do not contain insect protein, even though numerous field studies have shown that insects play an important role in the diet of small mammals.

Institutional Review Board statement: This research was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of Kaposvár Campus (permit number: MATE KC MÁB/10-5/2021). The authors declare that all experiments were performed in accordance with approved guidelines and regulations.

REFERENCES

- Abdel-Kader, M. R., Asran, A. A., Al-Gendy, A. A., & Kaleal, K. E. (2014). Food preference for albino rats and albino mice under laboratory conditions. *Egypt. J. Agricult. Res.*, 92, 1279-1290. DOI: [10.21608/ejar.2014.156762](https://doi.org/10.21608/ejar.2014.156762)
- Bonhomme, F., Guenet, J., Dod, B., Moriwaki, K., Bulfield, G. (1987). The polyphyletic origin of laboratory inbred mice and their rate of evolution. *Biol. J. Linnean Soc.*, 30, 51-58. DOI: [10.1111/j.1095-8312.1987.tb00288.x](https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1987.tb00288.x)
- Calhoun, J.B. (1941). Distribution and food habits mammals in the vicinity of the reel fort lake. *Biological J. Tennessee Acad. Sci.*, 17, 177-185.
- Coates, M. E. (1987). Ed., International Council for Laboratory Animal Science. ICLAS Guidelines on the Selection and Formulation of Diets for Animals in Biomedical Research, London: International Council for Laboratory Animal Science.
- Gilbertson, T. A., Fontenot, D. T., Liu, L. I. D. O. N. G., Zhang, H. U. A. I., & Monroe, W. T. (1997). Fatty acid modulation of K⁺ channels in taste receptor cells: gustatory cues for dietary fat. *Am. J. Physiol-Cell Physiol.*, 272, 1203-1210. DOI: [10.1152/ajpcell.1997.272.4.c1203](https://doi.org/10.1152/ajpcell.1997.272.4.c1203)
- Gilbertson, T. A. (1998). Gustatory mechanisms for the detection of fat. *Current opinion in neurobiol.*, 8, 447-452. DOI: [10.1016/s0959-4388\(98\)80030-5](https://doi.org/10.1016/s0959-4388(98)80030-5)
- Hedrich, H. (2004). Ed., The house mouse as a laboratory model: a historical perspective. *The Laboratory Mouse*. Elsevier Science.
- Ito, Y. (2001). A method for estimating food preference of the commensal rat. *Med. Entomol. Zool.*, 52, 231-239. DOI: [10.7601/mez.52.231](https://doi.org/10.7601/mez.52.231)
- Labov, J.B., Huck, U.W., Vaswani, P. & Lisk, R.D. (1986). Sex ratio manipulation and decreased growth of male offspring of undernourished golden hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Beh. Ecol. Sociobiol.*, 18, 241-249. DOI: [10.1007/bf00300000](https://doi.org/10.1007/bf00300000)
- Lenzhofer, N., Ohrnberger, S. A., Valencak T. G. (2020). n-3 polyunsaturated fatty acids as modulators of thermogenesis in Ames dwarf mice. *Gerosci.*, 42, 897-907. DOI: [10.1007/s11357-019-00148-1](https://doi.org/10.1007/s11357-019-00148-1)
- Lisk, R. D., Pretlow 3rd, R. A., & Friedman, S. M. (1969). Hormonal stimulation necessary for elicitation of maternal nest-building in the mouse (*Mus musculus*). *Animal Behav.*, 17, 730-737. DOI: [10.1016/s0003-3472\(69\)80020-5](https://doi.org/10.1016/s0003-3472(69)80020-5)
- McClure, P. A. (1981). Sex-biased litter reduction in food-restricted wood rats (*Neotoma floridana*). *Science*, 211, 1058-1060. DOI: [10.1126/science.211.4486.1058](https://doi.org/10.1126/science.211.4486.1058)
- Pennycuik, P. R., & Cowan, R. (1990). Odor and food preferences of house mice, *mus-musculus*. *Aus. J. Zool.*, 38, 241-247. DOI: [10.1071/zo9900241](https://doi.org/10.1071/zo9900241)
- Ramirez, I. (1994). Chemosensory similarities among oils: does viscosity play a role? *Chem. Senses*, 19, 155-168. DOI: [10.1093/chemse/19.2.155](https://doi.org/10.1093/chemse/19.2.155)
- Rivers, J. P. W., & Crawford, M. A. (1974). Maternal nutrition and the sex ratio at birth. *Nature*, 252, 297-298. DOI: [10.1038/252297a0](https://doi.org/10.1038/252297a0)
- Rowe, F., Bradfield, A., & Redfern, R. (1974). Food preferences of wild house-mice (*Mus musculus* L.). *J. Hyg.*, 73, 473-478. DOI: [10.1017/s0022172400042819](https://doi.org/10.1017/s0022172400042819)
- Schein, M. W. & Orgain, H. (1953). A preliminary analysis of garbage as food for the Norway rat. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2, 1117-1130. DOI: [10.4269/ajtmh.1953.2.1117](https://doi.org/10.4269/ajtmh.1953.2.1117)
- Takeda, M., Imaizumi, M., Fushiki, T. (2000). Preference for vegetable oils in the two-bottle choice test in mice. *Life Sci.*, 67, 197-204. DOI: [10.1016/s0024-3205\(00\)00614-7](https://doi.org/10.1016/s0024-3205(00)00614-7)
- Tsuruta, M., Kawada, T., Fukuwatari, T., & Fushiki, T. (1999). The orosensory recognition of long-chain fatty acids in rats. *Physiol. behav.*, 66, 285-288. DOI: [10.1016/s0031-9384\(98\)00299-6](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(98)00299-6)
- Wade, C., Kulbokas, E., Kirby, A. et al. (2002). The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature*, 420, 574-578. DOI: [10.1038/nature01252](https://doi.org/10.1038/nature01252)

Whitaker, J. O. (1966). Food of *Mus musculus*, *Peromyscus maniculatus bairdi* and *Peromyscus leucopus* in Vigo Country Indiana. *J. Mamm.*, 47, 473-486. DOI: [10.2307/1377688](https://doi.org/10.2307/1377688)



© Copyright 2022 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

Effect of restricted feeding on productive and carcass traits of rabbits

Zsolt SZENDRŐ ^{1*}, Róbert ROMVÁRI², Zsolt MATICS ²,
István RADNAI²

¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Physiology and Nutrition,
Kaposvár Campus, Guba S. u. 40., H-7400 Kaposvár, Hungary

²Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Animal Science, Kaposvár
Campus, Guba S. u. 40., H-7400 Kaposvár, Hungary

ABSTRACT – The study examined the age-dependent feed restriction on growing rabbits' growth and carcass traits. Three groups of weaned rabbits (5 weeks of age, n=243) were established: AL=control group: *ad libitum* feeding during the whole fattening period (n=81), RF65 group: 65% of the feed consumption of AL during the first two weeks after weaning, 80% in the third, 100% in the fourth week and *ad libitum* afterward (n=81), RF70 group: 70% in the first two weeks, 80% in the third, 100% in the fourth week and *ad libitum* till slaughtering (n=81). Feed consumption was in line with the planned level during the feed restriction period. After finishing the restriction at 100%, the feed consumption increased rapidly, and it was higher between 9 and 11 weeks of age than that of the AL group (P<0.001). Daily weight gain of restricted groups was lower between 5 and 7 weeks of age (47.7 vs. 28.9 and 25.2 g/day in AL, RF70, and RF65, respectively, P<0.001). The differences in body weights were highest at seven weeks of age, and later the differences decreased (body weight at 11 weeks, AL: 2710 g, RF65: 2637 g, RF70: 2655 g, P<0.05). In the first week, the feed conversion rate was better in the AL group, while between 7 and 10 weeks of age, it was better in the restricted groups (P<0.001). Significant differences were found in mortality but independent of treatment. The feed restriction had a slight effect on carcass traits. The weight of the fore part of the carcass was higher in the AL group (P=0.053), while the liver was heavier in the restricted rabbits (84.2 vs. 80.1 g, P=0.388). The perirenal fat content was the lowest in RF65 rabbits (16.9 g) and the highest in the AL group (21.6 g, P<0.05). A stricter and then milder feed restriction after weaning and *ad libitum* feeding in the final fattening stages could be preferred.

Keywords: growing rabbit, feed restriction, growth performance, carcass traits

INTRODUCTION

The first experiments to study the effect of restricted feeding (RF) in growing rabbits were performed several decades ago (Szendrő *et al.*, 1988). Summarizing the relevant results, Gidenne *et al.* (2012) published a detailed review article. The actuality of this subject is shown by the fact that more than ten papers

*CORRESPONDING AUTHOR

Hungarian University of Agriculture and Life Sciences,
Institute of Physiology and Nutrition, Kaposvár Campus,

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

E-mail: zsandro.zsolt@uni-mate.hu

on this topic were presented at the World Rabbit Congress in 2021 (WRC, 2021).

Regarding RF, two methods are known: in one, the amount of feed offered to the animals is reduced (Gidenne *et al.*, 2009; Birolo *et al.*, 2017), and in the other, the time to allow the rabbits to consume the feed is limited (Szendrő *et al.*, 1988; Birolo *et al.*, 2020). Initially, the amount of feed or feeding time was limited throughout the fattening period. However, due to the occurrence of RHD (Rabbit Haemorrhagic Disease) and the associated high mortality, the feed was restricted only in the post-weaning period, then switched to *ad libitum* feeding during the final stages of fattening. This allows rabbits to compensate for lower weight gain after the restriction (Gidenne *et al.*, 2003). The goal and one of the main benefits of feed restriction are to reduce morbidity and mortality. Its additional benefits are rabbits consume less feed, and the feed conversion rate (FCR) is improved in the whole fattening period (Gidenne *et al.*, 2012). Unfortunately, switching from restricted (RF) to *ad libitum* (AL) feeding can increase mortality, and the previous benefit can be lost. In addition, the rabbits cannot fully compensate for the lower weight gain (BWG) after the restriction period. Therefore they are sold to slaughterhouses at a slightly lower weight (BW). Finally, finding an ideal method with automated feed distribution is difficult. The feed restrictions for growing rabbits are commonly used in France (Gidenne *et al.*, 2012).

The question may arise as to why this issue needs to be addressed for decades, why it is not possible to develop a uniform method? That is because slaughter weight and thus slaughter age can vary between countries. For example, in Spain, rabbits are usually slaughtered at a weight of 2.0-2.2 kg at nine weeks, in France at 2.3-2.5 kg, at ten weeks, in northern Italy at over 2.5 kg, at 11 weeks (Nielsen *et al.*, 2021). Rabbits are most often weaned at 4 or 5 weeks of age. For this reason, the fattening period varies between 4 and 7 weeks. The length of the feed restriction and compensation (*ad libitum* feeding) period varies depending on these factors. Naturally, the composition of diet with or without medication, breed (hybrid), and several other factors (e.g., season) also influence the method used.

Our experiment aimed to investigate the effect of stricter and then milder feed restrictions after weaning and then *ad libitum* feeding at the end of the fattening period on Pannon White rabbits' production and slaughter properties.

MATERIAL AND METHODS

The trial was carried out in Kaposvár with Pannon White rabbits (n = 243) weaned at five weeks (81 rabbits/group). Animals were randomly divided into three groups and housed in fattening cages (3 rabbits/cage). The temperature was kept at 16-18 °C, and the daily lighting was 16 hours. The rabbits received a commercial pelleted diet (after weaning, medicated diet, and from 7 weeks of age without medication; energy: 10.3 and 10.6 MJ DE/kg, crude protein: 14.5 and 16.0%; crude fiber: 17.5 and 16%, respectively). All rabbits were handled according to the principles stated in the European Directive 2010/63/EU regarding the protection of animals used for experimental and other scientific purposes (EC, 2010) and according to the Hungarian legal requirements (32/1999. /III. 31./ and 178/2009. /XII. 29./).

One group was fed *ad libitum* throughout the experiment (AL); the other two groups (RF70 and RF65) were fed restrictively between week 5 and week 8. The RF70 group received daily portion equal to 70% and 80% of *ad libitum* in week 5-7 and in week 7-8, respectively. Rabbits in RF65 treatment received daily portion equal to 65% and 80% of *ad libitum* in week 5-7 and in week 7-8. From week 8 until the slaughter all rabbits had free access to feed (Table 1).

Table 1
Planned feeding regime of the experimental groups

Groups	Age, weeks					
	5-6	6-7	7-8	8-9	9-10	10-11
AL ¹ (n=81)	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad libitum</i>	<i>ad lib.</i>	<i>ad lib.</i>
RF70 ² (n=81)	70%	70%	80%	100%	<i>ad lib.</i>	<i>ad lib.</i>
RF65 ³ (n=81)	65%	65%	80%	100%	<i>ad lib.</i>	<i>ad lib.</i>

¹*Ad libitum*; ²Restricted feeding starting with 70% of *ad libitum* consumption; ³Restricted feeding starting with 65% of *ad libitum* consumption

The feed intake (FI) of the rabbits was measured twice a week, and the daily amount of feed for the restricted groups (RF65, RF70) was calculated in relation to the amount of feed consumed by the AL group. (The first weekly limit was based on data from a previous experiment.) Between 8 and 9 weeks of age, the same intake (100%) as in the AL group was justified since rabbits should not suddenly consume too much feed after finishing the restriction. BW was measured individually, FI per cage was measured weekly, and mortality was

recorded daily. In addition, BWG and FCR were calculated. At the end of the experiment (at 11 weeks of age), the rabbits were transported to a slaughterhouse 200 km from the farm and slaughtered after 6 hours of starvation. The carcasses were chilled in a room at 4°C for 24 hours. The slaughtering and cutting of carcasses were processed according to the recommendation of the World Rabbit Science Association (WRSA) (*Blasco and Ouhayoun, 1996*).

Data were evaluated by one-way analysis of variance using the SPSS 10.0 software using Tukeys's test. The mortality of the groups was compared with the chi² test.

RESULTS

Rabbits of the RF groups consumed slightly different amounts of feed than planned (*Table 2*). This may be due to the calculation method (based on the previous 3-4 days intake) and a lower FI may also change since the onset of diarrhea. Despite a one-week transition period, the following week, rabbits of RF groups consumed 17–19% more feed than those in the AL ($P < 0.001$). Their FI was slightly higher in the last week of the experiment, but the difference was no longer significant. FI may also have changed since the onset of the disease.

Table 2

Feed intake of growing rabbits fed *ad libitum* or restricted (g/day)

Age, weeks	Groups			SE	Prob.
	AL ¹	RF70 ²	RF65 ³		
5-6	96.5 ^c	73.3 ^b	63.8 ^a	1.83	<0.001
6-7	125 ^c	85.6 ^b	79.0 ^a	2.43	<0.001
7-8	154 ^b	126 ^a	126 ^a	1.74	<0.001
8-9	155	151	153	0.87	NS
9-10	149 ^a	174 ^b	177 ^b	2.34	<0.001
10-11	162	169	171	1.74	NS
5-11	140	129	126	2.18	<0.001

¹*Ad libitum*; ²Restricted feeding starting with 70% of *ad libitum* consumption; ³Restricted feeding starting with 65% of *ad libitum* consumption, ^{a, b, c} – values in rows with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

When the 100% feeding was over (weeks 8), the FI of rabbits in the two restricted groups increased to around 200 g on the first day and was about 190 g for the next two days. It also exceeded the FI of AL group in the latter days, ranging from 160 to 170 g (*Figure 1*).

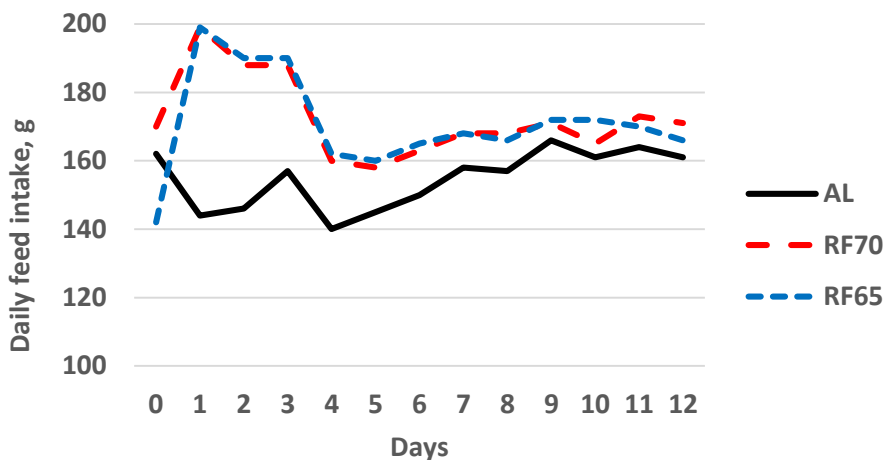


Figure 1. Daily feed intake of rabbits after finishing the restricted feeding period
AL: *Ad libitum*; RF70: Restricted feeding starting with 70% of *ad libitum* consumption; R65: Restricted feeding starting with 65% of *ad libitum* consumption; ^{a, b, c} P<0.05

Between 5 and 7 weeks of age, the BWG of RF70 and RF65 groups was lower by 40% and 47%, respectively, compared with AL rabbits. (Table 3). However, compensatory growth was observed in the next two weeks. There was already a slight difference with increasing FI in the week of the 90% consumption limit, but especially at 100% consumption. The BWG of RF70 and RF65 rabbits exceeded the AL group by 18 and 19%, respectively. There was no significant difference between the groups in the last week and during the entire fattening period (weeks 5-11).

Table 3

Weight gain of growing rabbits fed *ad libitum* or restricted (g/day)

Age, weeks	Groups			SE	Prob.
	AL ¹	RF70 ²	RF65 ³		
5-6	47.8 ^c	30.0 ^b	22.3 ^a	1.06	<0.001
6-7	47.6 ^b	27.7 ^a	28.1 ^a	0.83	<0.001
7-8	49.9 ^a	51.6 ^{ab}	53.5 ^b	0.46	0.006
8-9	45.3 ^a	53.4 ^b	54.1 ^b	0.84	<0.001
9-10	35.3 ^a	52.7 ^b	53.8 ^b	1.25	<0.001
10-11	38.1	38.4	40.5	0.53	NS
5-11	44.2	42.4	42.9	0.55	NS

¹*Ad libitum*; ²Restricted feeding starting with 70% of *ad libitum* consumption; ³Restricted feeding starting with 65% of *ad libitum* consumption, ^{a, b, c} – values in rows with different letters differ significantly (P<0.05)

During the stricter restriction period, up to 7 weeks of age, the difference in BW between the AL and the restricted fed groups increased (*Table 4*). The following week, the difference decreased slightly and then more significantly due to compensation, and at 11 weeks of age, the differences between groups (AL vs RF70 was 73g and AL vs. RF65 was 55g, $P < 0.1$) almost disappeared.

Table 4

Body weight of growing rabbits fed *ad libitum* or restricted (g)

Age, weeks	Groups			SE	Prob.
	AL ¹	RF70 ²	RF65 ³		
5	899	899	896	6.3	NS
6	1233 ^b	1109 ^a	1079 ^a	9.6	<0.001
7	1567 ^b	1303 ^a	1279 ^a	12.6	<0.001
8	1917 ^b	1664 ^a	1654 ^a	12.9	<0.001
9	2234 ^b	2038 ^a	2032 ^a	13.0	<0.001
10	2481	2407	2411	13.3	0.051
11	2710	2637	2655	14.1	0.095

¹*Ad libitum*; ²Restricted feeding starting with 70% of *ad libitum* consumption; ³Restricted feeding starting with 65% of *ad libitum* consumption, ^{a, b} – values in rows with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

FCR between the ages of 5 and 7 weeks were significantly worse in the RF groups than that of AL rabbits (*Table 5*), which may have been due to their very poor BWG. However, in the next two weeks, the AL group received 90 and 100% amount of feed, and in the week after switching to *ad libitum* feeding, when their BWG exceeded that of the AL group, RF70 and RF65 rabbits had significantly better FCR.

Table 5

Feed conversion ratio of growing rabbits fed *ad libitum* or restricted

Age, weeks	Groups			SE	Prob.
	AL ¹	RF70 ²	RF65 ³		
5-6	2.02 ^a	2.44 ^b	2.53 ^b	0.05	<0.001
6-7	2.61 ^a	3.10 ^b	2.81 ^a	0.06	<0.001
7-8	3.07 ^b	2.45 ^a	2.36 ^a	0.04	<0.001
8-9	3.42 ^b	2.86 ^a	2.83 ^a	0.05	<0.001
9-10	4.21 ^b	3.30 ^a	3.29 ^a	0.08	<0.001
10-11	4.26	4.40	4.23	0.06	NS
5-11	3.16	3.05	2.98	0.06	NS

¹*Ad libitum*; ²Restricted feeding starting with 70% of *ad libitum* consumption; ³Restricted feeding starting with 65% of *ad libitum* consumption, ^{a, b} – values in rows with different letters differ significantly ($P < 0.05$)

Between 5 and 6 weeks of age, only one rabbit from the AL and RF70 groups and three from the RF65 group died. However, one rabbit from the latter group also died between 6 and 7, and between 10 and 11 weeks of age, so the overall

mortality in the three groups (AL, RF70, and RF65) was 1.2%, 1.2%, and 6.1%, respectively.

Except for the perirenal fat weight, no significant difference was obtained among groups in BW at slaughter and in the weight of different body parts (Table 6). The dressing out percentage (DoP) of RF rabbits was 0.4-0.6% lower than that of the AL group (in the order of the table: 62.3%, 61.7%, and 61.8% based on warm carcass and 60.3%, 59.9%, and 59.7% for the chilled carcass, respectively) which may be since these rabbits received less feed during the intense growth phase of muscle tissue (Cantier *et al.*, 1969). The ratios of the fore part to the reference carcass were higher in AL rabbits (24.0%, 23.5%, and 23.5% in AL, RF70, and RF65, respectively), and the ratios of the hind part were higher in the RF groups (31.4%, 31.7% and 32.0% in AL, RF70, and RF65, respectively). In contrast, the ratio of the intermediate part did not differ. The weight of perirenal fat and its ratio to reference carcass (1.34%, 1.34%, and 1.07%) in RF65 rabbits was significantly lower than in the other two groups.

Table 6

Carcass traits of growing rabbits fed *ad libitum* or restricted (g)

Traits	Groups				Prob.
	AL ¹	RF70 ²	RF65 ³	SE	
Body weight at slaughter	2679	2645	2649	11.2	NS
Warm carcass	1670	1632	1636	8.6	NS
Chilled carcass	1615	1585	1582	9.1	NS
Fore part of the carcass	387	372	371	3.1	NS
Intermediate part of the carcass	437	434	425	4.6	NS
Hind part of the carcass	507	503	506	3.8	NS
Perirenal fat	21.6 ^b	21.3 ^{ab}	16.9 ^a	0.8	0.029

¹*Ad libitum*; ²Restricted feeding starting with 70% of *ad libitum* consumption; ³Restricted feeding starting with 65% of *ad libitum* consumption, ^{a, b} - values in rows with different letters differ significantly (P<0.05)

DISCUSSION

In our experiment, after the restriction, FI increased abruptly, and BWG and FCR improved from the period of 80% of AL. At the end of the fattening period, compensation was almost complete. Concerning the whole fattening period, FI decreased significantly, and FCR improved slightly compared to the AL group.

The worsen FCR between the ages of 5 and 7 weeks in the RF groups may be due to the relative change in proportion of maintenance energy needs in the daily ration. A substantial amount of energy was needed to cover maintenance from dietary energy supply in RF treatment, much higher rate than in AL

group, thus a very poor BWG was obtained in restricted rabbits. According to the review of *Gidenne et al.* (2012) after weaning (during the restricted period), BWG decreased in parallel with FI. FCR improved in several cases or did not change significantly but sometimes even deteriorated. After the transition to *ad libitum* feeding, FI varied, increased, decreased, or remained unchanged. Nevertheless, BWG of RF rabbits increased in almost all cases; the tighter the restriction, the greater the compensatory growth. FCR clearly improved. For the entire fattening period, both FI and BWG decreased; there was no full compensation. However, the FCR of RF rabbits improved in all cases.

An interesting feature of the experiment by *Alabiso et al.* (2017) was that the effect of feed restriction was studied with both medicated and non-medicated feed. FI was limited to 65% compared to AL rabbits for three weeks after weaning. The experiment lasted longer than usual and ended at 92 days of age. BWG was significantly reduced during the restriction period. Although the order of the groups reversed after *ad libitum* feeding, this was not enough to compensate for their weight loss. This may be partly because AL rabbits consumed more feed during this period, i.e., the better BWG of the RF groups was clearly due to the better FCR. Finally, there was a significant difference in BW at 92 days of age: 2839 g and 2826 g in the RF rabbits of non-medicated and medicated groups, respectively, and 2977 g and 2971 g in the AL group (non-medicated and medicated, respectively). It was irrelevant whether rabbits consumed medicated or non-medicated feed. The results show that five weeks of *ad libitum* feeding were short for compensation. *Birolo et al.* (2020) limited FI in time: they reduced the eating time to 14 hours after weaning and then to eight hours with a gradual reduction of five days, which remained unchanged for eight days. After that, eating time was increased by one hour per day for 15 days, remaining 24 hours until the end of the experiment, at 71 days of age. In practice, this meant that FI decreased from 80% to 65% in the first five days compared to AL rabbits and then to 78% in three days, which did not change for five days, and it increased to 100% in the next three days. Thus, the average daily feed consumption did not differ much from our experiment. During strict restriction, two weeks after weaning, the FI of FR rabbits was 24% lower than in the AL group. Due to the continuous increase in eating time over a long period, FI never rose above the AL group, so the digestive system was not overloaded. This phenomenon could be hazardous because feed usually switches from medicated to non-medicated during this period, critical for digestive diseases. BWG of RF rabbits decreased compared to the AL group in the first two weeks, and then a compensatory growth was observed in the next two weeks, partly due to improved FCR during this period. Compensation was incomplete

because the difference in BWG was significant throughout the fattening period (31-73 days) (47.7 g and 46.5 g), and the BW was 2819 g and 2767 g at 73 days of age in the two groups. *Gidenne et al.* (2003), *Gidenne and Feugier* (2009) and *Gidenne et al.* (2009) also restricted FI to 60, 70, 80, and 90% and 60, 70, and 80%, respectively. The experiments lasted until 11 and 10 weeks of age. After weaning, BWG decreased in proportion to FI, but there was no difference in FCR. Rabbits could only partially compensate for lower BWG during the restriction period after switching to *ad libitum* feeding. As there was no difference in FI during this period, better FCR may have played a role. Only at 90 and 80% restriction did the difference between the AL and restricted groups decrease as much as our experiment.

The 70% limit for two or three weeks seems too strict and long, and there was not enough time for compensation. By giving two different feeds, *Knudsen et al.* (2017) set the eating time so that RF rabbits could consume 75% of the AL group for four weeks after weaning. During this period, BWG decreased significantly, and FCR improved. During the *ad libitum* feeding period, FI increased by 14-17%, BWG by 22-27%, and FCR also improved. During the whole period, the results developed as expected. Although the compensation was not complete, the FI decreased significantly and FCR spectacularly. According to *Crepso et al.* (2020), who restricted FI to 80 and 70% of the *ad libitum* level, BWG decreased, and FCR deteriorated in parallel with FI. FI increased as a result of *ad libitum* feeding, but even more BWG and, as a result, improved FCR. The compensation was not complete in their case either, the 61-day BW was 2122, 2085, and 2019 g, respectively, but this required less feed and improved FCR. Even in our experiment, the BWG and FCR of RF rabbits improved when their consumption reached 80% of the AL group. Organic matter and protein digestibility of restricted-fed rabbits may also have played a role in the result (*Gidenne et al.*, 2012). We demonstrated that FI increased abruptly and significantly exceeded the AL group for a few days in the week after the restriction. Before switching to *ad libitum* feeding, weekly consumption levels in the RF groups were similar to that of the AL rabbits. Overall, it seems a good solution to reduce FI sharply in the two weeks after weaning and then increase FI weekly. Based on the experiment of *Birolo et al.* (2020), an even more gradual transition would be beneficial. However, in another experiment, *Birolo et al.* (2021) did not receive any differences between the slow and fast refeeding groups. In the case without a transition, FI may suddenly increase (*Thwaites*, 1989), overloading the digestive system and sometimes causing diarrhea and death in more severe cases.

In our experiment, only the RF65 group had significantly higher mortality. Since the mortality of the AL and RF70 groups was completely identical, it cannot be demonstrated that the feeding method affected mortality. In the experiment of *Birolo et al.* (2020), although more rabbits died from the RF group than in the AL group (10.9% and 6.6%), the difference was insignificant. While we increased the FI weekly in the RF groups, *Birolo et al.* (2020) moved very slowly to 24-hour feeding by increasing the feeding time with one hour per day.

Alabiso et al. (2017) observed no difference in mortality between rabbits consuming medicated and non-medicated feed during the restriction period, but mortality was significantly reduced in both groups compared to AL rabbits. There was no difference in mortality after switching to *ad libitum* feeding. Although 4-7% fewer rabbits died in the RF groups throughout the fattening period, this could not be statistically confirmed. In the *Pascual et al.* (2021) experiment, both AL and RF groups had lower mortality when rabbits were given medicated feed. However, the mortality in RF groups was not significantly reduced in either the medicated or non-medicated group throughout the fattening period. *Gidenne et al.* (2009) found that a 30 and 40% reduction in FI significantly reduced mortality, but there was no longer any difference between groups during *ad libitum* feeding. Throughout the whole experimental period, only the difference between the 20% and 40% vs. 10% reductions was significant. *Knudsen et al.* (2017) recorded 14.7% and 12.9% mortality in feeding the diet without antibiotics and coccidiostat during the restriction period (AL groups) and 7.7% and 8.8% in the RF groups (75% of *ad libitum* level). As mortality was around 1% in each group during the *ad libitum* feeding period, the difference was significant between the groups for the entire fattening period. In the experiment of *Crepso et al.* (2020), RF rabbits were given 80 and 70% of the feed consumed by the AL group after weaning. They did not find significant differences between groups during either restriction or *ad libitum* feeding period. According to the previous result, it can be concluded that the effect of feed restriction generally reduced mortality after weaning. Still, this difference remained or even reduced over the whole period, indicating that the switch to *ad libitum* feeding increased mortality in several experiments (*Gidenne et al.*, 2012). This phenomenon could be due to the discontinuation of feeding medicated feed and the sudden increase in consumption after the switch, which could be due to digestive overload.

In our experiment, DoP based on warm and chilled carcass was reduced by 0.4–0.6% in the RF groups compared to AL rabbits was likely due to a limited muscle development by the lower feed consumption during the intensive

growth phase of muscle tissue. *Alabiso et al.* (2017) report slightly lower DoP in RF rabbits, but the difference was insignificant. *Birolo et al.* (2020) and *Gidenne et al.* (2009) also received 0.5% and 0.7-1.4% lower DoP in the RF groups. In rabbits fed a limited amount of feed after weaning, DoP may be reduced because after switching to *ad libitum* feeding, they can consume more feed than the AL rabbits, resulting in a higher proportion of the full gastrointestinal tract. This is evidenced by the experiment of *Alabiso et al.* (2017), who received significantly higher content in the gastrointestinal tract. In contrast, *Crepso et al.* (2020) found no difference in either ratio of the gastrointestinal tract or DoP.

The differences in the ratios of different parts of the reference carcass are not clear. In our experiment, the ratio of fore part increased in RF rabbits compared to AL group. However, in the experiment of *Alabiso et al.* (2017), it decreased slightly in the medicated group and significantly in the non-medicated group. A similar tendency was found in the proportion of the hind part, which increased in our trial and decreased in the experiment of *Gidenne et al.* (2009). For the middle part, no one noticed any change.

Logically, the rabbits fed restricted diets (RF65 group) have lower body fat deposition. Still, it is also possible that the better BWG during the compensation period is accompanied by a higher rate of fat deposition (RF70 group). Based on the majority of experiments (*Gidenne et al.*, 2012), it is clear that the amount of fat depot and its ratio to carcass weight decrease as a result of post-weaning restriction, even if it was not significant in all cases (*Gidenne et al.*, 2009; *Alabiso et al.*, 2017). The greater the severity and the longer the feed restriction, the more significant the decrease (*Perrier*, 1998). The former is in line with our experiment, in which the RF65 group showed a significant reduction in weight and percentage of perirenal fat. In any case, it is beneficial that the rabbits build up less abattoir-loss fat from their feed.

CONCLUSIONS

According to the feed restriction method used in the experiment, giving 70% of the AL group in the two weeks after the weaning, then increasing the feed ration by 10% per week and adding a transition period of one week before *ad libitum* feeding, we obtained a favorable result. Although the compensation was not completed, the rabbits consumed less feed, the FCR improved, mortality was low, and there were minor differences in slaughter traits. The method could be further refined with less stringent restrictions after weaning and a more prolonged one-week compensation (*ad libitum* feeding). It would also be advisable to investigate this method using non-medicated feed.

REFERENCES

- Alabiso, M., Di Grigoli, A., Mazza, F., Maniaci, G., Vitale, F., Bonanno, A. (2017) A 3-week feed restriction after weaning as an alternative to a medicated diet: effects on growth, health, carcass and meat traits of rabbits of two genotypes. *Animal*, 11(9), 1608–1616. DOI: [10.1017/S175173111600269X](https://doi.org/10.1017/S175173111600269X)
- Birolo M., Trocino A., Tazzoli M., Xiccato G. (2017) Effect of feed restriction and feeding plans on performance, slaughter traits and body composition of growing rabbits. *World Rabbit Sci.*, 25, 113-122. DOI: [10.4995/wrs.2017.6748](https://doi.org/10.4995/wrs.2017.6748)
- Birolo M., Trocino A., Zuffellato A., Xiccato G. (2020) Effects of time-based feed restriction on morbidity, mortality, performance and meat quality of growing rabbits housed in collective systems. *Animal*, 14, 626-635. DOI: [10.1017/S1751731119002283](https://doi.org/10.1017/S1751731119002283)
- Birolo M., Trocino A., Zuffellato A., Xiccato G. (2021) Performance, mortality and slaughter traits of group-housed rabbits submitted to different time-based feed restriction programs. Proc. 12th World Rabbit Congress, Nantes, France, Comm. F-02
- Blasco A., Ouhayoun J. (1996) Harmonization of criteria and terminology in rabbit meat research. Revised proposal. *World Rabbit Sci.*, 4, 93-99. DOI: [10.4995/wrs.1996.278](https://doi.org/10.4995/wrs.1996.278)
- Cantier A., Vezinhet R., Rouvier R., Dauzier L. (1969) Allometrie de croissance chez le lapin (*O. cuniculus*). 1. Principaux organes et tissus. *Ann. Biol. Anim. Biochim. Biophys.* 9, 5-39.
- Crespo R., Alfonso C., Saiz del Barrio A., Garcia-Ruiz A.I., Marco, M., Nicodemus N. (2020) Effect of feed restriction on performance, carcass yield and nitrogen and energy balance in growing rabbits. *Livest. Sci.*, 241, 104278 DOI: [10.1016/j.livsci.2020.104278](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104278)
- Gidenne T., Feugier A. (2009) Feed restriction strategy in the growing rabbit. 1. Impact on digestion, rate of passage and microbial activity. *Animal*, 3, 501–508. DOI: [10.1017/S1751731108003789](https://doi.org/10.1017/S1751731108003789)
- Gidenne T., Feugier A., Jehl N., Arveus P., Boisot P., Briens C., Corrent E., Fortune H., Montessuy S., Verdelhan S. (2003) Un rationnement alimentaire quantitatif postsevrage permet de réduire la fréquences des diarrhées, sans dégradation importante des performances de croissance: résultat d'une étude multi-site. *Proc. 10èmes Journ. Rech. Cunicole*, Paris, 29-32.
- Gidenne T., Combes S., Feugier A., Jehl N., Arveux P., Boisot P., Briens C., Corrent E., Fortune H., Montessuy S., Verdelhan S. (2009) Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal*, 3, 509-515. DOI: [10.1017/S1751731108003790](https://doi.org/10.1017/S1751731108003790)
- Gidenne T., Combes S., Fortun-Lamothe L. (2012) Feed intake limitation strategies for the growing rabbit: effect on feeding behaviour, welfare, performance, digestive physiology and health: a review. *Animal*, 6, 1407-1419. DOI: [10.1017/S1751731112000389](https://doi.org/10.1017/S1751731112000389)
- Knudsen C., Combes S., Briens C., Coutelet G., Duperray J., Rebours G., Salaun J-F., Travel A., Weissman D., Gidenne T. (2017) Substituting starch with digestible fiber does not impact on health status or growth in restricted fed rabbits. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 226, 152-161. DOI: [10.1016/j.anifeedsci.2017.01.002](https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.01.002)
- Nielsen S.S., Alvarez J., Bicout D.J., Calistri P., Depne K. et al. (2021) Health and welfare of rabbits farmed in different production systems. Scientific opinion. *EFSA Journal*, 18(1), 1-96. DOI: [10.2903/j.efsa.2020.5944](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5944)
- Pascual M., Martin E., Fabre C., Garreau H., Gilbert H., Piles M., Sánchez M.I., Sánchez J.P. (2021) Is feed restriction an alternative to the use of antibiotics in non-controlled environment farms? Proc. 12th World Rabbit Congress, Nantes, France, Comm. F-13
- Perrier G. (1998) Influence de deu niveaux et deux durées de restriction alimentaire sur l'efficacité productive du lapin et les caractéristiques bouchées de la carcasse. *Proc. 7ème Journ. Rech. Cunicole*, Lyon, 179-182.

- Szendrő Zs., Szabó S., Hullár I. (1988) Effect of reduction of eating time on production of growing rabbits. Proc. 4th World Rabbit Congress, Budapest, 104-114.
- Thwaites C.J. (1989) Growth, feed and water intake after feed or water restriction in the New Zealand White rabbits. J. Appl. Rabbit Res., 12, 86-89.
- WRC (2021) <http://world-rabbit-science.com/WRSA-Proceedings/Congress-2021-Nantes/Nantes-2021-01.htm>



© Copyright 2022 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

Halakat érintő daganatos megbetegedések

HOITSY Márton^{1*}, GÁL János², BASKA Ferenc²,
MOLNÁR Tamás Gergely¹

¹Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Molekuláris Ökológia Tanszék, 2100 Gödöllő, Páter Károly utca 1.

²Állatorvostudományi Egyetem, Egzotikusállat- és Vadegészségügyi Tanszék, 1078 Budapest, István utca 2.

ABSTRACT – Neoplastic diseases of fish (A review)

Author: Márton HOITSY^{1*}, János GÁL², Ferenc BASKA², Tamás Gergely MOLNÁR¹

Affiliation: ¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Aquaculture and Environmental Safety, Gödöllő Páter K. str. 1., H-2100. Hungary; ²University of Veterinary Medicine, Department of Exotic Animal and Wildlife Medicine and Clinic, H-1078 Budapest, István street 2. Hungary

Neoplastic diseases of fishes are an important topic in the aquatic veterinarian field. The neoplastic malformations are affected the fish species from the early stage of evolution. Nowadays the aquaculture industry is one of the most important food sources. The healthcare of the animals is of great importance in fish farms. Especially the brood stocks have a significant value on the farms, therefore the prevention of illnesses is crucial. The koi and other pet fish could also have tumours. The animals of the hobby keepers are also valuable. The neoplasms can develop from any organ in the fish. The investigation of tumours growing in fish is considered an important field of both human and veterinary research also.

Keywords: fish, diseases, tumour, neoplasia

HALAK DAGANATOS MEGBETEGÉDÉSEI

A daganatos megbetegedések valószínűleg a növényi és állati szervezetekkel együtt fejlődtek az evolúció során. Az első irodalmi adat az Ebers-papiruszban található daganatos megbetegedésről, mely megközelítőleg i.e. 1600 évek környékén íródhatott (*Lesnik és Vrtiak*, 1980). Régészeti ásatások során is kerültek elő állatok daganatos elváltozásaikkal együtt megkövesedve (*Capasso*, 2022; *Capasso*, 2005). A halakban előforduló daganatos megbetegedéseknek számos kiváltó oka lehet. Az elváltozások nem csak díszhalakban, hanem akvakultúrában nevelt és tenyésztett állatokban is megtalálhatóak (*Brocca és mtsai.*, 2021; *Gordon és Smith*, 1938; *Rahmati-Holasoo és mtsai.*, 2018; *Sirri és*

*CORRESPONDING AUTHOR

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Kaposvári Campus

✉ 7400 Kaposvár, Guba Sándor u. 40., ☎ 82/502-011; 82/502-020

E-mail: hoitsym@gmail.com

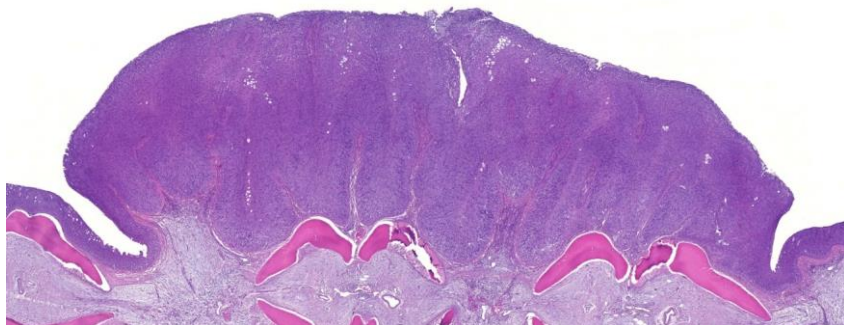
mtsai., 2010). Tumorok kialakulását előidézhetik az emberi tevékenység következtében a vizekbe jutott szennyezőanyagok, toxinok, a környezetben is előforduló, a táplálékba, tápokba bekerülő mikotoxinok, vagy akár onkogén vírusok is (Black és Baumann, 1991; Noga, 2010).

Hámeredetű neoplasztikus elváltozások

A bőr daganatos elváltozásai

Papillómák, mint jóindulatú, epitheliális eredetű elváltozások számos halfajon előfordulhatnak. Megtalálhatóak édesvízi, valamint tengeri környezetben élő és anadrom fajokon is (Noga, 2010; Roberts, 2012). A változatos méretű és alakú elváltozások a bőr felületén ellapulhatnak, alig kiemelkedve a felszínéből, vagy akár nyelezen lóghatnak is róla (Roberts, 2009). A halak testén bárhol megjelenhetnek. Eredetüket tekintve kiindulhatnak traumás, mechanikai sérülésekből, de okozhatják őket akár vírusok is (Gál és mtsai., 2018; Roberts, 2009; Roberts, 2012). A traumás elváltozásokból kiinduló papillómák gyakran a bőr kötőszövetes részeit ért stimulusok hatására indulnak növekedésnek (Amlacher, 1961; Gál és mtsai., 2018; Peters és Watermann, 1979). Vírusos eredetű papillomatosisok számos esetben kerültek leírásra halakból. A legtöbb esetben papilloma vírusok állnak az elváltozások hátterében, de kimutattak már herpeszvírus okozta daganatot is (Noga, 2010; Roberts, 2012).

Az akvakultúrában nevelt pontyokon (*Cyprinus carpio*, Linnaeus, 1758), valamint a hobbi tartók körében népszerű díszpontyokon, vagy más néven koiokon egyaránt megfigyelhető a pontyhimlő. Az elváltozást az *Alloherpesviridae* víruscsoportba tartozó cyprinid herpesvirus-1 okozza, amelynek kártétele során az epidermis hyperplasiája figyelhető meg. A szürkésfehér, gyertyaviaszra emlékeztető, le nem kaparható, kocsonyás tapintatú növedékek a test egészén megjelenhetnek (Molnár és Baska, 2017; Roberts, 2009). A hőmérséklet emelkedésével és az immunrendszer erősödésével a tünetek rendszerint elmúlnak. A betegség ritkán vázrendszeri deformitásokhoz és csökkent növekedéshez vezethet a jelenlétük. Elhullást általában nem okoznak. A diagnózis a bőrelváltozások alapján állítható fel, amelyet kórszövettani és molekuláris biológiai módszerek erősíthetnek meg (1. ábra) (Molnár és Baska, 2017; Noga, 2010).

500 μ m

1. ábra. Cyprinid herpesvirus-1 okozta hyperplastikus elváltozás a hámban Hematoxinilín-Eozin, (17X) Bar: 500 μ m (Fotó: Hoitsy)

Az európai angolna (*Anguilla anguilla*, Linnaeus, 1758) stomatopapillosisa, vagy más néven karfiol betegsége az állatok szájának környékén, az alsó és felső állkapocs tájékán, ritkán a fej egyéb részein, az úszókon és a testen fordul elő (Molnár és Szakolczai, 1980; Roberts, 2012). Eredete egyelőre pontosan nem tisztázott, a háttérben környezeti szennyezések, valamint vírusok állhatnak. Az angolna bőrén megfigyelt elváltozásokból herpeszvírus-szerű képletek kerültek kimutatásra elektronmikroszkópos vizsgálattal (Békési és mtsai, 1986). Az epitheliális növedékek színe szürkés árnyalattól kezdve egészen a feketéig változhat. A daganatok növekedése függ a hőmérséklettől, és a nyár vége felé az elváltozások regressziója, vagy akár nekrozisa is megfigyelhető (Peters és Peters, 1978).

Az Alloherpesvírusok családjába négy, lazacféléket megbetegítő herpeszvírust foglal magába (URL1; Hanson és mtsai, 2016; Walker és mtsai, 2020; Yoshimizu és mtsai, 1995), melyek közül a salmonid herpeszvírus-2,-3 és-4 jelentős veszteségekkel járhat, és hyperlasiás vagy daganatos elváltozásokat okozhatnak a fertőzött állatokban (Noga, 2010).

A salmonid herpeszvírus-2 (SalHV2) Ázsiából, pontosabban Japánból került leírásra lazacfélékben (Yoshimizu és mtsai, 1995). A vírust Masu lazacból mutatták ki (Kimura és mtsai, 1981). A SalHV 2 megfertőzhető ketalazacokat (*Oncorhynchus keta*, Walbaum, 1792), ezüstlazacot (*Oncorhynchus kisutch*, Walbaum, 1792), vörös lazacot (*Oncorhynchus nerka*, Walbaum, 1792), japán lazacot (*O. masou*, Brevoort, 1856) és a szivárványos pisztrángot (Kimura és mtsai,

1983; *Yoshimizu és mtsai.*, 1987). Az elváltozásnak két formája ismert. A SalHV2 lehet patogén és onkogén is (*Yoshimizu és mtsai.*, 1993). A fertőzésen átesett halakon tumorok alakulhatnak ki. A daganatok a felső és az alsó állkapocs területén fejlődnek. Karcinómák kialakulását figyelték meg továbbá a szem szaruhártyáján, a kopoltyúfedőkön, a vesében és a farokúszókon. A vírus az ivartermékekkel együtt ürül (*Horiuchi és mtsai.*, 1989; *Kimura és mtsai.*, 1981; *Yoshimizu és mtsai.*, 1987).

A salmonid herpesvirus-3 (SalHV3) által okozott epizootikus epitheliotropikus megbetegedés során epidermális hyperplasia figyelhető meg (*Hanson és mtsai.*, 2016). A fertőzött halak koordinátatlanul mozognak, nyugtalanok, dugóhúzó szerű úszásmintázatot mutatnak a betegség klinikai fázisában (*Bradley és mtsai.*, 1989; *Sano*, 1988). Az elváltozás kórszövettani vizsgálata során az epidermális sejtek hypertrophiája, hyperplasiája, valamint elhalások láthatók (*Bradley és mtsai.*, 1989). Horizontális és vertikális ürülés is megfigyelhető a SalHV3 esetében. *Kurobe és mtsai* (2009) igazolták a vertikális fertőzést azáltal, hogy megtalálták a vírus DNS-ét az ivartermékekben (*Bradley és mtsai.*, 1989; *Kurobe és mtsai.*, 2009).

A jóindulatú elváltozások közé tartozik az atlanti lazacok salmonid herpesvirus-4 (SalHV4) által okozott papillomatosisa is, amely egy proliferatív bőrbetegség. Ez a vírus is az alloherpeszvírusok közé tartozik a többi salmonid herpeszvírussal együtt (*Hanson és mtsai.*, 2016). A kórokozó atlanti lazacban és tengeri környezetben nevelt szivárványos pisztrángban okoz megbetegedést amikor a víz hőmérséklet eléri a 10–16°C-ot (*Bylund és mtsai.*, 1980; *Doszpoly és mtsai.*, 2013; *Roberts és Bullock*, 1979). A papillomatosis önmagában alacsony mortalitási rátával rendelkezik (*Carlisle és Roberts*, 1977). A bőr kóros elváltozásai a test háti régióján, az oldalakon, az úszókon, valamint a farktőn látszanak. A papillómák kórszövettani vizsgálata során hyperplasiás epitheliális sejteltváltozások, a nyálkatermelő sejtek számának csökkenése, valamint a szöveti struktúrák felbomlása volt megfigyelhető (*Doszpoly és mtsai.*, 2013). A korábbi kutatások során vírusszerű partikulákat figyeltek meg a papilloma sejtek transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálata során (*Carlisle és Roberts*, 1977; *Shchelkunov és mtsai.*, 1992). A SalHV-4 vírus faj még elfogadásra vár a Nemzetközi Vírustaxonomiai Szövetség által, feltételezhetően a *Salmonivirus* genusba fogják besorolni (*URL1; Hanson és mtsai.*, 2016)

A karcinómák a papillómáknál ritkábban fordulnak elő. Ezek a rosszindulatú daganatok szinte bármelyik halfajban kialakulhatnak. Leggyakrabban az

ajkak és a száj nyálkahártyája lehet érintett, de előfordulhatnak a kültakaró más részein is (Noga, 2010; Roberts, 2012). Külső szemlélő számára hasonlóak lehetnek a papillómákhoz, és eredetük akár vissza is vezethető egy papillómára. Károkozásuk nyomán a bőrben eróziók vagy akár fekélyek is kialakulhatnak (Fitzgerald és mtsai., 1991; Roberts, 2009). Laphámsejtes karcinómát írtak már le naphal hibridből (*Lepomis cyanellus x Lepomis macrochirus*). A daganat nemcsak az izomréteget infiltrálta, hanem áttétet is képzett a májban (Fitzgerald és mtsai., 1991). Számos más halfajban is találtak laphámsejtes karcinómát, úgy mint törpeharcsában (*Ameiurus nebulosus*, Lesueur, 1819), fénékjáró küllőben (*Gobio gobio*, Linnaeus, 1758) és *Brevoortia patronus* fajban (Goode, 1878) (Fournie és mtsai., 1987; Mawdesley-Thomas és Bucke, 1967).

Az északi süllő (*Sander vitreus*, Mitchell, 1818) bőr szarkómáját a *Retroviridae* családba tartozó vírus okozza (Schoch és mtsai., 2020; Walker, 1969). A kifejlett állatok kültakaróján a stratum spongiosumból kinduló multifokális daganatot a publikációban jóindulatúként említik. Az elváltozás kialakulása során rózsaszínes csomók láthatók a bőr külsején, amelyek szezonalitást mutatnak (Bowser és mtsai., 1988; Coffee és mtsai., 2013).

A kopolytú és az úszóhólyag neoplasztikus megbetegedései

A kopolytúdaganatok közül a branchioblastoma kísérletesen indukálható volt kémiai módszerekkel japán rizshalban (*Oryzias latipes* Temminck és Schlegel, 1846) és mexikói kardfarkú hal hibridekben is (Brittelli és mtsai., 1985; Kimura és mtsai., 1984). A branchioblastomát már koiból is leírták, mely során exophthalmiát, ödémát, és a kopolytú dorsalis részén szövethövelkedést figyeltek meg. A jóindulatú elváltozás a kopolytú kötőszövetes állományából fejlődhetett ki (Wildgoose és Bucke, 1995). A szivárványos pisztráng kopolytúján bél daganatok áttétképződéséből fejlődhet ki adenokarcinoma (Hoitsy és mtsai., 2021). A kopolytút érintő daganatok hatással lehetnek az állatok légzésére, ezáltal akár elhullást is okozhatnak (Roberts, 2012).

A kopolytú daganataitól valamelyest elkülönülnek az első, csökevényesedett kopolytúíven kialakuló, a pseudobranchiális szervből eredő adenomák. A tumor leírásra került atlanti tőkehalban (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758). Leggyakrabban fiatal állatokban fordul elő (Roberts, 2012). Az elváltozásokat normál epidermis fedi, jól ereztettek, színezetük általában sötét vöröses. Ahogy növekszik, úgy válik lebenyezetté és sárgás színezetűvé. A daganat akár mindkét oldalon, szimmetrikusan is kialakulhat, az 50%-uk általában a kopolytúfedő

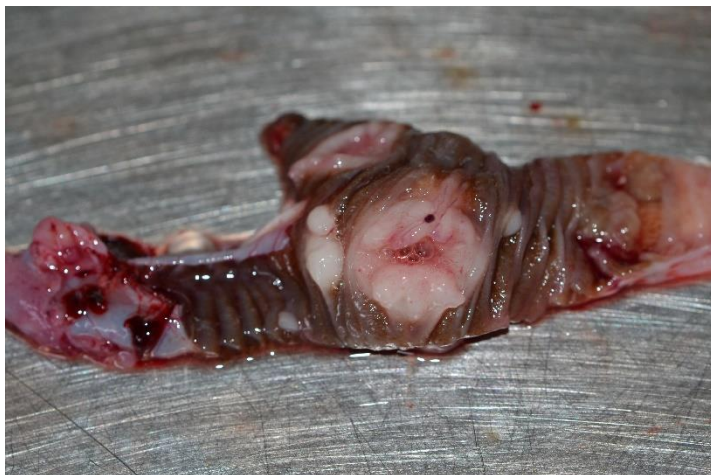
dorsolateralis részén figyelhető meg. A magányosan álló tumorok megfigyelhetőek az orr körül, de akár a kopoltyúívek között is (*Watermann és mtsai*, 1982; *Watermann és Dethlefsen*, 1982).

Az úszóhólyagban kialakuló daganatok viszonylag ritkának számítanak. A japán rizshal, vagy medaka úszóhólyag daganata az úszóhólyag gázmirigy epitheliumából indult ki. Az ott kialakult adenoma úszási nehézségeket és gerinc deformitásokat okozott (*Furukawa és mtsai*, 2021b, 2021a). Hasonlóan gázmirigy eredetű daganatokat (adenóma, adenokarcinóma) írtak le többek között egyenes csikóhalból (*Hippocampus erectus*, Perry, 1810), fiatal atlanti tőkehalból (*Gadus morhua*, Linnaeus, 1758), valamint szivárványos guppiból (*Poecilia reticulata*, Peters, 1859) és killikből (*Nothobranchius furzeri*, Jubb, 1971; *N. kadleci*, Reichard, 2010; *N. orthonotus*, Peters, 1844) (*Dyková és mtsai*, 2020; *Stilwell és mtsai*, 2018; *Stolk*, 1957; *Zhuravleva és mtsai*, 2011).

Gastrointestinalis rendszert érintő tumorok

Bár a daganatok előfordulása egyre gyakoribb halakban, tanulmányozásuk mégis a kezdeti szakaszban jár. Az emésztő rendszer neoplasztikus elváltozásai ritkán fordulnak elő (*Roberts*, 2012). *Kimura és mtsai* (1976), valamint *Kubota és mtsai* (1974) adenomatózus polipokat figyeltek meg mesterséges körülmények között keltetett szivárványos pisztrángokban, akvakultúrában nevelt *Elagatis bipinnulata* fajban (*Quoy és Gaimard*, 1825), vörös tengeri sügérben (*Pagrus major*, Temminck és Schlegel, 1843), japán angolnában (*Anguilla japonica*, Temminck és Schlegel, 1846). A polipszerű növedékek a gyomor mucosa rétegéből indultak ki. A kialakulásuk hátterében a kutatók takarmány eredetű aflatoxinok jelenlétét, valamint az érdes, durva felületű takarmányszemet feltételezik (*Kimura és mtsai*, 1976; *Kubota és mtsai*, 1974). Óriás fűrészes sügérben (*Epinephelus itajara*, Lichtenstein, 1822) szintén papilloma került leírásra a gyomorból (*Shields és Popp*, 1979). Nigrelli pedig horgászhalban talált fibroszarkómáról számolt be kutatásában (*Nigrelli*, 1947). Bél eredetű adenokarcinómák előfordulása nem ritka halakban. Tőkehalban a rectumból kiinduló elváltozást figyeltek meg. Szivárványos pisztrángban a gastrointestinalis rendszerből kiinduló, majd metasztázist képző adenokarcinómákról számolt be több kutatócsoport is (*Dale és mtsai*, 2009; *Gombač és mtsai*, 2021; *Hoitsy és mtsai*, 2020; *Notash*, 2006). A bél különböző szakaszainak propria-mirigyeiből eredő daganatok az alaphártyát több helyen is áttörték. Beterjedtek a lumenbe, és részlegesen el is zárták azt (*Gombač és mtsai*, 2021; *Hoitsy*

és mtsai., 2020) (2. ábra). Laboratóriumi körülmények között tartott zebra daniókban (*Danio rerio*, Hamilton, 1822) adenokarcinómákat, tubuláris adenómákat és kissejtes karcinómákat találtak. Az elváltozások előfordulását tekintve nem volt különbség az ivarok és a különböző genetikai vonalak között, általában az 1 évesnél idősebb állatok produkálták az elváltozásokat (Paquette és mtsai., 2013).



2. ábra. Bél lumenébe betüremkedő daganat (Fotó: Hoitsy)

A máj neoplasztikus elváltozásai

A májban megfigyelhető elváltozások eredetük szerint két csoportra oszthatók. A májszövet eredetű daganatok magába foglalják az adenómákat, hepatómákat, karcinómákat, és a hepatocelluláris karcinómákat. A máj eredetű daganatok közül a hepatocelluláris karcinómák azon kevés, halakban előforduló tumorok közé tartoznak, amelyek áttétet képeznek (Noga, 2010; Roberts, 2012). Az epevezető epitheliumából kiinduló elváltozások között cholangioma és cholangiocarcinoma említhető meg. A májszövetből kiinduló daganatok már a korai fázisban könnyen felismerhetők a máj állományában lévő sárgás, fehéres granulomatózus elváltozásokról (Roberts, 2012). Az egyik legkorábbi feljegyzés az aflatoxin okozta hepatokarcinómáról szól, melyet szivárványos pisztrángban írtak le. A halak májában a gombatoxin által szennyezett takarmány okozta az elváltozásokat (Ayres és mtsai., 1971; Halver, 1962; Hendricks és mtsai., 1980). A gombák által termelt toxinok halak tápjába kerülve, vagy

nagy mennyiségben a vizükbe jutva daganatok kialakulását indukálják a májban, primer formában, amelyek metasztázist képezhetnek a vesében, a gyomorban és az úszóhólyagban. Az *Aspergillus* fajok által előállított aflatoxin B1, G1, M1, Q1 és aflatoxicol bizonyítottan karcinogén hatással bírnak szivárványos pisztrángban (Bailey és mtsai., 1996). További áttétképződést figyeltek meg a lépben is (Majeed és mtsai., 1984). Az elváltozás egészen addig rejtve marad, amíg kiterjedése miatt nem okozza a testüreg térfogatának megnövekedését vagy az állat elhullását. A díszhalakban található hepatomák képalkotó diagnosztikai módszerekkel való kimutatására is volt már példa (Garland és mtsai., 2002). A hepatoblastomák és karcinómák háttérében sokszor vegyi szennyeződések állnak (Falkmer és mtsai., 1976; Vogelbein és mtsai., 1999). A epeutakból kiinduló daganatok gyakran társulnak hepatomákhoz (Roberts, 2012). A cystadenoma a májban kisebb vagy nagyobb kavernózus cisztákat képezve alakul ki, amelynek hatására a máj megnagyobbodik. A ciszták üregében zöldes folyadék figyelhető meg. A királylazacban talált elváltozások a vizsgálatok alapján szórványosan jelentek meg az állományban (Lumsden és Marshall, 2003). Érdemes még megemlíteni a *Morone americana* (Gmelin, 1789) halfajban leírt cholangiomát, melynek háttérében a szennyezéstől kezdve, parazitákon át számos faktor játszhat közre (Bunton és Baksi, 1988).

A pajzsmirigy daganatos megbetegedései

A pajzsmirigyből kialakuló adenómák vagy adenokarcinómák számos halfajban előfordulhatnak. Fontos megemlíteni, hogy bizonyos fajokban nehéz elkülöníteni a golyvától, amelyet a jódszegény környezet és táplálék okoz (Fournie és mtsai., 2005; Roberts, 2012). Kísérletes jelleggel daganatot indukáltak kétféle karcinogén vegyülettel (7,12-dimethylbenz[a]anthracene, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine), melynek eredményeképp *Kryptolebias marmoratus* (Poey, 1880) halfajban, medakában, zebradánióban a pajzsmirigy neoplasztikus elváltozását figyelték meg (Chen és mtsai., 1996; Park és mtsai., 1993; Spitsbergen és mtsai., 2000).

Egyéb epithelialis daganatok

Halakban a hasnyálmirigy daganatos elváltozásai viszonylag ritkán fordulnak elő (Fournie és mtsai., 1988; Roberts, 2012). Érdes lepényhalban (*Platichthys flesus*, Linnaeus, 1758), és *Moxostoma valenciennesi* fajban (Jordan, 1885) pancreas adenóma, míg aranyhalban hasnyálmirigy karcinóma került leírásra

(*Fournie és mtsai*, 1988; *Otte*, 1964). Acináris daganatot (karcinóma, adenokarcinóma) mutatták ki aranyhalból, *Microgadus tomcod* fajból (Walbaum, 1792) és hibrid plattiból (*Fournie és mtsai*, 1988; *Nigrelli*, 1947).

A halak veséje is érintett a tumorok előfordulása terén. Tilápia (*Oreochromis spilurus*, Günther, 1894) veséjében *Haller és mtsai* (1980) eosinophil tubuláris adenokarcinómát, királylazacban *Lumsden és Marshall* (2003) vese adenokarcinómát írtak le (*Haller és Roberts*, 1980; *Lumsden és Marshall*, 2003). Az akváriumi halak sem lehetnek kivételek, ahogy arról *Petervary és mtsai* (1996) is beszámolnak a márványsügér (*Astronotus ocellatus*, Agassiz, 1831) vese gyűjtőcsatorna adenokarcinómájáról írodott tanulmányukban (*Petervary és mtsai*, 1996). Vicsegében (*Huso huso* × *Acipenser ruthenus*) előforduló nephroblastómáról számol be egy diagnosztikai tanulmány. Kezdetben az állatok testüreege megnagyobbodott, étvágyuk csökkent. Inaktívak voltak, sokat feküdtek a víztömeg alján. A kórszövettani vizsgálatok alapján a veséből kiinduló elváltozás embrionális hám eredetű differenciálatlan kötőszövetből és embrionális kötőszövetből tevődött össze. Metasztázist találtak a halak vázizomzatában, lépében és bőr alatti régióiban (*Rahmati-Holasoo és mtsai*, 2018). Hasonló nephroblastómáról számoltak be szivárványos pisztrángban is (*Odense és mtsai*, 1973).

A reprodukciós szervrendszerben előforduló daganatok szórványosan, de megtalálhatóak mind gazdasági haszonhalakban, mind pedig díszhalakban. A here neoplastikus elváltozásai közé soroljuk a szeminómákat, teratómákat, Leydig, illetve Sertoli sejtes tumorokat (*Noga*, 2010; *Roberts*, 2009; *Roberts*, 2012). Díszhalak közül ponty és aranyhal hibridjében találtak a herékben Sertoli sejtes daganatokat, koi megnagyobbodott testüreege pedig egy szeminómára hívta fel a figyelmet (*Leatherland és Sonstegard*, 1978; *Sirri és mtsai*, 2010). Ő királyifelség Masahito Herceg és munkatársai egy állatkertben tartott afrikai gőtehalban bukkantak szeminómára (*Masahito és mtsai*, 1984). A petefészeket számos daganatos elváltozás érintheti (*Noga*, 2010; *Roberts*, 2009). Ikrás díszpontyból thecomát távolítottak el műtétileg, amelyet kórszövettani és immunhisztokémiai módszerekkel azonosítottak (*Lewis és mtsai*, 2014). Szintén koiban fordult már elő differenciálatlan petefészek karcinóma is (*Raidal és mtsai*, 2006).

Néhány esetben leírtak már fogbimbó eredetű neoplastikus elváltozásokat (*Roberts*, 2012). Északi süllőben odontoma alakult ki a pharynx területén, és nagy kiterjedése miatt akadályozta az állatot a táplálkozásban és a légzésben

is (*Coffee és mtsai.*, 2012). Wellings lazacfélékben kialakult odontomákról és adamantinomákról számolt be, ez utóbbi növekedése során deformálta az állkapcsot is (*Wellings*, 1969).

Mesenchymális eredetű daganatok

Fibrómák és fibroszarkómák

A kötőszövetes eredetű daganatok általánosságban véve gyakori mesenchymalis tumortípusnak számítanak. Minden szervből kiindulhatnak, ahol megtalálható valamilyen rostos kötőszövet. Felépítésük szerint megkülönböztethetünk lágy és kemény fibrómákat. A jóindulatúnak számító fibrómák és a malignus, gyakran metasztázist képző fibroszarkómák szintén előfordulnak halakban (*Kardeván*, 1976; *Noga*, 2010; *Roberts*, 2009). Fogassüllőben leírásra került fibroszarkóma, mely az ivarérett állomány 5%-át érintette a vizsgálatok során (*Walker*, 1969; *Yamamoto és mtsai.*, 1976). Lazacfélék közül sebespisztráng testüregében találtak fibrómát. A daganat lebenyezett szerkezetű, kerekded rózsaszínes árnyalatú volt, és a belekhez csatlakozott vékony kötőszövetes nyéllal (*Kreyberg*, 1937). Tavi pisztrángban (*Salvelinus namaycush*, Walbaum, 1792) subcutan fibróma került leírásra (*Broughton és Choquette*, 1971). Az invazívabb fibroszarkómák akár az úszóhólyagban is előfordulhatnak. Kutatók beszámoltak már az atlanti lazac fibroszarkómával való úszóhólyag érintettségéről, mely során a szerzők onkogén vírusokat találtak molekulárisbiológia valamint elektronmikroszkóposmódszerrel a fibroszarkómák kialakulásának hátterében (*Bruno és mtsai.*, 2013; *Duncan*, 1978). Számos fajban, többek között ezüstlazacban és aranyhalban is találtak már subcutan szarkómákat (*Mawdesley-Thomas*, 1972; *Wellings*, 1969). Az aranyhalakban előforduló daganatok között is akadhat mesenchymális eredetű, mint például a haemangiopericytoma (*Morales és Schmidt*, 1991).

Lipómák

A lipómák a zsírszövetből eredeztethető, kötőszövetes tokkal határolt, jól körülírt daganatok, amelyek metszészlapja a kindulási szövetre jellemző képet mutat (*Kardeván*, 1976). Előfordulásukat tekintve halakban leírták már számos szövetben, többek között mezentériumban, májban és a bőralatti szövetekben is (*Roberts*, 2012). Kékúszójú tonhalban (*Thunnus thynnus*, Linnaeus,

1758) gyakorinak számító tumortípus a lipóma (Johnston és mtsai., 2008; Marino és mtsai., 2006). Csendes-óceáni laposhalban pedig fibrolipómát, valamint osteolipómát írtak le (Wellings, 1969).

Csont és porc eredetű daganatok

Halakban ritkán fordulnak elő a szilárdító vázrendszert érintő neoplasztikus elváltozások (Roberts, 2012). Amióta szilárd belső vázzal rendelkező élőlények élnek, a paleopatológusok feltételezése alapján daganatos elváltozások is kísérhetik őket az evolúciójuk során. Erre enged következtetni a Libanon területén talált *Pycnodontiformes* rendbe tartozó fiatal hal kövület notochordalis chondromának meghatározott elváltozása (Capasso, 2022). A porcszövet tipikus daganata a chondroma, amely tömötten rugalmas és opálosan fénylő, szürkésfehér metszéslappal rendelkezik. Az osteoma a csontszövet lassú növekedésű neoplasztikus elváltozása (Kardeván, 1976). Bíborsügérben (*Hemichromis bimaculatus*, Gill, 1862) az 1940-es években találtak osteochondromát (Nigrelli és Gordon, 1946). A szivárványos pisztráng kopolyáján növekvő chondroma benignus jellege miatt súlyos egészségkárosodást nem okoz, azonban a légzésben zavaró tényezőként szerepelhet (Bruno és mtsai., 2013). Tokalakúak közül a lapátorrú tokban írtak le kondroszarkómát. A daganat valószínűsíthetően az idős állat egyik vértjéből indult növekedésnek. A diagnosztikai vizsgálatok során a kórszövettani kép számos osztódó sejtet mutatott az éretlen porcszövetben (Bean-Knudsen és mtsai., 1987). Tengeri akvakultúrában nevelt aranydurbincs oszteokondromáját írták le, miután elhullást tapasztaltak az állományban. Az elváltozás valószínűleg befolyásolta a hal ozmoregulációját és légzését is (Nash és Porter, 1985). Daganatos elváltozással érintett *Hexagrammos decagrammus* egyedeket (Pallas, 1810) találtak állatkertben, mely a vizsgálatok alapján osteosarcomának bizonyult (Parker-Graham és mtsai., 2018).

Leiomyoma, leiomyosarcoma halakban

A simaizom tumorok kialakulását szintén megfigyelték különböző halfajokban. Leiomyomát találtak többek között aranyhalakon, farkassügér (*Dicentrarchus labrax*, Linnaeus, 1758) heréjében, de még díszpontyok szerveiben is (Natale és mtsai., 2020; Oryan és mtsai., 2015; Vergneau-Grosset és mtsai., 2016). Az atlanti lazacok úszóhólyag szarkómáját (leiomyosarcoma) malignus elváltozásként írták le, mely során tömött tapintatú csomók indulnak ki az úszóhólyag

falából (McKnight, 1978). Áttétképződésről még nem számoltak be (Bruno és mtsai., 2013). A molekuláris biológiai vizsgálatok (PCR) szerint az elváltozás háttérében retrovírus fertőzés áll (Paul és mtsai., 2006).

Neoplasztikus vérképzőszervi elváltozások

A halakban a vérképzésért felelős a lép, a vese, valamint a máj és a thymus (Roberts, 2009). Halakban is előfordul a thymus daganatos elváltozása. Szivárványos pisztrángban lymphosarcoma kialakulását figyelték meg, amely áttétet képzett a kopoltyúban (Mcardle és Roberts, 2011; Warr és mtsai., 1984). Csuka fején található lymphosarcomát írtak le Írországbán, amely áttétet is képzett (Mulcahy, 1976). Akváriumi körülmények között tartott *Austrolebias nigripinnis* halfaj (Regan, 1912) kopoltyúfedője alatt talált növedék diagnosztikai vizsgálata során lymphomát állapítottak meg a kutatók (Roberts, 2009).

Idegi eredetű daganatok

Az idegrendszer neoplasztikus elváltozásairól csupán néhány tanulmány tesz említést. Ideghüvely daganat (neurilemmoma) előfordulásáról több halfaj esetében is beszámoltak. Ilyenek például az aranyhalban leírt tumorok (Armando és mtsai., 2021; Schlumberger, 1952). Myxoid ideghüvely daganat egy esetben szivárványos pisztráng úszójából indult ki, és áttétet képzett a májban (Brocca és mtsai., 2021). Lazacfélék családján belül még az ezüst lazac esetében számoltak be ideghüvely daganatról (Masahito és mtsai., 1985). A floridai csatogóhal állományokban előforduló schwannoma háttérében a kutatók szerint szennyezések, illetve vírusos eredet állhat (Hawkins és mtsai., 1986; Overstreet, 1988). Meg kell említeni továbbá a barlangihal (*Forbesichthys agassizii*, Putnam, 1872) retinoblastomáját is, amely az állatot a látásban korlátozta, a fej torzulását okozta (Fournie és Overstreet, 1985).

Pigmentsejt-eredetű tumorok

Chromatophoromák számos halfajban megfigyelhetőek (Roberts, 2009). Bőrből kiindulva jellemzően mélyre terjednek és kifeléyesednek (3. ábra). Ha a daganat önmagában nem okozza az állat pusztulását, akkor másodlagos fertőzések vezethetnek az elhulláshoz (Roberts, 2012). Leírták már díszhalakból, többek között koiból és aranyhalból (Siniard és mtsai., 2019).



3. ábra. Chromatophoroma koiban (Fotó: Hoitsy)

A melanint előállító sejtek rosszindulatú daganata a melanóma (Kardeván, 1976). Melanómák előfordulhatnak tőkehalféléktől kezdve, plattikon (*Xiphophorus maculatus*, Günther, 1866) át *Argyrosomus* fajokig (Esaka és mtsai, 1981; Roberts, 2009; Roberts, 2012). Lazacfélék közül a vadon élő és tenyésztett populációk egyaránt érintettek lehetnek. A test felületén és az izomzatban jellegzetes sötét foltok jelennek meg. A halakban is magas fokú malignitás jellemző a melanómákra (Roberts, 2012).

Az iridophoroma daganattípust rendellenes, neoplasztikus iridophor sejtek alkotják. A bőr felszínén fehéres, jól elhatárolt elváltozásként jelenik meg. Szivárványos pisztrángban írták le. Az elváltozás felszíne kifekélyesedhet, áttét képződésről nem számoltak be ez idáig (Bruno és mtsai., 2013).

Erythrosporoma előfordulását számos halfajban leírták már. A bőrön kialakuló elváltozás általában jóindulatú, de kialakíthat áttéteket (Roberts, 2009). Koikban és laphalban (*Pseudopleuronectes americanus*, Walbaum, 1792) is megtalálták. Utóbbi fajban az elváltozás metasztázisokat képzett a belső szervekben (Murchelano és Edwards, 1981; Smith, 1934).

Hemangiómák

A hemangióma a vérereket képző szövet jellemző daganata, mely burjánzó, újonnan képzett, csomószerűen elhelyezkedő erekből áll. Felszíne általában dudorzos, lokálisan betörhetnek a dermis rétegeibe (Kardeván, 1976; Roberts, 2012). Szivárványos pisztrángban és atlanti lazacban is leírták már, de tengerben élő sügérfélékben is előfordulhat (Bruno és mtsai., 2013; Fournie és mtsai., 2006; Meyers és Hendricks, 1983) A testfelszínen kialakult vérérdaganatok akár ki is fekélyesedhetnek (Roberts, 2012).

KÖVETKEZTETÉSEK

Halak daganatos megbetegedései komoly tényezőt képviselnek az akvakultúra szektorban előforduló betegségek között éppúgy, mint az akvarisztika és a kerti tavak világában. Ezek kutatása elengedhetetlen annak érdekében, hogy a probléma kialakulása megelőzhetővé váljon, vagy az állományok mentesíthetőek legyenek az ilyen fajta elváltozásoktól. Az állatok szinte mindegyik szervrendszerét érintő tumorok lehetnek jó- és rosszindulatúak egyaránt, és okozhatják a halak pusztulását is. A tenyészállatokban és az egyre hosszabb életű díszhalakban szignifikánsan gyakoribb a daganatok előfordulása. Ennek oka feltételezéseink szerint, hogy a tumorok kialakulásához, kifejlődéséhez hosszabb időtartam szükséges. A neoplaszticitást mutató elváltozások kutatása fontos terület mind a humán, mind az állatorvosi medicinában. Megismerésükkel közelebb juthatunk keletkezési okaik felderítéséhez, valamint kialakulásuk megakadályozásának lehetőségeihez.

IRODALOMJEGYZÉK

- Amlacher, E. (1961). *Taschenbuch der Fischkrankheiten*.
- Armando, F., Pigoli, C., Gambini, M., Ghidelli, A., Ghisleni, G., Corradi, A., Passeri, B., Caniatti, M., Grieco, V., Baumgärtner, W., & Puff, C. (2021). Peripheral Nerve Sheath Tumors Resembling Human Atypical Neurofibroma in Goldfish (*Carassius auratus*, Linnaeus, 1758). *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 11(9), 2621. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani11092621>
- Ayres, J. L., Lee, D. J., Wales, J. H., & Sinnhuber, R. O. (1971). Aflatoxin structure and hepatocarcinogenicity in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the National Cancer Institute*, 46(3), 561–564.
- Bailey, G. S., Williams, D. E., & Hendricks, J. D. (1996). Fish models for environmental carcinogenesis: The rainbow trout. *Environmental Health Perspectives*, 104(Suppl 1), 5–21.
- Bean-Knudsen, D. E., Uhazy, L. S., & Wagner, J. E. (1987). Cranial chondrosarcoma in a paddlefish, *Polyodon spathula* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 10(5), 363–369. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1987.tb01083.x>
- Békési, L., Horváth, I., Kovacs-Gayer, E., & Csaba, G. (1986). Demonstration of herpesvirus like particles in skin lesions of European eel (*Anguilla anguilla*). *Journal of Applied Ichthyology*, 2(4), 190–192.

- Black, J. J., & Baumann, P. C. (1991). Carcinogens and cancers in freshwater fishes. *Environmental Health Perspectives*, *90*, 27–33.
- Bowser, P. R., Wolfe, M. J., Forney, J. L., & Wooster, G. A. (1988). Seasonal prevalence of skin tumors from walleye (*Stizostedion vitreum*) from Oneida Lake, New York. *Journal of Wildlife Diseases*, *24*(2), 292–298. DOI: <https://doi.org/10.7589/0090-3558-24.2.292>
- Bradley, T., Medina, D., Chang, P., & McClain, J. (1989). Epizootic Epitheliotropic Disease of lake trout (*Salvelinus namaycush*): History and viral etiology. *Diseases of Aquatic Organisms - DISEASE AQUAT ORG*, *7*, 195–201. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao007195>
- Brittelli, M. R., Chen, H. H., & Muska, C. F. (1985). Induction of branchial (gill) neoplasms in the medaka fish (*Oryzias latipes*) by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Cancer research*, *45*(7), 3209–3214.
- Brocca, G., Zamparo, S., Quaglio, F., & Verin, R. (2021). Metastatic myxoid nerve sheath tumor of the dorsal fin in a rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, *44*(11), 1875–1878. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.13517>
- Broughton, E., & Choquette, L. P. E. (1971). Subcutaneous Fibroma in Lake Trout (*Salvelinus namaycush*) in Quebec. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, *28*(3), 448–449. DOI: <https://doi.org/10.1139/f71-058>
- Bruno, D. W., Noguera, P. A., & Poppe, T. T. (2013). *A colour atlas of salmonid diseases* (Köt. 91). Springer Science & Business Media.
- Bunton, T. E., & Baksi, S. M. (1988). Cholangioma in white perch (*Morone americana*) from the Chesapeake Bay. *Journal of Wildlife Diseases*, *24*(1), 137–141.
- Bylund, G., Valtonen, E. T., & Niemelä, E. (1980). Observations on epidermal papillomata in wild and cultured Atlantic salmon *Salmo salar* L. in Finland. *Journal of Fish Diseases*, *3*(6), 525–528.
- Capasso, L. (2022). Possible notochordal chordoma in a fossil fish from the Late Cretaceous of Lebanon. *International Journal of Paleopathology*, *37*, 6–8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpp.2022.02.002>
- Capasso, L. L. (2005). Antiquity of cancer. *International Journal of Cancer*, *113*(1), 2–13. DOI: <https://doi.org/10.1002/ijc.20610>
- Carlisle, J. C., & Roberts, R. J. (1977). An Epidermal papilloma of the Atlantic salmon: Epizootiology, pathology and immunology. *Journal of Wildlife Diseases*, *13*(3), 230–234.
- Chen, H. C., Pan, I. J., Tu, W. J., Lin, W. H., Hong, C. C., & Brittelli, M. R. (1996). Neoplastic response in Japanese medaka and channel catfish exposed to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Toxicologic pathology*, *24*(6), 696–706.
- Coffee, L., Bogdanovic, L., Cushing, T., & Bowser, P. (2012). Pharyngeal Odontoma in an Adult Walleye (*Sander vitreus*). *Veterinary pathology*, *50*. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985812446149>
- Coffee, L. L., Casey, J. W., & Bowser, P. R. (2013). Pathology of tumors in fish associated with retroviruses: A review. *Veterinary Pathology*, *50*(3), 390–403. DOI: <https://doi.org/10.1177/0300985813480529>
- Dale, O. B., Tørud, B., Kvellestad, A., Koppang, H. S., & Koppang, E. O. (2009). From Chronic Feed-Induced Intestinal Inflammation to Adenocarcinoma with Metastases in Salmonid Fish. *Cancer Research*, *69*(10), 4355–4362. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4877>
- Doszpoly, A., Karaseva, T. A., Waltzek, T. B., Kalabekov, I. M., & Shchelkunov, I. S. (2013). Atlantic salmon papillomatosis in Russia and molecular characterization of the associated herpesvirus. *Diseases of aquatic organisms*, *107*(2), 121–127.
- Duncan, I. B. (1978). Evidence for an oncovirus in swimbladder fibrosarcoma of Atlantic salmon *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases*, *1*(1), 127–131. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1978.tb00012.x>
- Dyková, I., Blažek, R., Součková, K., Reichard, M., & Slabý, O. (2020). Spontaneous adenocarcinoma of the gas gland in Nothobranchius fishes. *Diseases of Aquatic Organisms*, *137*(3), 205–210. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03437>
- Esaka, T., Asada, M., Wakamatsu, Y., & Ozato, K. (1981). Differentiation of melanomas occurring in platyfish-swordtail hybrids of different ages: An ultrastructural study. *The Journal of Experimental Zoology*, *215*(2), 133–142. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1402150202>

- Falkmer, S., Emdin, S. O., Ostberg, Y., Mattisson, A., Sjöbeck, M. L., & Fänge, R. (1976). Tumor pathology of the hagfish, *Myxine glutinosa*, and the river lamprey, *Lampetra fluviatilis*. A light-microscopical study with particular reference to the occurrence of primary liver carcinoma, islet-cell tumors, and epidermoid cysts of the skin. *Progress in experimental tumor research*, 20, 217–250.
- Fitzgerald, S. D., Carlton, W. W., & Sandusky, G. (1991). Metastatic squamous cell carcinoma in a hybrid sunfish. *Journal of Fish Diseases*, 14(4), 481–487.
- Fournie, J. W., Black, J. J., & Vethaak, A. D. (1988). Exocrine pancreatic adenomas in the greater redhorse, *Moxostoma valenciennesi* Jordan, and in the European flounder, *Platichthys flesus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 11(5), 445–448.
- Fournie, J. W., Overstreet, R., & Bullock, L. (2006). Multiple capillary haemangiomas in the scamp, *Myceteroperca phenax* Jordan and Swain. *Journal of Fish Diseases*, 8, 551–555. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb00971.x>
- Fournie, J. W., & Overstreet, R. M. (1985). Retinoblastoma in the spring cavefish, *Chologaster agassizi* Putnam. *Journal of Fish Diseases*, 8(4), 377–381. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb00959.x>
- Fournie, J. W., Vogelbein, W. K., & Overstreet, R. M. (1987). Squamous cell carcinoma in the gulf menhaden, *Brevoortia patronus* Goode. *Journal of Fish Diseases*, 10(2), 133–136.
- Fournie, J. W., Wolfe, M. J., Wolf, J. C., Courtney, L. A., Johnson, R. D., & Hawkins, W. E. (2005). Diagnostic criteria for proliferative thyroid lesions in bony fishes. *Toxicologic Pathology*, 33(5), 540–551. DOI: <https://doi.org/10.1080/01926230500214509>
- Furukawa, S., Hoshikawa, Y., Irie, K., Kuroda, Y., & Takeuchi, K. (2021a). Swim bladder tumors in the wavy medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Toxicologic Pathology*, 34(1), 107–111. DOI: <https://doi.org/10.1293/tox.2020-0058>
- Furukawa, S., Hoshikawa, Y., Irie, K., Kuroda, Y., & Takeuchi, K. (2021b). Swim bladder tumor in the young adult scoliotic medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of Toxicologic Pathology*, 34(2), 157–160. DOI: <https://doi.org/10.1293/tox.2020-0088>
- Gál J., Orosi Z., Zsizsák Á., & Hoitsy M. (2018). *Vitorlás óriás algaevőharcsa (Pterygoplichthys joselimaianus WEBER, 1991) száj körül kialakult papillomájának eltávolítása—Esetismertetés*. LINK: <http://www.huveta.hu/handle/10832/2793>
- Garland, M. R., Lawler, L. P., Whitaker, B. R., Walker, I. D., Corl, F. M., & Fishman, E. K. (2002). Modern CT applications in veterinary medicine. *Radiographics*, 22(1), 55–62.
- Gombač, M., Seničar, M., Švara, T., Šturm, S., Dolenšek, T., Tekavec, K., Cerkvénik Flajs, V., & Schmidt-Posthaus, H. (2021). Sudden outbreak of metastatic intestinal adenocarcinoma in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*, 144, 237–244. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03592>
- Gordon, M., & Smith, G. M. (1938). Progressive growth stages of a heritable melanotic neoplastic disease in fishes from the day of birth. *The American Journal of Cancer*, 34(2), 255–272.
- Haller, R. D., & Roberts, R. J. (1980). Dual neoplasia in a specimen of *Sarotherodon spilurus spilurus* (Günther)(= *Tilapia spilurus*). *Journal of Fish Diseases*, 3(1), 63–66.
- Halver, J. E. (1962). Induction of rainbow trout hepatoma with chemical carcinogens. *Progress in Sport Fishery Research*, 160, 38–51.
- Hanson, L., Doszpoly, A., Van Beurden, S. J., de Oliveira Viadanna, P. H., & Waltzek, T. (2016). Alloherpesviruses of fish. In *Aquaculture virology*, 153–172.
- Hawkins, W. E., Fournie, J. W., Overstreet, R. M., & Walker, W. W. (1986). Intraocular neoplasms induced by methylazoxymethanol acetate in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Journal of the National Cancer Institute*, 76(3), 453–465.
- Hendricks, J. D., Sinnhuber, R. O., Nixon, J. E., Wales, J. H., Masri, M. S., & Hsieh, D. P. H. (1980). Carcinogenic response of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to aflatoxin Q1 and synergistic effect of cyclopropanoid fatty acids. *Journal of the National Cancer Institute*, 64(3), 523–528.
- Hoitsy, M., Hoitsy, G., Jakab, C., Molnár, T., & Baska, F. (2020). Gastrointestinalis eredetű daganatok azonosítása szivárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Magyar Allatorvosok Lapja*, 2020, 55–64.

- Hoitsy, M., Hoitsy, G., Jakab, C., Molnár, T., Gál, J., & Baska, F. (2021). Intussusception caused by intestinal neoplasia in mature rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum 1792). *Journal of Fish Diseases*, 44(7), 893–898. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.13347>
- Horiuchi, M., Miyazawa, M., Nakata, M., Iida, K., & Nishimura, S. (1989). A Case of Herpesvirus Infection on Freshwater-reared Coho Salmon *Oncorhynchus kisutch* in Japan. *Aquaculture Science*, 36(4), 297–305.
- Johnston, C. J., Deveney, M. R., Bayly, T., & Nowak, B. F. (2008). Gross and histopathological characteristics of two lipomas and a neurofibrosarcoma detected in aquacultured southern bluefin tuna, *Thunnus maccoyii* (Castelnau), in South Australia. *Journal of Fish Diseases*, 31(4), 241–247. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00863.x>
- Kardeván A. (1976). *A háziállatok kórbonctana I-II. Mezőgazdasági Kiadó.*
- Kimura, I., Ando, M., Kinae, N., Wakamatsu, Y., Ozato, K., & Harshbarger, J. C. (1984). MNNG carcinogenesis of the gill in platyfish × swordtail F 1 hybrids and in medaka. *Gann*, 43, 36–36.
- Kimura, I., Miyake, T., Kubota, S., Kamata, A., Morikawa, S., & Ito, Y. (1976). Adenomatous polyps in the stomachs of hatchery-grown salmonids and other types of fishes. In *Tumors in Aquatic Animals* (Köt. 20, o. 181–194). Karger Publishers.
- Kimura, T., Yoshimizu, M., & Tanaka, M. (1983). Susceptibility of different fry stages of representative salmonid species to *Oncorhynchus masou* virus (OMV). *Fish Pathology*, 17(4), 251–258.
- Kimura, T., Yoshimizu, M., Tanaka, M., & Sannohe, H. (1981). Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus masou*-I characteristics and pathogenicity. *Fish Pathology*, 15(3–4), 143–147.
- Kreyberg, L. (1937). An Intra-Abdominal Fibroma in a Brown Trout. *The American Journal of Cancer*, 30(1), 112–114. DOI: <https://doi.org/10.1158/ajc.1937.112>
- Kubota, S., Funahashi, N., & Kimura, I. (1974). Histology of adenomatous polyps in the stomach in fishes. *Proc. Jap. Cancer Ass*, 33, 181.
- Kurobe, T., Marcquenski, S., & Hedrick, R. P. (2009). PCR assay for improved diagnostics of epitheliotropic disease virus (EEDV) in lake trout *Salvelinus namaycush*. *Diseases of aquatic organisms*, 84(1), 17–24.
- Leatherland, J. F., & Sonstegard, R. A. (1978). Structure of Normal Testis and Testicular Tumors in Cyprinids from Lake Ontario¹. *Cancer Research*, 38(10), 3164–3173.
- Lesnik, F., & Vrtiak, O. J. (1980). *Az állatok víruseredetű daganatos betegségei* (J. Kojnok, Ford.). Mezőgazdasági Kiadó.
- Lewis, E., Reifinger, M., Schmidt, P., & El-Matbouli, M. (2014). [Ovarian tumor in a koi carp (*Cyprinus carpio*): Diagnosis, surgery, postoperative care and tumour classification]. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 42(4), 257–262.
- Lumsden, J. S., & Marshall, S. (2003). Sporadic neoplasms of farmed chinook salmon, *Oncorhynchus tshawytscha* (Walbaum), from New Zealand. *Journal of fish diseases*, 26(7), 393–399.
- Majeed, S. K., Jolly, D. W., & Gopinath, C. (1984). An outbreak of liver cell carcinoma in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, in the UK. *Journal of Fish Diseases*, 7(2), 165–168.
- Marino, F., Monaco, S., Salvaggio, A., & Macri, B. (2006). Lipoma in a farmed northern bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 29(11), 697–699. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2006.00764.x>
- Masahito, P., Ishikawa, T., & Takayama, S. (1984). Spontaneous spermatocytic seminoma in African lungfish, *Protopterus aethiopicus* Heckel. *Journal of Fish Diseases*, 7(2), 169–172. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1984.tb00920.x>
- Masahito, P., Ishikawa, T., Yanagisawa, A., Sugano, H., & Ikeda, K. (1985). Neurogenic Tumors in Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Reared in Well Water in Japan². *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 75(4), 779–790. DOI: <https://doi.org/10.1093/jnci/75.4.779>
- Mawdesley-Thomas, L. E. (1972). Diseases of fish. *Diseases of Fish*. LINK: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19721300683>
- Mawdesley-Thomas, L. E., & Bucke, D. (1967). Squamous cell carcinoma in a gudgeon (*Gobio gobio*, L.). *Pathologia veterinaria*, 4(5), 484–489.

- McCardle, J., & Roberts, R. (2011). Bilateral Hyperplasia of the Thymus in a Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 31, 1537–1539. DOI: <https://doi.org/10.1139/f74-188>
- McKnight, I. J. (1978). Sarcoma of the swim bladder of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 13(1), 55–60. DOI: [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(78\)90127-8](https://doi.org/10.1016/0044-8486(78)90127-8)
- Meyers, T. R., & Hendricks, J. D. (1983). Histopathology of four spontaneous neoplasms in three species of salmonid fishes*. *Journal of Fish Diseases*, 6(6), 481–499. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1983.tb00103.x>
- Molnár K., & Baska F. (2017). *Halbetegségek*.
- Molnár, K., & Szakolczai, J. (1980). *Hal betegségek*. Mezőgazdasági Kiadó.
- Morales, P., & Schmidt, R. E. (1991). Spindle-cell tumour resembling haemangiopericytoma in a common goldfish, *Carassius auratus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 14(4), 499–502. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1991.tb00604.x>
- Mulcahy, M. F. (1976). Epizootiological studies of lymphomas in northern pike in Ireland. *Progress in Experimental Tumor Research*, 20, 129–140. DOI: <https://doi.org/10.1159/000398693>
- Murchelano, R. A., & Edwards, R. L. (1981). An erythrophoroma in ornamental carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Diseases*, 4(3), 265–268. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1981.tb01133.x>
- Nash, G., & Porter, C. (1985). Branchial osteochondroma in a gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., cultured in the Gulf of Aqaba. *Journal of Fish Diseases*, 8(3), 333–336. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1985.tb00951.x>
- Natale, S., Capparucci, F., Abbate, J. M., Panebianco, R., Puleio, R., & Iaria, C. (2020). Testicular leiomyoma and spermatogenic failure syndrome in a seabass from broodstock. *Journal of Fish Diseases*, 43(12), 1563–1569. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.13258>
- Nigrelli, R. F. (1947). Spontaneous neoplasms in fishes; Lymphosarcoma in *Astyanax* and *Esox*. *Zoologica: scientific contributions of the New York Zoological Society*, 32(9–12), 101–108.
- Nigrelli, R. F., & Gordon, M. (1946). Spontaneous neoplasms in fishes. I. Osteochondroma in the jewel-fish, *Hemichromis bimaculatus*. *Zoologica: scientific contributions of the New York Zoological Society*, 31(7), 89–92. DOI: <https://doi.org/10.5962/p.203524>
- Noga, E. J. (2010). *Fish disease: Diagnosis and treatment*. John Wiley & Sons.
- Notash, S. (2006). Study of rainbow trout neoplasia in the region of Haraz [Thesis, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Aquatic Animal Health]. LINK: <http://aquaticcommons.org/id/eprint/21022>. <https://aquadocs.org/handle/1834/35882>
- Odense, P. H., Logan, V. H., & Baker, S. R. (1973). Spontaneous Nephroblastoma in a Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 30(4), 549–551. DOI: <https://doi.org/10.1139/f73-092>
- Oryan, A., Alidadi, S., Shayegh, H., & Geramizadeh, B. (2015). Cutaneous Leiomyoma in a Goldfish *Carassius auratus*. *Fish Pathology*, 50, 112–114. DOI: <https://doi.org/10.3147/jfsf.50.112>
- Otte, E. (1964). Eine bösartige Neubildung in der Bauchhöhle eines Goldfisches (*Carassius auratus* L.). *Wein Titartliche Monatsschrift*, 51, 485–488.
- Overstreet, R. M. (1988). Aquatic pollution problems, Southeastern U.S. coasts: Histopathological indicators. *Aquatic Toxicology*, 11(3), 213–239. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-445X\(88\)90076-8](https://doi.org/10.1016/0166-445X(88)90076-8)
- Paquette, C. E., Kent, M. L., Buchner, C., Tanguay, R. L., Guillemin, K., Mason, T. J., & Peterson, T. S. (2013). A retrospective study of the prevalence and classification of intestinal neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 10(2), 228–236. DOI: <https://doi.org/10.1089/zeb.2012.0828>
- Park, E.-H., Chang, H.-H., Lee, K.-C., Kweon, H.-S., Heo, O.-S., & Ha, K.-W. (1993). High Frequency of Thyroid Tumor Induction by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in the Hermaphroditic Fish *Rivulus marmoratus*. *Japanese journal of cancer research*, 84(6), 608–615.
- Parker-Graham, C. A., Dunker, F., & Reavill, D. (2018). *Osteosarcoma in a Kelp Greenling (Hexagrammos decagrammus)*. IAAAM. LINK: <https://www.vin.com/apputil/content/defaultadv1.aspx?pid=20778&meta=Generic&catId=113367&id=8504910&ind=127&objTypeID=17>

- Paul, T. A., Quackenbush, S. L., Sutton, C., Casey, R. N., Bowser, P. R., & Casey, J. W. (2006). Identification and characterization of an exogenous retrovirus from atlantic salmon swim bladder sarcomas. *Journal of Virology*, 80(6), 2941–2948. DOI: <https://doi.org/10.1128/JVI.80.6.2941-2948.2006>
- Peters, G., & Peters, N. (1978). Temperature-dependent growth and regression of epidermal tumors in the european eel (*Anguilla anguilla* L.). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 298, 245–260.
- Peters, N., & Watermann, B. (1979). Three Types of Skin Papillomas of Flatfishes and Their Causes. *Marine Ecology Progress Series*, 1(4), 269–276.
- Petervary, N., Gillette, D. M., Lewbart, G. A., & Harshbarger, J. C. (1996). A spontaneous neoplasm of the renal collecting ducts in an oscar, *Astronotus ocellatus* (Cuvier), with comments on similar cases in this species. *Journal of Fish Diseases*, 19(4), 279–281.
- Rahmati-Holasoo, H., Soltani, M., Masoudifard, M., Shokrpour, S., Taheri Mirghaed, A., & Ahmadpoor, M. (2018). Nephroblastoma in bester sturgeon, a cultured hybrid of *Huso huso* × *Acipenser ruthenus*: Diagnostic imaging, clinical and histopathological study. *Journal of Fish Diseases*, 41(7), 1093–1101. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.12800>
- Raidal, S. R., Shearer, P. L., Stephens, F., & Richardson, J. (2006). Surgical removal of an ovarian tumour in a koi carp (*Cyprinus carpio*). *Australian Veterinary Journal*, 84(5), 178–181. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2006.tb12776.x>
- Roberts, H. E. (2009). *Fundamentals of Ornamental Fish Health*. Wiley.
- Roberts, R. J. (2012). *Fish Pathology* (4th edition). Wiley-Blackwell.
- Roberts, R. J., & Bullock, A. M. (1979). Papillomatosis in marine cultured rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 2(1), 75–77.
- Sano, T. (1988). Characterization, pathogenicity and oncogenicity of herpesviruses in fish. *Abstract from the American Fisheries Society, Fish Health Section International Fish Health Conference, Vancouver, British Colombia, Canada. July 19-21, 1988*.
- Schlumberger, H. G. (1952). Nerve sheath tumors in an isolated goldfish population. *Cancer Research*, 12(12), 890–899.
- Schoch, C. L., Ciufu, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. *Database: The Journal of Biological Databases and Curation*, 2020, baaa062. DOI: <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Shchelkunov, I. S., Karseva, T. A., & Kadoshnikov, Y. U. P. (1992). Atlantic salmon papillomatosis: Visualization of herpesvirus-like particles in skin growths of affected fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists (United Kingdom)*. LINK: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Atlantic+salmon+papillomatosis%3A+visualization+of+herpesvirus-like+particles+in+skin+growths+of+affected+fish&author=Shchelkunov%2C+I.S.&publication_year=1992
- Shields, R. P., & Popp, J. A. (1979). Intracardial Mesotheliomas and a Gastric Papilloma in a Giant Grouper, *Epinephelus itajara* (Lichtenstein). *Veterinary Pathology*, 16(2), 191–198. DOI: <https://doi.org/10.1177/030098587901600204>
- Siniard, W. C., Sheley, M. F., Stevens, B. N., Parker-Graham, C. A., Roy, M. A., Sinnott, D. M., Watson, K. D., Marinkovich, M. J., Robertson, J. A., Frei, S., & Soto, E. (2019). Immunohistochemical analysis of pigment cell tumors in two cyprinid species. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation: Official Publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 31(5), 788–791. DOI: <https://doi.org/10.1177/1040638719864380>
- Sirri, R., Mandrioli, L., Grieco, V., Bacci, B., Brunetti, B., Sarli, G., & Schmidt-Posthaus, H. (2010). Seminoma in a koi carp *Cyprinus carpio*: Histopathological and immunohistochemical findings. *Diseases of Aquatic Organisms*, 92(1), 83–88. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao02273>
- Smith, G. M. (1934). A Cutaneous Red Pigmented Tumor (Erythrophoroma) with Metastases in a Flatfish (*Pseudopleuronectes Americanus*). *The American Journal of Cancer*, 21(3), 596–599. DOI: <https://doi.org/10.1158/ajc.1934.596>

- Spitsbergen, J. M., Tsai, H.-W., Reddy, A., Miller, T., Arbogast, D., Hendricks, J. D., & Bailey, G. S. (2000). Neoplasia in zebrafish (*Danio rerio*) treated with 7, 12-Diniethylbenz [a] anthracene by two exposure routes at different developmental stages. *Toxicologic Pathology*, 28(5), 705–715.
- Stilwell, J. M., Boylan, S. M., Howard, S., & Camus, A. C. (2018). Gas gland adenoma in a lined seahorse, *Hippocampus erectus*, Perry 1810. *Journal of Fish Diseases*, 41(1), 171–174. DOI: <https://doi.org/10.1111/jfd.12677>
- Stolk, A. (1957). Tumours of fishes. XVIII. Adenoma of the swim bladder in the viviparous cyprinodont *Lebistes reticulatus* (Peters). *Proc K Ned Akad Wet.* 60c, 650–657.
- Vergneau-Grosset, C., Summa, N., Rodriguez, C. O., Cenani, A., Sheley, M. F., McCarthy, M. A., Tanner, J. C. M., Phillips, K. L., Hunt, G. B., & Groff, J. M. (2016). Excision and Subsequent Treatment of a Leiomyoma From the Periventriculid of a Koi (*Cyprinus carpio koi*). *Journal of Exotic Pet Medicine*, 25(3), 194–202. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2016.04.011>
- Vogelbein, W. K., Fournie, J. W., Cooper, P. S., & Van Veld, P. A. (1999). Hepatoblastomas in the mummichog, *Fundulus heteroclitus* (L.), from a creosote-contaminated environment: A histologic, ultrastructural and immunohistochemical study. *Journal of Fish Diseases*, 22(6), 419–431.
- Walker, P. J., Siddell, S. G., Lefkowitz, E. J., Mushegian, A. R., Adriaenssens, E. M., Dempsey, D. M., Dutilh, B. E., Harrach, B., Harrison, R. L., Hendrickson, R. C., Junglen, S., Knowles, N. J., Kropinski, A. M., Krupovic, M., Kuhn, J. H., Nibert, M., Orton, R. J., Rubino, L., Sabanadzovic, S., ... Davison, A. J. (2020). Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). *Archives of Virology*, 165(11), 2737–2748. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00705-020-04752-x>
- Walker, R. (1969). Virus associated with epidermal hyperplasia in fish. *National Cancer Institute Monograph*, 31, 195–207.
- Warr, G. W., Griffin, B. R., Anderson, D. P., Mcallister, P. E., Lidgerding, B., & Smith, C. E. (1984). A lymphosarcoma of thymic origin in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Diseases*, 7(1), 73–82. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.1984.tb00908.x>
- Watermann, B., & Dethlefsen, V. (1982). Histology of pseudobranchial tumours in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the North Sea and the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 35(2), 231–242. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01997554>
- Watermann, B., Dethlefsen, V., & Hoppenheit, M. (1982). Epidemiology of pseudobranchial tumours in Atlantic cod (*Gadus morhua*) from the North Sea and the Baltic Sea. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 35(4), 425–437. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01999133>
- Wellings, S. R. (1969). Neoplasia and primitive vertebrate phylogeny: Echinoderms, prevertebrates, and fishes--A review. *National Cancer Institute Monograph*, 31, 59–128.
- Wildgoose, W. H., & Bucke, D. (1995). Spontaneous branchioblastoma in a koi carp (*Cyprinus carpio*). *The Veterinary Record*, 136(16), 418–419.
- Yamamoto, T., Macdonald, R. D., Gillespie, D. C., & Kelly, R. K. (1976). Viruses Associated with Lymphocystis Disease and Dermal Sarcoma of Walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33(11), 2408–2419. DOI: <https://doi.org/10.1139/f76-287>
- Yoshimizu, M., Fukuda, H., Sano, T., & Kimura, T. (1995). Salmonid herpesvirus 2. Epizootiology and serological relationship. *Veterinary research*, 26(5–6), 486–492.
- Yoshimizu, M., Nomura, T., Ezura, Y., & Kimura, T. (1993). Surveillance and control of infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and Oncorhynchus masou virus (OMV) of wild salmonid fish returning to the northern part of Japan 1976–1991. *Fisheries Research*, 17(1–2), 163–173.
- Yoshimizu, M., Tanaka, M., & Kimura, T. (1987). Oncorhynchus masou virus (OMV): Incidence of tumor development among experimentally infected representative salmonid species. *Fish Pathology*, 22(1), 7–10.
- Zhuravleva, N. G., Matishov, G. G., Ottesen, O. H., & Larina, T. M. (2011). Neoplasms in the swim bladder of juvenile cod. *Doklady Biological Sciences: Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR, Biological Sciences Sections*, 440, 340–342. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0012496611050048>

URL1: Alloherpesviridae—Dsdna Viruses—Dsdna Viruses (2011)—ICTV. (2022).
https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/90/alloherpesviridae



© Copyright 2022 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.



Tudományos közlemény

Az életkor és az évszak hatása a nagyüzemi nyúltelepek *Passalurus ambiguus* fertőzöttségére

DEMETER Csongor¹, NÉMET Zoltán László^{2*}, GERENCSÉR Zsolt¹,
DEMETER-JEREMIÁS Anett³, SÁNDOR Ferenc³, MATICS Zsolt¹

¹ Magyar 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 - Survey of *Passalurus ambiguus* infections at industrial rabbit farms according to ages and seasons

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

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

The aim of the study was to evaluate the incidence of *P. ambiguus* infection at industrial rabbit farms according to the season and the age of rabbits. The survey was made from March 2018 to April 2022 at 29 Hungarian and 2 Slovakian rabbit farms. From 7612 faecal samples 335 (4.4 %) were found containing eggs of *P. ambiguus*. According to season, the lowest ratio of infection was measured in summer (3.0 %). In terms of age, surprising results were found. The highest *P. ambiguus* infection rate was observed during the lactation phase. During the growing period (5-11 weeks of age) a significantly lower proportion of infected samples was found, although, based on practical experiences at rabbit farms, the gastrointestinal diseases of rabbits mainly occur in the period after weaning.

Keywords: Rabbits, *Passalurus ambiguus*, Parasitology

BEVEZETÉS

Magyarországon az elmúlt időszakban évente 4-4,5 millió vágónyulat állítottak elő, amellyel hazánk a világ élvonalába tartozik. Jelenleg az országban 103-105 ezer anyanyúllal és szaporulatával folyik a termelés (*URL1*). A korszerű, nagyüzemi 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

*CORRESPONDING AUTHOR

Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék, Haszonállat Diagnosztikai Központ,

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

E-mail: nemet.zoltan@univet.hu

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 hátrálthatják a termelést a nyulak emésztőszervi megbetegedései. A *Passalurus ambiguus* és *Eimeria* spp. két gyakran előforduló parazita a nyulak bélrendszerében, amelyek egyéb tünetek mellett hasmenést, súlyos esetekben pedig elhullást is okozhatnak (Sioutas és mtsai, 2021).

Európában új tendencia, hogy állatvédelmi indokokra hivatkozva elvárják a termelőktől, hogy az állatokat a természetes életkörülményeiket minél inkább megközelítő tartási rendszerekben tartsák. Házinyúl esetén ez a ketreces tartás felől a mélyalmos tartásmód bevezetésére való törekvésekben nyilvánul meg. A földön, telepadlón illetve alomanyagon tartott nagyüzemi nyulak termelési eredményei azonban elmaradnak a ketreces tartástechnológiától, melynek egyik oka feltételezhetően az alacsonyabb állategészségügyi és higiéniai státusz és a nyulak komfortérzete, jólléte. A többi állattenyésztési ágazathoz hasonlóan, a nyúltenyésztésben is nagy hangsúlyt kell fektetni az állategészségügyi problémák prevenciójára. Nagyüzemekben, egyrészt épületeken belül, a környezettől elszigetelve tartják a nyulakat, kizárva ezzel a betegségeket terjesztő élő szervezeteket, másrészt a telepen belüli óvintézkedésekkel meggátolják az esetlegesen előforduló betegségek, fertőzések terjedését. Európában a COST Action “Multi-faceted research in rabbits: a model to develop a healthy and safe production in respect with animal welfare” keretében meghatározásra kerültek a nyúltartásra vonatkozó, kulcsfontosságú állatjóléti indikátorok (Hoy, 2009):

1. Elhullás: nincsen, vagy nagyon kis (elkerülhetetlen) mértékű;
2. Megbetegedések: betegségek, fertőzések, sérülések kis (elkerülhetetlen) számban;
3. Fiziológia: hormon szint, szívritmus, immunreakciók – fajra jellemző paraméterek;
4. Viselkedés: etogram, viselkedési tesztekre adott reakciók – fajra jellemző viselkedés;
5. Termelés (teljesítmény): növekedés, takarmányértékesítés, szaporaság – magas színvonalú termelés.

A szakirodalomban található vizsgálati eredményeket szemügyre véve, az 5 megjelölt állatjóléti vizsgálati szempont alapján egyértelműen kijelenthető, hogy a konvencionális ketrecek nincsenek hátrányban a többi tartási móddal szemben.

Orova és mtsai (2004) megfigyelték, hogy a rácspadozat és mélyalom közötti választás esetén a növendéknyulak idejük 80-85%-át a rácspadozaton töltötték. Csoportos elhelyezéskor problémát okozhat a szociális stressz is. Ez nem csak állatjóléti problémákat vet fel, de csökken a takarmányfogyasztás, romlik a takarmány hasznosulása, gyengül az állat immunrendszere, így csökken az ellenálló képessége is (*Szendró*, 2017). Amikor a csoportosan tartott növendéknyulak viselkedését hasonlították a konvencionális, ketreces tartáshoz azt tapasztalták, hogy csoportban a nyulak kevesebbet pihentek, többet mozogtak, és bár gyakoribb volt a szociális kapcsolat, de ez azt is jelentette, hogy az agresszív viselkedés és az abból eredő sérülés is (*Lambertini és mtsai*, 2001; *Dal Bosco és mtsai*, 2002; *Princz és mtsai*, 2008).

Gerencsér és mtsai (2013) szerint a nagyobb csoportban rosszabb volt a nyulak súlygyarapodása, kisebb a testsúlya, rosszabb a takarmányértékesítése, vágási kitermelése és hatszor nagyobb (!) arányú volt az elhullás, mint a ketrecekben. Az elhullás egyik alapvető okaként a műanyag padozat bélsárral való elszennyeződését jelölték meg, ami megbetegedésekhez vezethetett, továbbá a nagy csoportban a fertőzés könnyebben terjedhetett.

Az utóbbi évtizedek számos kutatási eredményéből kiderül tehát, hogy a nyulak nagy csoportos, mélyalmos tartásának hátrányai is lehetnek. A kutatási eredmények alapján nem csak a telepítési sűrűségnek, de önmagában a csoportnagyságnak a növelésével is romlanak a termelési eredmények, csökken az állatok súlya és súlygyarapodása (*Szendró és Dalle Zotte*, 2011), továbbá nagyobb csoportban megnövekedhet a fertőzés esélye, és annak következtében az elhullás. *Szendró* (2016) összefoglalóan megállapította, hogy az állatjóléti irányelvek alapján nem a mélyalom a nyúltartás számára javasolható technológia, hiszen ha többféle padozat típus elérhető számukra, akkor a nyulak többet tartózkodnak fém- vagy műanyag rácspadozaton, mint mélyalmon. *Jekkel és mtsai* (2007) valamint *Dal Bosco és mtsai* (2002) szerint a nyulak fogyasztanak a vizelettel és bélsárral szennyezett alomanyagból, ezért nagyobb az emésztőszervi megbetegedések, elsősorban a kokcidiózis kialakulásának esélye.

Abdel-Gaber és mtsai (2019) szerint a *P. ambiguus* az egyik leggyakoribb oxiurid fonálféreg, amely világszerte megtalálható házi- és vadon élő nyulakban. A *P. ambiguus* faj- vagy gazdaspecifikus, vagyis csak nyulakban él (*URL2*). A féreg kisméretű, a hímek 3-5 mm, míg a nőstények 8-12 mm hosszúak. A peték 95-103 x 43 mikrométer méretűek (*Kotlán és Kobulej*, 1972). A kifejlett *P. ambiguus* férgek a vakbélben és a vastagbélben élnek. A vékonybélben csak

éretlen, korai alakjuk található. A fertőzés peték lenyelésével történik, amelyeket a nőstény férgek a vakbélben ürítenek és a peték azonnal fertőzővé válnak, amikor az állat bélsárával a környezetbe kerülnek.

A *Passalurus* sp. paraziták jelenlétének általában nincs klinikai jele még súlyos fertőzés esetén sem (a nyúl akár 1000-nél nagyobb számú parazitával is fertőzött lehet). A peték a bélsárral ürülnek, továbbá a nőstény a perianális bőrre tapaszthatja azokat. Friss bélsárban a peték morula-gastrula stádiumban vannak, vagy már fertőzőképes lárvát tartalmaznak (*Kassai, 2003*), melyek képesek fertőző állapotba fejlődni a környezetben (*URL3*).

Egyes irodalmi adatok szerint a *P. ambiguus* nem okoz komoly veszélyt az egészségre, és gyakran észrevétlenül él nyulakban, de kellemetlen viszketést és bőrgyulladást vagy bőrpírt okozhat a végbélnyílás körül. *Hönich és mtsai (1978)* szerint a féreggel való erős fertőzöttség bélgyulladást okozhat. A bél-tartalomban élő paraziták több módon is káros hatást fejtenek ki, a toxikus és mechanikus hatások, valamint a tápanyagelvonás egyaránt negatívan befolyásolják a gazdaszervezet egészségét. A tünetek közé tartozhat a hasmenés, a fogyás, a neurológiai tünetek és akár az elhullás is (*Sioutas és mtsai, 2021*).

A férgek jelenléte összefüggésbe hozható vakbél impaktálódással, melyet a bélmozgás leállása, erős fájdalom és gáz kísér. Boncoláskor a *Passalurus* sp. férgek megtalálhatóak a vakbél üregében és a vastagbél mélyedéseiben és nyálkahártyájában. A férgek lelőhelyei gyulladásosak és rendellenes elváltozások figyelhetők meg az adott területen. A legmélyrehatóbb gyulladások és rendellenességek a vakbélben találhatóak. Érendszeri rendellenességek figyelhetők meg továbbá a máj és vese parenchyma-ban (*URL3*).

Mykhailiutenko és mtsai (2019) megállapították, hogy a *P. ambiguus* a nyúl-félék gyakori fertőzője, amely klinikailag a végbélnyílás körüli intenzív viszketésben, különböző emésztési zavarokban és testsúlycsökkenésben nyilvánul meg.

Nyulakban a *P. ambiguus* férgesség krónikus lefolyása során a vastagbélben patomorfológiai elváltozások alakultak ki, a vastagbél felső hájja helyenként sérült, a bélmirigyek kiszélesedtek. A *P. ambiguus* a krónikus hurutos vastagbélgyulladás előfordulásának etiológiai tényezője.

Sioutas és mtsai (2021) kimutatták, hogy a *P. ambiguus* fertőzés hatással lehet az anyák és fiatal nyulak termelésére is. A *P. ambiguus*-szal való önfertőzés a parazita szervezetbe való állandó visszakerüléséhez vezethet, ha nem tesznek ez ellen intézkedéseket. A szoptató anyák megfertőzhetik utódaikat szennyezett alommal vagy más anyagokkal. Tekintettel arra, hogy a *P. ambiguus* prepatens ideje 55 nap, ezért javasolják a nyulak 67 napos életkora körül a bélsár vizsgálatát.

Célunk volt a nagyüzemi nyúltelepeken termelő állományok *P. ambiguus* terheltégének felmérése az állatok életkora és az évszakok függvényében.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Állatok, tartástechnológia, takarmányozás

A bélsármintákat 29 magyar és 2 szlovák nyúltenyésztő gazdaságban gyűjtöttük. Ez Magyarország hústermelő nyúlállományának körülbelül felét, míg Szlovákia esetében annak 80 %-át reprezentálja. A vizsgálat 200 és 6000 anyanyúl közötti állomány mérettel dolgozó telepekre terjedt ki. A mintavételezések a termelés valamennyi szakaszát lefedték (1. táblázat).

1. táblázat

A vizsgált minták száma élethehek és termelési szakaszok szerint

Élethét	Élethét szerinti mintaszám (db)	Termelési ciklus
1.	102	Választást megelőző fázis
2.	144	
3.	167	
4.	171	
5.	173	
6.	258	Választást követő fázis
7.	294	
8.	276	
9.	367	
10.	215	Hizlalás befejező fázisa
11.	197	
12.	83	Tenyész-növendék fázis
13.	24	
14.	15	
15.	20	
16.	14	
17.	15	
18.	16	
19.	18	

Az összes állományt teljes értékű, életkornak és termelési szintnek megfelelő, granulált takarmánykeverékkel etették (2. táblázat). Az anyáknál, illetve a hizlalás választás utáni és befejező szakaszában alkalmazott takarmányok jellemzően nem tartalmaztak féregellenes kiegészítést.

Erős fertőzöttség esetén állatorvosi rendelőnyre és felügyelet mellett eseti parazitaellenes kezeléseket alkalmaztak.

2. táblázat

Az egyes termelési ciklusokban etetett takarmányok átlagos kémiai összetétele

	Tenyésznövendék takarmány	Anya takarmány	Választási takarmány	Befejező takarmány
Nedvesség %	12,0	11,3	11,6	11,2
Ny. fehérje %	15,0	17,3	15,3	15,6
Ny. zsír %	2,9	3,9	3,3	4,3
Ny. rost %	19,6	14,5	16,3	15,8
Hamu %	6,8	7,3	6,6	6,6
ADF	23,7	17,5	19,7	19,2
NDF	39,1	32,6	37,5	36,8

A tartástechnológia szempontjából a vegyes bélsárminták a standard és állatjólléti szempontok szerint javított ketreces, valamint rácspadlós boxos tartásmódokban tartott nyulaktól származtak.

Parazitológiai vizsgálat

Az adatgyűjtés 2018. március és 2022. április közötti időszakban történt. A minták közül jelen vizsgálatban 7612 mintát értékeltünk, időszakonként nem egyenlő eloszlásban. Az évek és évszakok szerinti mintaszámokat a 3. táblázat mutatja.

A minták gyűjtését standardizált módszer szerint végeztük. A mintavétel minden esetben a trágyacsatornából történt a nyulak alól a mindennapos trágyakihúzást követően ürített friss bélsárból. Módszerünk szerint a mintákat istállók trágyacsatornáiból soronként az első, középső és utolsó harmadból szedik és elegyítik.

Soronként minimum 2-5 g bélsarat gyűjtöttünk, és ezeket elegyítettük, azaz a minta nem egyedi, hanem az istálló azonos korcsoportú egyedeknek vegyes, kevert mintája.

A felszindúsítás vizsgálatokat az S&K-Lap Kft. laboratóriumában végeztük. A mintákat a begyűjtést követően 48 órán belül vizsgáltuk. A felszindúsító oldat magnézium-szulfát ($MgSO_4$) 28,6 tömeg %-os vizes oldata volt.

A bélsárminták feldolgozását kizárólag McMaster módszer szerint végeztük a Royal Veterinary College és a FAO ajánlása alapján (*URL4*).

A felszindúsítási vizsgálat során a peték számát regisztráltuk. A számlálókamrában ugyanazon dúsítási eljárás mellett megjelentek a peték mellett feltételezhetően a *P. ambiguus* lárva stádiumú egyedek is. Ismeretes, hogy az általunk alkalmazott módszert csak az ürülő peték számának meghatározására alkalmazza a diagnosztika, ezért az eredmények értékelésekor csak azokat a mintákat tekintettük pozitívnak, amelyek petét tartalmaztak.

3. táblázat

A vizsgált minták száma évek és évszakok szerint

Évszakok	Mintaszám (db)
2018. tavasz	225
2018. nyár	485
2018. ősz	757
2018. tél	809
2019. tavasz	701
2019. nyár	771
2019. ősz	1022
2019. tél	937
2020. tavasz	353
2020. nyár	44
2020. ősz	9
2020. tél	0
2021. tavasz	92
2021. nyár	196
2021. ősz	448
2021. tél	482
2022. tavasz	281

Statisztikai értékelés

A *P. ambiguus* negatív és *P. ambiguus* pozitív bélsár minták előfordulási arányát az egyes évszakokban, illetve az egyes életszakaszokban Chi-négyzet próbával hasonlítottuk össze, SPSS 10.0 programcsomag segítségével.

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

A 7612 bevizsgált mintából 335 minta mutatott pozitív eredményt (4,4 %), vagyis a minták közel 96 %-a *Passalurus*-tól mentes volt.

A fejlődési alakok előfordulásának vizsgálati eredményei

A pozitív mintákból 143-ban (az összes vizsgált minta 1,9 %-a) volt kimutatható a féregnek kizárólag a lárva formája, 270 minta (3,5 %) tartalmazott kizárólag petét (1. kép), továbbá 65 mintában mindkét fejlődési alak megtalálható volt (0,9 %).



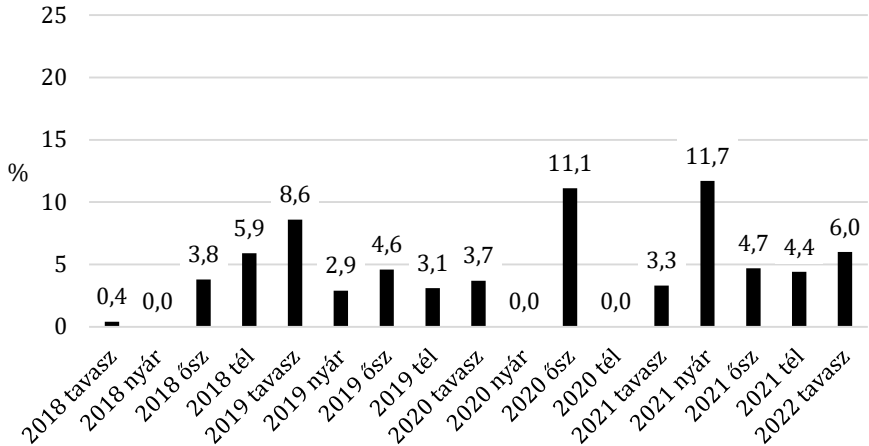
1. kép. *Passalurus ambiguus* pete mikroszkopikus képe

Évszakok hatása

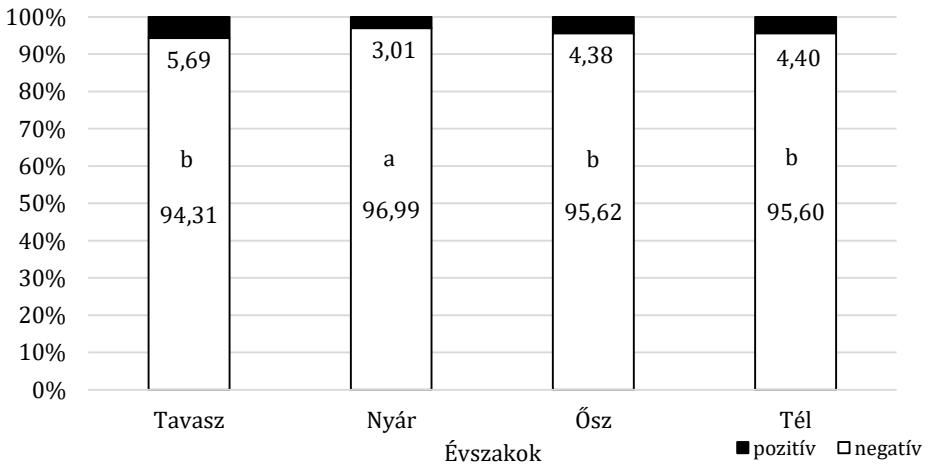
Az 1. ábrán az egyes évszakokban a *P. ambiguus*-ra nézve pozitív mintáknak az összes vizsgált mintához viszonyított százalékos előfordulása látható. A minták fertőzöttségét tekintve az egyes évek eredményei (2018: 3,43 %; 2019: 4,61 %; 2020: 3,45 %; 2021: 5,58 %) és az éven belüli tendenciák nem minden esetben megegyezőek. Az egyes években eltérő időpontokban jelentkeztek a fertőzöttségi csúcsok.

A 2. ábra az évszakok összesített eredményei alapján mutatja a *P. ambiguus* fertőzöttséget.

A teljes vizsgálati időszak adatait figyelembe véve a *P. ambiguus* pozitív minták legkisebb arányban nyáron fordultak elő ($P < 0,05$). Az őszi és téli időszakban mért fertőzöttségi arányok teljesen azonosan alakultak és statisztikailag igazolhatóan nem tértek el a tavasszal mérhető fertőzöttségtől ($P = 0,06$).



1. ábra. *Passalurus ambiguus* pozitív minták előfordulási aránya évek és évszakok szerinti bontásban

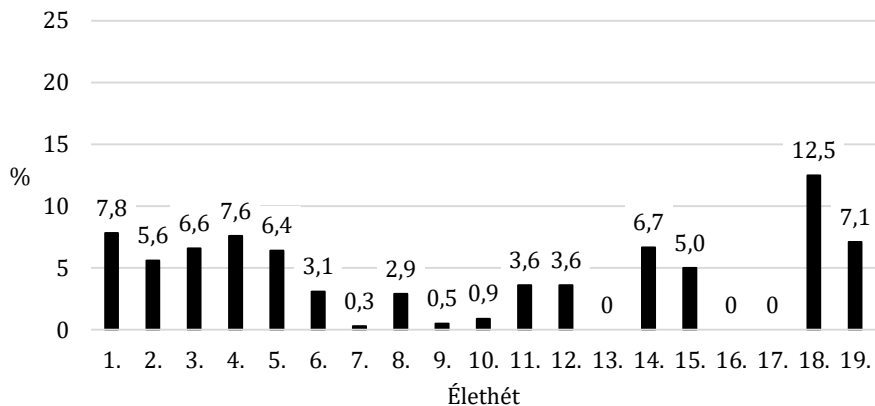


2. ábra. A *Passalurus ambiguus* pozitív minták előfordulási aránya évszaktól függően
^{a,b}: eltérő betűk az átlagok közötti szignifikáns eltérést jelölik (P<0,05)

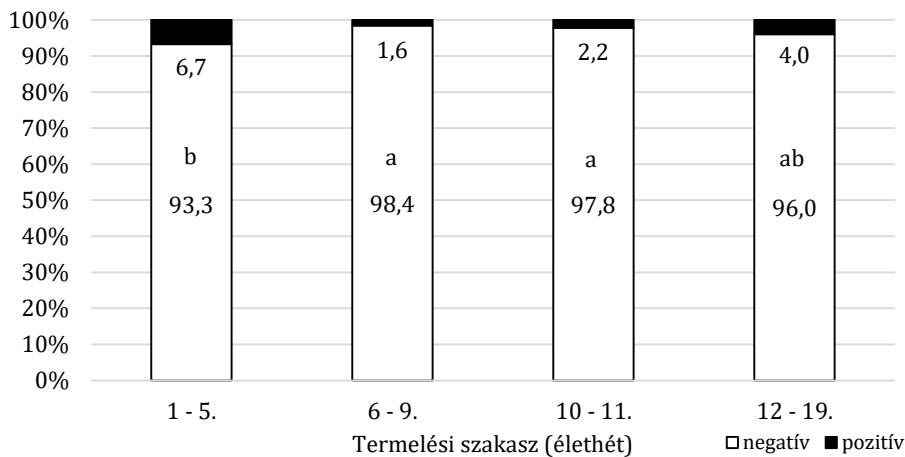
Részben hasonló eredményekről számoltak be *Le Normand és mtsai* (2016). A legalacsonyabb *P. ambiguus* előfordulást ők is nyáron jegyezték le, azonban megállapították, hogy a legmagasabb ürités ősszel történik, amit sorrendben a tavaszi és téli időszak követ.

Életkor hatása

Vizsgáltuk a beérkezett minták *P. ambiguus* fertőzöttségét az állatok életkorától függően életheletként (3. ábra) és termelési szakaszokra bontva is (4. ábra).



3. ábra. *Passalurus ambiguus* fertőzöttséget mutató (pozitív) minták aránya (%) az egyes életheletken



4. ábra. *Passalurus ambiguus* pozitív minták aránya a nevelés különböző fázisaiban
^{a,b}: eltérő betűk az átlagok közötti szignifikáns eltérést jelölik (P<0,05)

Az életkor tekintetében némileg meglepő eredményeket kaptunk. A laktációs időszakban volt megfigyelhető a legmagasabb *P. ambiguus* fertőzöttségi arány. A választást követően (5 hetes kor) – amikor a telepi tapasztalatok alapján a leggyakoribbak az emésztőszervi megbetegedések –, egészen a hizlalás időszak végéig (11 hetes kor) szignifikánsan kisebb arányban találtunk *P. ambiguus* fertőzött mintát, mint a választást megelőző időszakban. A tenyésznővendék nyulaknál (12 hetes kortól) mért fertőzöttség nem tért el a többi periódustól (4. ábra), bár nagyban árnyalja a képet, hogy élethetenként nézve, egészen magas fertőzöttségi szint (akár 10 % feletti) és fertőzöttséget nem mutató hetek követték egymást ebben az életszakaszban (3. ábra). Eredményeink el-
lentmondanak *El-Ashram és mtsai* (2020) megállapításának, miszerint általában az elválasztott állatoknál figyelhető meg a legmagasabb endoparazitás és bakteriális fertőzés és az abból eredően növekvő morbiditási és mortalitási arány.

KÖVETKEZTETÉSEK

Jelen felmérésből kiderült, hogy a *P. ambiguus* jelen van a hazai nagyüzemi gazdaságokban is. A mintákból ugyan relatív kis arányban, de a pete mellett a féreg lárva formája is kimutatható volt.

Az egyes évszakokban eltérő mértékű *P. ambiguus* fertőzöttségi arányokat mutattunk ki, a legkedvezőbb képet a nyári időszak mutatta.

A hizlalási időszakban kaptuk a legkedvezőbb képet fertőzöttség tekintetében, kisebb arányú fertőzöttséget mutattunk ki, mint a laktációs időszakban.

IRODALOMJEGYZÉK

- Abdel-Gaber R., Ataya F., Fouad D., Daoud M., Alzuhairy S. (2019). Prevalence, morphological and molecular phylogenetic analyses of the rabbit pinworm, *Passalurus ambiguus rudolphi* 1819, in the domestic rabbits *Oryctolagus cuniculus*. *Acta Parasitol* 64(2), 316-330. DOI: [10.2478/s11686-019-00047-7](https://doi.org/10.2478/s11686-019-00047-7)
- 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(2), 149-156. DOI: [10.1016/s0301-6226\(01\)00307-4](https://doi.org/10.1016/s0301-6226(01)00307-4)
- 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*, 10(3), 537. DOI: [10.3390/ani10030537](https://doi.org/10.3390/ani10030537)
- Gerencsér, Zs., Odermatt, M., Atkári, T., Szendrő, Zs., Radnai, I., Nagy I., Matics, Zs. (2013). Comparison of housing growing rabbits in small and large group 18th International Symposium on Housing and Diseases of Rabbits, Furproviding Animals and Pet Animals., 22-23 May, 2013, Celle, Germany, 20-27.
- Hoy St (2009). Rabbit housing with respect to animal welfare. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 116, 97-100.

- Hönich M., Sugár L., Kemenes F. (1978). A vadon élő állatok betegségei. Mezőgazda Kiadó, Budapest
- 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.
- Kassai T. (2003). Helminológia. Medicina könyvkiadó, Budapest
- Kotlán S., Kobulej T. (1972). Parazitológia. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest
- Lambertini L., Vignola G., Zagnini G. (2001). Alternative pen housing system for fattening rabbits: Effect of group density and litter. *World Rabbit Sci.*, 9(4), 141-147. DOI: [10.4995/wrs.2001.457](https://doi.org/10.4995/wrs.2001.457)
- Le Normand B., Chatellier S., Mercier P. (2016). Natural *Passalurus ambiguus* infestation in a rabbit farm. Interest of the mini flotac method to assess helminth eggs and to ensure 1 year follow-up of animals after Flubendazole based treatments. In Proc.:11th World Rabbit Congress, June 15-18, 2016. Qingdao, China, 553-556.
- Mykhailiutenko S. M., Kruchynenko O. V., Klymenko O. S., Serdioucov J. K., Dmytrenko N. I., Tkachenko V. V. (2019). Pathomorphological changes in the large intestine of rabbits parasitised by *Passalurus ambiguus* (Nematoda, Oxyuridae) Regul. Mech. Biosyst., 10(1), 69–74. DOI: [10.15421/021911](https://doi.org/10.15421/021911)
- Orova Z., Szendrő Zs., Matics Zs., Radnai I., Biró-Németh E. (2004). Free choice of growing rabbits between deep litter and wire net floor in pens. 8th World Rabbit Congress, Puebla City, Mexico, 1263-1265.
- Prinz Z., Dalle Zotte A., Radnai I., Biro-Németh E., Matics Zs., Gerencsér Zs., Nagy I., Szendrő Zs. (2008). Behaviour of growing rabbits under various housing conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci.*, 111(3-4), 342-356. DOI: [10.1016/j.applanim.2007.06.013](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2007.06.013)
- Sioutas G., Evangelou K., Vlachavas A., Papadopoulos E. (2021). Deaths Due to Mixed Infections with *Passalurus 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)
- Szendrő Zs. (2016). A házinyúl viselkedésével és jóllétével kapcsolatos kísérleti eredményeink. Hol érzi jól magát a nyúl? Kérdezzük meg a nyulakat is! Az MTA levelező tagjának székfoglaló előadása
- Szendrő Zs. (2017). A házinyúl viselkedésével és jóllétével kapcsolatos kísérleti eredményeink: Hol érzi jól magát a nyúl? Kérdezzük meg a nyulakat is! 29. Nyúltenyésztési Tudományos Nap. Kaposvár, 91-125.
- Szendrő Zs., Dalle Zotte (2011). Effect of housing conditions on production and behaviour of growing meat rabbits A review. *Livest. Sci.*, 137(1-3), 296-303. DOI: [10.1016/j.livsci.2010.11.012](https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.11.012)

URL1: <https://www.nyultermektanacs.hu>

URL2: <https://vcahospitals.com/know-your-pet/pinworms-in-rabbits>

URL3: http://www.medirabbit.com/HU/Digestive/Parasites/Pass_hu.htm

URL4: <https://www.rvc.ac.uk/review/parasitology/EggCount/Purpose.htm>



© Copyright 2022 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

The occurrence of *Dirofilaria repens* in dogs in the southern Transdanubia

Henrietta Kinga TÖRÖK¹, Ágnes TURGYÁN², Fruzsina SZENTPÁLI²,
Gábor NAGY^{1*}, Ágnes CSIVINCSIK¹

¹Hungarian University of Agriculture and Life Sciences Kaposvár Campus, Institute of Physiology and Nutrition, One Health Working Group, Guba S. u. 40., H-7400 Kaposvár, Hungary

²Boby-Vet Small Animal Practice, Posta u. 56., H-7400 Kaposvár, Hungary

ABSTRACT – *Dirofilaria repens* causes skin worm infection in canid species and humans. This parasite needs mosquitoes as intermediate hosts in their lifecycle. By warming of the global climate, more and more areas become suitable mosquito habitats. Therefore, mosquito transmitted diseases can emerge in new areas. In this study, the authors investigated the dog population of the south Transdanubia, the southernmost part of Hungary to determine the average *D. repens* prevalence. By Knott's test and molecular confirmation of infected status, 11.7% prevalence could be detected in 95 domestic dogs. In risk analysis, urban residence and female sex proved to carry high risk of infection. On the other hand, age, breed, hair length showed no impact on infection status. Though all these features seemed important in mosquito biting success, this study could not support the relevance of them.

Keywords: *Dirofilaria repens*, dog, southern Transdanubia

INTRODUCTION

Of the 27 species of *Dirofilaria* currently known, *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* are the most important. The species of worms that cause heartworms (*D. immitis*) and skinworms (*D. repens*) in dogs are also of significant public health importance on the European continent. These *Dirofilaria* species develop indirectly, developing into adults through 5 larval stages in their biological cycle, which requires both final and intermediate hosts. Infectious larvae of helminths develop in mosquitoes. About 60-70 species of the *Culicidae* family belonging to several genera are considered as potential intermediate hosts and vectors worldwide (McCall *et al.*, 2008). The role of the final host for both parasites is predominantly played by canine predators (dog, wolf, fox, jackal), but also occurs in cats, weasels, and bears (Otranto and Deplazes, 2019).

Humans can also become infected, but the worm, with rare exceptions, remains infertile (Pampiglione *et al.*, 2001; Petrocheilou *et al.*, 1998; Negahban *et*

*CORRESPONDING AUTHOR

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Kaposvári Campus

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

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

al., 2007). Infections in humans usually manifest as a single subcutaneous nodule caused by filaria trapped by the immune system (Pampiglione et al., 2000, 2001). Subcutaneous migration of the worm can cause local swellings with varying localization. In addition, rare organ manifestations involving the lungs, male genitals, female breast, or eyes have been reported (Pampiglione et al., 2001).

Until the last decade of the twentieth century, *Dirofilaria repens* occurred mainly in southern European countries, such as Italy, Portugal, Spain, France, and Greece, where dirofilariosis was historically present (Trotz-Williams and Trees, 2003; Genchi et al., 2005). In addition to Europe, *D. repens* also occurs in Asia Minor, Central Asia, and Sri Lanka (Simón et al., 2012). Recent epidemiological studies have confirmed that *D. repens* has appeared and become endemic in many countries in Central and Eastern Europe, where more and more infections have been found in local dogs (Tasić-Otašević et al., 2015; Capelli et al., 2018).

The rapid geographical spread of these parasites to areas of Europe where they were not previously present is explained by several factors. It should be emphasized that increasing warm periods due to climate change can be considered significant for mosquito development activity and seasonal survival, this also contributes to the development of *Dirofilaria* larvae in vectors (Medlock et al., 2007; Genchi et al., 2009, 2011).

The first domestic *D. repens* infections in dogs were reported in Hungary in the late 1990s (Fok et al., 1998). In a decade, the first nationwide *Dirofilaria* survey revealed that the prevalence of *D. repens* infection was 14% (Fok et al., 2007). A bit higher infection level (19%) was observed after a few years (Jacsó, 2014). In the end of the second decade of 2000s, the reported prevalence of *D. repens* infection was 14.2% in Hungarian dogs (Farkas et al., 2020).

In addition, the presence of the parasite has been registered in neighbouring countries such as Germany, the Czech Republic, Slovakia (Figure 1) (Bocková et al., 2013, Sassnau et al., 2009, Kronefeld et al., 2014, Czajka et al., 2014, Svobodvá et al., 2006).

The country most affected south of Hungary is Serbia, where *D. repens* was found in dogs with a frequency of 17-49% (Tasić et al., 2012). The infection has also been found to be widespread in wildlife (Ćirović et al., 2014). Several *D. repens* infections have also been reported in humans (Ćirović et al., 2014, Džamić et al., 2004, Tasić et al., 2011), and a recent survey of canine and human cases has shown the endemic status of dirofilariosis in parts of Serbia (Krstić et al., 2017). Croatia (Janjetović et al., 2010, Marusić et al., 2008, Bezić et al.,

2009) and, less frequently, Bosnia and Herzegovina (Ritter *et al.*, 2012), Montenegro (Dzamić *et al.*, 2004, Radovanovic *et al.*, 2015), and Slovenia (Pampiglione *et al.*, 1995) have also been reported in human infection. In addition, infection with *D. repens* in dogs in the Balkans is spreading, and several human cases have been reported accordingly (Janjetović *et al.*, 2010).

Depending on this, we consider it is essential to examine the southern counties of the Transdanubia in Hungary, such as Baranya and Somogy, for *D. repens*.

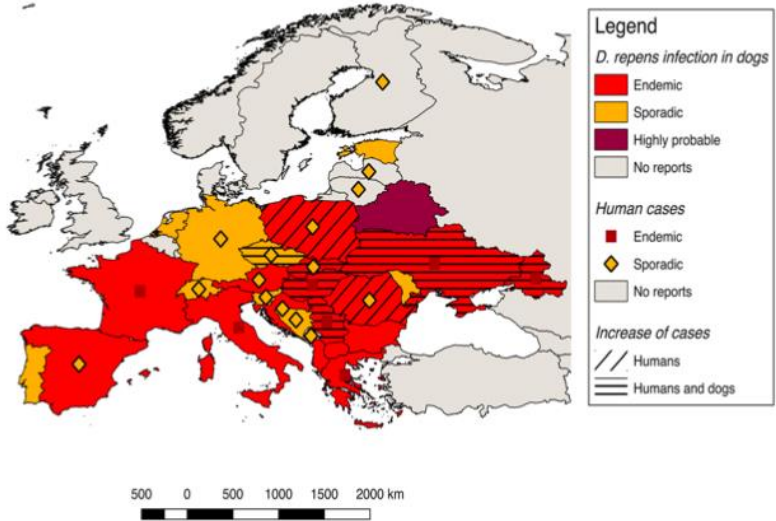


Figure 1. Map showing the prevalence of *Dirofilaria repens* across Europe in dogs and humans (Capelli *et al.*, 2018)

MATERIAL AND METHODS

Parasitological analysis

Dog blood samples (n=95) were collected for the owners' request in veterinary clinics in the southern Transdanubian region of Hungary (Supplementary Table 1). The samples were taken by veterinarians in the daily routine. The aim of the animal health targeted sampling was to confirm the presence of *Dirofilaria immitis* as the causative agent of canine heartworm disease in the animals. All the samples were cooled at 4 °C for few days (maximum 5 days) till the analysis. Modified Knott's test was used to determine the *Dirofilaria* infection

(Zajac and Conboy, 2012). For morphological identification of observed microfilariae, we used Traversa's *et al.* (2010), Liotta's *et al.* (2013) and Magnis's *et al.* (2013) works.

Molecular analysis

Because the morphological overlapping of microfilariae between the two *Dirofilaria* species did not make possible the exact differentiation, we applied a molecular identification, as well. In this approach, we adapted a highly sensitive multiplex PCR. The method allowed then simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* from the peripheral blood samples (Gioia *et al.*, 2010). Briefly, 1mL homogenised blood was diluted and centrifuged with 9 mL distilled water. After removing the supernatant, the dilution-centrifugation process repeated two times. After the final centrifugation the microfilariae were collected from the sediment and lysed using 5% Chelex 100 (Bio-Rad, Hercules, USA) suspension to purify the DNA. For the identification, we applied two sets of primer in the same mixture reaction. On the one hand, we used a general primer pair 12SF (5'-GTTCCAGAATAATCGGCTA-3') and 12SRdeg (5'-ATTGACGGATG(AG)TTTGTACC-3'), which were designed on the 12S rDNA highly conserved region. On the other hand, we used a specific forward primer for *D. immitis* (12SF2B 5'-TTTTTACTTTTTTGGTAATG-3') and a specific reverse primer for *D. repens* (12SR2 5'-AAAGCAACACAAATAA(CA)A-3') to differentiate the two related species. The adapted thermal cycling conditions is shown in Table 1.

Table 1

Steps and conditions of thermal cycling for differentiation of *Dirofilaria* spp.

Steps	Temperature	Time	Cycles
Initial denaturation	92 °C	10 min	1
Final denaturation	92 °C	30 s	
Annealing	49 °C	45 s	40
Extension	72 °C	1 min	
Final extension	72 °C	10 min	1

In this reaction the amplification resulted a 500 bp length product in the conserved region, 204 bp sized fragment in the presence of *D. immitis* and 327 bp fragment if *D. repens* was present in the sample (Gioia *et al.*, 2010).

Statistical analysis

We used the online 1.0.15 version of QPweb parasitological software to determine the prevalence with 95% confidence interval (CI95%) of *Dirofilaria* spp, *D. repens*, and *D. immitis* infection (URL1; *Reiczigel et al.*, 2019). Because some of the samples were confirmed as mixed infection, we did not calculate the mean intensity.

Binary logistic regression model was built to determine the role of some possible driving factors. The chosen variables are shown in Table 2. For analysis, SPSS 27.0 statistical software was used. The approach was applied only in the case of *D. repens* infection.

Table 2

Variables were used in the binary logistic regression

Name	Abbreviation	Coding
age	AGE	age in month
sex	SEX	1=male; 2=female
breed	BREED	FCI standard weight of the breed (kg) 1= 1-10; 2=10.1-25; 3=25<
coat	COAT	Hair length (cm) 1=0.1-3; 2=3-6; 3=6<
location	LOCALITY	Type of the settlement, where the animal lives. 1=city; 2=village

The best fitted model was chosen by the smallest Akaike's Information Criterion (AIC) (*Field*, 2017) and its performance was assessed by using the area under the curve (AUC). We considered the AUC score as a fair one, if it was above 0.7 (*Swets*, 1988).

RESULTS

By the investigation of 95 dog samples, the overall *Dirofilaria* prevalence proved to be 15.8% (CI95%=9.4-24.6%). From the dogs 11 had *D. repens* infection (11.7%; CI95%=6.3-20.1%), and 6 were *D. immitis* infected (6.3%; CI95%=2.8-13.03%). We found three animals with mixed infection (Figure 1 and Figure 2).

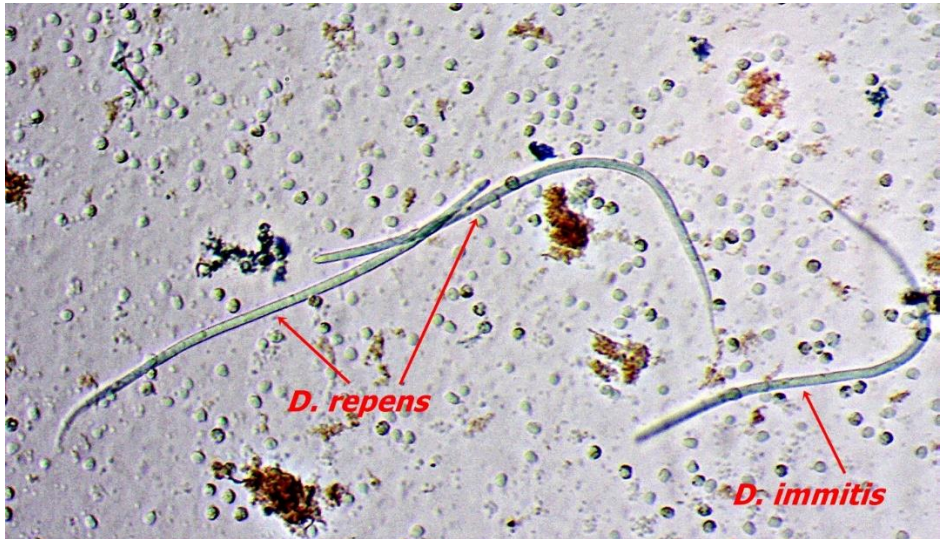


Figure 1. Mixed *Dirofilaria* infection in a sampled dog.

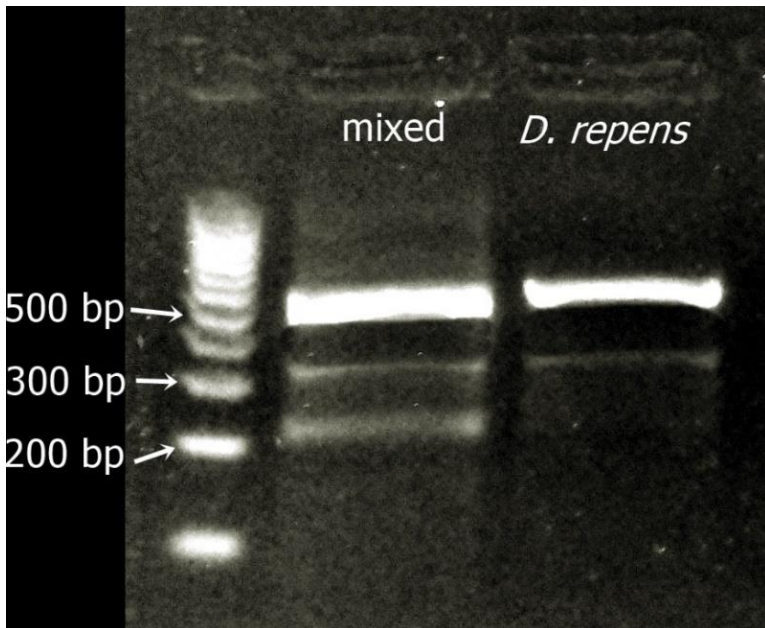


Figure 2. Result of molecular analysis (**mixed**: mixed infection; **D. repens**: only *D. repens* DNA detected in the sample).

The binary logistic model revealed that only LOCALITY and the SEX had affected the *D. repens* infection. Our best model had a 0.69 AUC score ($p=0.043$), while the smallest AIC value was 49.26. In the final model, the settlement type (LOCALITY) had negative regression coefficient, which suggested that in the rural settlements the animals could become infected with a smaller probability than in a city. The analysis of our data predicted that infection in female dogs is more likely than in males (Table 3). The age, breed, and hair-length showed no correlation with infection.

Table 3

Binary logistic regression for *D. repens* infection of badger

Predictor	β^1	p-value	OR ²	OR CI95%	
				Lower	Upper
LOCALITY _(city) ³	-2.319	0.008	0.067	0.098	0.539
SEX _(male) ⁴	2.261	0.044	9.59	1.07	86.23
CONSTANT	2.837	0.006			

¹ regression coefficient; ² odds ratio; ³the reference category=city; ⁴ the reference category=male

DISCUSSION

Our study surveyed the occurrence of *D. repens* in the southern Transdanubia by the investigation of dogs' whole-blood samples. This area is the southern-most part of Hungary with sub-Mediterranean climate. Our hypothesis was that the effect of the global climate change would be detected here first in the country. We aimed to determine the prevalence and to compare it with previous surveillance data, and to identify the risk factors of infection for a dog.

This study detected 11.7% average prevalence for *D. repens* in the region, which was lower than the previously reported Hungarian dog data. Previous surveys showed that most of the infected dogs were kept by the two largest rivers, the Danube and Tisza where environmental conditions for mosquito breeding are ideal (Farkas *et al.*, 2020). Our study site, the southern Transdanubia also provides appropriate conditions for the intermediate hosts. Large forest-covered areas, wet grasslands, plenty of fishponds characterise the studied sites. Despite the humid environment and the warm climate, our data fell behind the prevalence measured during the first two decades of the century.

Moreover, our data suggest that urban areas carry higher risk of *D. repens* infection for dogs than rural areas, though the latter ones lie closer to wetlands,

which are ideal mosquito habitats. The epidemiological role of cities needs further research, but two possible explanations emerged. Urbanised areas can form heat islands, which have higher average temperature than the surrounding natural or semi-natural areas (*Chick et al., 2019; de Jesús Crespo et al., 2021*). In these circumstances, yearly breeding periods of intermediate hosts can extend, and more generations of mosquitos can develop and act as a disease transmitter.

The very dense dog population of the cities can provide another explanation for the increased health risk of the urban areas. Stray dogs, shelter dogs, and backyard guard dogs might form a reservoir that more important than the natural populations of red foxes and golden jackals.

Our findings confirmed that the age of an adult animal could not influence the infection status. We hypothesised that the risk of infection increased by age. In adult animals, this hypothesis could not be supported, whereas both young and very old animals were found to be positive. Further research should be extended to subadult animals to determine the beginning of the risk period of a dog's life exactly.

The apparent susceptibility of female animals is an interesting phenomenon, which is hardly explicable. The distinction between certain breeds seems more relevant than the uncommonness of females and males. Difference between body size, hair length, skin thickness of different breeds, which characteristics might influence biting success of mosquitoes, proves to be bigger than difference between an 'average' female and male dog. Therefore, susceptibility of the two sexes will need further research with larger sample size.

In our study, neither body size nor hair length proved to have an impact on the infection status. Though both of these factors might affect the biting frequency of mosquitoes. Among backyard guard dogs, which are kept outdoor all-year round, more large breed individuals can be found than among house pets. Though, most outdoor dogs have longer hair than their pet counterparts. The exact role of hair length, body size should be investigated considering also husbandry attributes, which are also very important in infection risk assessment.

We did not get information on preventive actions applied by the owners to protect their dogs against insect bites and/or dirofilariosis. Antiparasitic treatments could also modify the impact of other risk factors such as body size, hair length, breed, age etc. In future research, it would be worth investigating the efficacy of different protective attempts.

CONCLUSIONS

As a result of the recent study, we can conclude that by parasitological investigation of 95 dog blood samples, a 11.7% *D. repens* prevalence could be detected. This value was lower than the prevalence that was confirmed previous studies. Our additional finding was that urban environments posed higher risk of *D. repens* infection for dogs than rural areas. Based on this experience, we hypothesised that urban dog populations could be more important reservoirs of *D. repens* than natural populations of wild canids. This hypothesis will need further research to be confirmed. For analysing the other important risk factors, more information on husbandry and antiparasitic actions should be collected because these conditions can modify the epidemiological impacts of the dogs' natural features.

REFERENCES

- Bezić, J. (2009). Human dirofilariasis in Croatia. *Acta Dermatovenerologica Croatica*, 17, 82–3.
- Bocková, E., Rudolf, I., Kočíšová, A., Betášová, L., Venclíková, K., Mendel, J., Hubálek, Z. (2013). *Dirofilaria repens* microfilariae in *Aedes vexans* mosquitoes in Slovakia. *Parasitology Research*, 112(10), 3465–70. DOI: [10.1007/s00436-013-3526-9](https://doi.org/10.1007/s00436-013-3526-9)
- Capelli, G., Genchi, C., Baneth, G., Bourdeau, P., Brianti, E., Cardoso, L., Danesi, P., Fuehrer, H.P., Giannelli, A., Ionică, A.M., Maia, C., Modrý, D., Montarsi, F., Krücken, J., Papadopoulos, E., Petrić, D., Pfeffer, M., Savić, S., Otranto, D., Poppert, S., Silaghi, C. (2018). Recent advances on *Dirofilaria repens* in dogs and humans in Europe. *Parasites & Vectors*, 11(1), 663. DOI: [10.1186/s13071-018-3205-x](https://doi.org/10.1186/s13071-018-3205-x)
- Chick, L.D., Strickler, S.A., Perez, A., Martin, R.A., Diamond, S.E. (2019). Urban heat islands advance the timing of reproduction in a social insect. *Journal of Thermal Biology*, 80, 119–125. DOI: [10.1016/j.jtherbio.2019.01.004](https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2019.01.004)
- Cirović, D., Penezić, A., Pavlović, I., Kulišić, Z., Cosić, N., Burazerović, J., Maletić, V. (2014). First records of *Dirofilaria repens* in wild canids from the region of Central Balkan. *Acta Veterinaria Hungarica*, 62(4), 481–8. DOI: [10.1556/AVet.2014.021](https://doi.org/10.1556/AVet.2014.021)
- Czajka, C., Becker, N., Jöst, H., Poppert, S., Schmidt-Chanasit, J., Krüger, A., Tannich, E. (2014). Stable transmission of *Dirofilaria repens* nematodes, northern Germany. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2), 328–31. DOI: [10.3201/eid2002.131003](https://doi.org/10.3201/eid2002.131003)
- Dzamić, A.M., Arsić-Arsenijević, V., Radonjić, I., Mitrović, S., Marty, P., Kranjčić-Zec, I.F. (2004). Subcutaneous *Dirofilaria repens* infection of the eyelid in Serbia and Montenegro. *Parasite*, 11, 239–240.
- Farkas, R., Mag, V., Gyurkovszky, M., Takács, N., Vörös, K., Solymosi, N. (2020). The current situation of canine dirofilariosis in Hungary. *Parasitology Research*, 119(1), 129–135. DOI: [10.1007/s00436-019-06478-5](https://doi.org/10.1007/s00436-019-06478-5)
- Field, Andy. (2017). *Discovering Statistics Using IBM SPSS Statistics*. 5th ed. London, England: SAGE Publications.
- Fok, É., Szabó, Z., Farkas, R. (1998). The first autochthonous case of a dog infected with *Dirofilaria repens* in Hungary. *Kisállatorvoslás*, 4, 218– 219. (in Hungarian).
- Fok, É., Kiss, G., Majoros, G., Jacsó, O., Farkas, R., Gyurkovszky, M. (2007). Preliminary results of an epidemiological survey on dirofilariosis of dogs and cats in Hungary. In: Genchi, C., Rinaldi, L., Cringoli, G. (eds) *Dirofilaria immitis* and *D. repens* in dog and cat and human infections. Roland Editore, Napoli, 194–196.

- Genchi, C., Rinaldi, L., Cascone, C., Mortarino, M., Cingoli, G. (2005). Is heartworm really spreading in Europe? *Veterinary Parasitology*, 133, 137–148. DOI: [10.1016/j.vetpar.2005.04.009](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.04.009)
- Genchi, C., Rinaldi, L., Mortarino, M., Genchi, M., Cringoli, G. (2009). Climate and *Dirofilaria* infection in Europe. *Veterinary Parasitology*, 163, 286–292. DOI: [10.1016/j.vetpar.2009.03.026](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.03.026)
- Genchi, C., Mortarino, M., Rinaldi, L., Cringoli, G., Traldi, G., Genchi, M. (2011). Changing climate and changing vector-borne disease distribution: the example of *Dirofilaria* in Europe. *Veterinary Parasitology*, 176, 295–299. DOI: [10.1016/j.vetpar.2011.01.012](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.012)
- Gioia, G., Lecová, L., Genchi, M., Ferri, E., Genchi, C., Mortarino, M. (2010). Highly sensitive multiplex PCR for simultaneous detection and discrimination of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in canine peripheral blood. *Veterinary Parasitology*, 172(1-2), 160–163. DOI: [10.1016/j.vetpar.2010.04.027](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.027)
- Janjetović, Z., Arar, Z.V., Paradzik, M.T., Sapina, L., Bitunjac, M., Lojen, G., Marinculić A. (2010). Ocular dirofilariasis: a case report. *Acta Medica Croatica*. 64, 41–45. (in Croatian)
- de Jesús Crespo, R., Rogers, R.E. (2021). Habitat segregation patterns of container breeding mosquitos: The role of urban heat islands, vegetation cover, and income disparity in cemeteries of New Orleans. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(1), 245. DOI: [10.3390/ijerph19010245](https://doi.org/10.3390/ijerph19010245)
- Krstić, M., Gabrielli, S., Ignjatović, M., Savić, S., Cancrini, G., Randelović, Momčilović, S., Stojnev, S., Otašević, S. (2017). An appraisal of canine and human cases reveals an endemic status of dirofilariasis in parts of Serbia. *Molecular and Cellular Probes*, 31, 37–41. DOI: [10.1016/j.mcp.2016.08.005](https://doi.org/10.1016/j.mcp.2016.08.005)
- Kronefeld, M., Kampen, H., Sassnau, R., Werner, D. (2014). Molecular detection of *Dirofilaria immitis*, *Dirofilaria repens* and *Setaria tundra* in mosquitoes from Germany. *Parasites and Vectors*, 7, 30. DOI: [10.1186/1756-3305-7-30](https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-30)
- Liotta, J.L., Sandhu, G.K., Rishniw, M., Bowman, D.D. (2013). Differentiation of the microfilariae of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in stained blood films. *Journal of Parasitology*, 99(3), 421–425. DOI: [10.1645/12-10.1](https://doi.org/10.1645/12-10.1)
- Magnis, J., Lorentz, S., Guardone, L., Grimm, F., Magi, M., Naucke, T.J., Deplazes, P. (2013). Morphometric analyses of canine blood microfilariae isolated by the Knott's test enables *Dirofilaria immitis* and *D. repens* species-specific and *Acanthocheilonema* (syn. *Dipetalonema*) genus-specific diagnosis. *Parasites and Vectors*, 6, 48. DOI: [10.1186/1756-3305-6-48](https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-48)
- Marusić, Z., Stastny, T., Kirac, I., Stojčević, D., Kruslin, B., Tomas, D. (2008). Subcutaneous dirofilariasis caused by *Dirofilaria repens* diagnosed by histopathologic and polymerase chain reaction analysis. *Acta Dermatovenerologica Croatica*, 16, 222–225.
- McCall, J.W., Genchi, C., Kramer, L.H., Guerrero, J., Venco, L. (2008). Heartworm disease in animals and humans. *Advances in Parasitology*. 66, 193–285. DOI: [10.1016/S0065-308X\(08\)00204-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)00204-2)
- Medlock, J.M., Barras, I., Kerrod, E., Taylor, M.A., Leach, S. (2007). Analysis of climatic predictions for extrinsic incubation of *Dirofilaria* in the United Kingdom. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 7, 4–14. DOI: [10.1089/vbz.2006.0564](https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0564)
- Negahban, S., Daneshbod, Y., Atefi, S., Daneshbod, K., Sadjjadi, S.M., Hosseini, S.V., Bedayat GR, Abidi H. (2007). *Dirofilaria repens* diagnosed by the presence of microfilariae in fine needle aspirates: a case report. *Acta Cytologica*, 51, 567–750. DOI: [10.1159/000325796](https://doi.org/10.1159/000325796)
- Otranto, D., Deplazes, P. (2019). Zoonotic nematodes of wild carnivores. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 9, 370–383. DOI: [10.1016/j.ijppaw.2018.12.011](https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.12.011)
- Pampiglione, S., Canestri Trotti, G., Rivasi, F. (1995). Human dirofilariasis due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: a review of world literature. *Parassitologia*, 37, 149–93.
- Pampiglione, S., Rivasi, F. (2000). Human dirofilariasis due to *Dirofilaria* (*Nochtiella*) *repens*: an update of world literature from 1995 to 2000. *Parassitologia*. 42, 231–254.

- Pampiglione, S., Rivasi, F., Angeli, G., Boldorini, R., Incensati, R.M., Pastormerlo, M., Pavesi M, Ramponi A. (2001). Dirofilariasis due to *Dirofilaria repens* in Italy, an emergent zoonosis: report of 60 new cases. *Histopathology*, 38, 344–54. DOI: [10.1046/j.1365-2559.2001.01099.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2001.01099.x)
- Petrocheilou, V., Theodorakis, M., Williams, J., Prifti, H., Georgilis, K., Apostolopoulou, I., Mavrikakis M. (1998). Microfilaremia from a *Dirofilaria*-like para- site in Greece. *Case report. APMIS*. 106, 315–318.
- Radovanovic Spurnic, A.P., Stevanovic, G., Dakic, Z., Ofori Belic, I., Spurnic, I., Pelemis, M. (2015). Human subcutaneous dirofilariasis - case report. *Medicinski pregljed*, 68, 273–276. DOI: [10.2298/mpns1508273r](https://doi.org/10.2298/mpns1508273r)
- Reiczigel, J., Marozzi, M., Fábíán, I., Rózsa, L. (2019). Biostatistics for Parasitologists - A Primer to Quantitative Parasitology. *Trends in Parasitology*, 35(4), 277–281. DOI: [10.1016/j.pt.2019.01.003](https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.01.003)
- Ritter, A., Egger, S., Emesz, M. (2012). Dirofilariose: Subkonjunktivale Infektion mit *Dirofilaria repens*. *Ophthalmologie*. 109, 788–790. (In German) DOI: [10.1007/s00347-012-2541-z](https://doi.org/10.1007/s00347-012-2541-z)
- Sassnau, R., Dyachenko, V., Pantchev, N., Stöckel, F., Dittmar, K., Dauschies, A. (2009). *Dirofilaria repens* infestation in a sled dog kennel in the federal state of Brandenburg (Germany). *Diagnosis and therapy of canine cutaneous dirofilariosis. Tierärztliche Praxis Ausgabe K Kleintiere—Heimtiere*. 37, 95–101. (in German)
- Simón, F., Siles-Lucas, M., Morchón, R., González-Miguel, J., Mellado, I., Carretón, E., Montoya-Alonso, J.A. (2012). Human and animal dirofilariasis: the emergence of a zoonotic mosaic. *Clinical Microbiology Reviews*, 25, 507–544. DOI: [10.1128/CMR.00012-12](https://doi.org/10.1128/CMR.00012-12)
- Svobodová, Z., Svobodová, V., Genchi, C., Forejtek, P. (2006). The first report of autochthonous dirofilariosis in dogs in the Czech Republic. *Helminthologia*, 43, 242–245. DOI: [10.2478/s11687-006-0046-5](https://doi.org/10.2478/s11687-006-0046-5)
- Swets, J.A. (1988). Measuring the accuracy of diagnostic systems. *Science*, 240, 1285–1293. DOI: [10.1126/science.3287615](https://doi.org/10.1126/science.3287615)
- Tasić, S., Stoiljković, N., Miladinović-Tasić, N., Tasić, A., Mihailović, D., Rossi, L., Gabrielli S, Cancrini G. (2011). Subcutaneous dirofilariosis in south-east Serbia - case report. *Zoonoses and Public Health*, 58, 318–322. DOI: [10.1111/j.1863-2378.2010.01379.x](https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2010.01379.x)
- Tasić, A., Tasić-Otašević, S., Gabrielli, S., Miladinović-Tasić, N., Ignjatović, A., Đorđević, J., Dimitrijević S, Cancrini G. (2012). Canine *Dirofilaria* infections in two uninvestigated areas of Serbia: epidemiological and genetic aspects. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 12, 1031–1035. DOI: [10.1089/vbz.2011.0949](https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0949)
- Tasić-Otašević, S.A., Trenkić Božinović, M.S., Gabrielli, S.V., Genchi, C. (2015). Canine and human *Dirofilaria* infections in the Balkan Peninsula. *Veterinary Parasitology*, 209, 151–156. DOI: [10.1016/j.vetpar.2015.02.016](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.02.016)
- Traversa, D., Di Cesare, A., Conboy, G. (2010). Canine and feline cardiopulmonary parasitic nematodes in Europe: emerging and underestimated. *Parasites and Vectors*, 3, 6. DOI: [10.1186/1756-3305-3-62](https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-62)
- Trotz-Williams, L.A., Trees, A.J. (2003). Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Veterinary Records*, 152, 97–105. DOI: [10.1136/vr.152.4.97](https://doi.org/10.1136/vr.152.4.97)
- Zajac, A.M., Conboy, G.A. (2012). *Veterinary clinical parasitology*, 8th ed., Wiley-Blackwell Publishing, Chichester, West Sussex, England, pp. 13–14.

URL1: <https://www2.univet.hu/qpweb/qp10/index.php>



© Copyright 2022 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.



Preliminary report

Cytological and microbiological examination of bovine milk in *Prototheca*-infected dairy herd

Janka TURBÓK^{1*}, Gábor TORNYOS³, Róbert KOCSIS⁴, Judit SÜLE⁴,
Tamás TÓTH⁴, Henrietta BUZÁS⁴, Gábor SZAFNER⁴, Virág ÁCS⁵,
Zoltán ZOMBORSZKY²

¹ Department of Physiology and Animal Health, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences (MATE), Kaposvár Campus, Hungary 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

² Embryo Transfer Center, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences (MATE), Kaposvár Campus, Hungary 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

³ Veterinarian, Hungary 7472 Szentbalázs, Fő u. 45.

⁴ Hungarian Dairy Research Institute Ltd., Hungary, 9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony u. 24.

⁵ Department of Farm Animal Nutrition, Hungarian University of Agriculture and Life Sciences (MATE), Kaposvár Campus, Hungary 7400 Kaposvár, Guba S. u. 40.

ABSTRACT – In healthy milk the somatic cell count (SCC) is less than 100.000 cells per mL, although in the presence of infectious agents, especially pathogenic bacteria, SCC can be extremely high. Cytological appearance of inflammation in mammary gland depends on the origin and the time-course of the inflammatory response. According to predominant cell type there can be suppurative, pyogranulomatous, granulomatous and lymphocytic inflammation. *Prototheca* spp. as facultative pathogen creates chronic inflammation in mammary gland with high SCC and reduced milk production. The aim of our study was to elaborate a practical and accurate laboratory procedure to enhance the precision of milk somatic cell differentiation, and to provide quick and easy-to-perform detection for the presence of infectious algae in mastitis cases. In 95 quarter samples SCC was determined by California Mastitis Test, cellular density estimation and somatic cell differentiation were carried out by microscopically evaluation, while presence of *Prototheca* spp. was investigated with the help of specific culture medium (PIM agar). According to CMT results, SCC values showed 67.3% prevalence of mastitis, from which 6.3% was clinical and 93.7% subclinical. Comparing CMT results and estimated cellularity values indicated tight correlation. In CMT negative quarters 60% of somatic cells were neutrophil granulocytes, while in CMT positive but *Prototheca* spp. negative cases these cells were present in 74%. Interestingly in *Prototheca* spp. positive samples only 60.25% of cells were neutrophil granulocytes, while macrophages and lymphocytes were present in 17% and 18.3%, respectively. Moreover, remarkable cytological pattern was notified in some samples that were positive for *Prototheca* spp., and statistical analysis showed tight correlation between infectious algae and the ratio of macrophages ($p=0.005$). In conclusion laboratory techniques applied in our study seems to be helpful supplementary methods to reveal pathological background of mastitis as well as to monitor the progression of inflammatory reactions.

Keywords: mastitis, somatic cell count, infectious algae, cytology, cattle

*CORRESPONDING AUTHOR

Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Kaposvári Campus

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

E-mail: turbok.janka@uni-mate.hu

INTRODUCTION

Besides reproductive problems, metabolic diseases and foot disorders, mastitis with different origin and severity has the most remarkable economic impact in dairy herds. In mastitis cases economic losses are connected to significant decrease of milk production, as well as the increased number of cullings (Olechnowicz *et al.*, 2011). Results of a Hungarian study support that consequences of mastitis in large sized dairy herds can be remarkably reduced milk production together with severe quality degradation, at the same time numbers of premature culling and veterinarian charges can be notifiable elevated (Ózsvári *et al.*, 2003).

In both healthy and pathological cases different cells can be found in raw milk, these are the so called somatic cells. Somatic cells are originated from either the mammary gland parenchyma or the blood circulation. In physiological conditions most of the somatic cells are derived from the secretory alveoli and the duct system of mammary gland, while approximately one fourth of somatic cells are white blood cells (Sharma *et al.*, 2011). Generally, in healthy milk the number of somatic cells (i.e. somatic cell count) is less than 100.000 cells per mL, although in the presence of infectious agents, especially pathogenic bacteria, somatic cell count (SCC) can be extremely high as a result of intensive inflammatory reaction in mammary gland tissue (Kehrli *et al.*, 1994). Parallel to increasing SCC, milk production shows reduction, and this kind of negative correlation can already be detected at low SCC values, e.g. 50.000 cells per mL (Pfützner *et al.*, 2017).

Milk somatic cells

Epithelial cells are part of somatic cell population; even in physiological conditions they detach basement membrane, and appear in the lumen of glandular alveoli or the duct system. Together with secreted milk, epithelial cells enter the lactiferous sinus, and they are excreted during milk ejection. Basically, epithelial cells can be divided in two groups that are glandular alveolar and ductal cells (Monteiro-Riviere, 2006).

Alveolar cells construct secretory units of mammary gland; they can appear as single cuboidal or columnar epithelial cells depending on the specific stage of lactation as well as the quantity of milk accumulated within the alveoli. Glandular alveolar cells perform galactopoiesis, whereby they release milk components via apocrine or merocrine secretion depending on the nature of components (Baumrucker *et al.*, 2016). Ductal cells can be found as single or two-layered cuboidal cells that serve as internal lining of mammary gland ducts from

the smallest intralobular channels until the ultimate papillary ducts (*Boutinaud et al.*, 2002).

The other group of somatic cells in milk is the so called round cells that are derived from the hematopoietic cell lines of the bone marrow. Virtually all types of leukocytes belongs to this group that can be found in the circulation system e.g. neutrophil and eosinophil granulocytes, monocytes and lymphocytes as well as their counterparts existing in mammary gland tissue, like macrophages (*Schwarz et al.*, 2011).

In healthy udder quantity of these cells are usually low, however in the case of mastitis their absolute and relative numbers can dramatically increase (*Leitner et al.*, 2000). For instance, in case of subclinical *Staphylococcus aureus* infection number of somatic cells in milk can be over than 100.000 cells per mL, while in clinical mastitis SCC values can reach 1.000.000 cells per mL or even higher (*Bytyqi et al.*, 2010). In mastitis with of bacterial origin neutrophil granulocytes become rapidly predominant, their proportion among somatic cells may increase from the normal 19% to over 75% (*Alhussien et al.*, 2016). In acute bacterial infections relative number of neutrophil granulocytes often exceeds 90% (*Harmon*, 1994).

Cytology of inflammation

Inflammatory processes manifest in the same way in different tissues; their cytological appearance in mammary gland depends mostly on the origin (infectious or non-infectious), as well as on the time-course of the inflammatory response (acute, subacute, chronic).

Inflammatory reactions, in which neutrophil granulocytes account more than 70% of leukocyte population is called neutrophilic inflammation. In those cases where the proportion of cells is higher than 85% so called purulent or suppurative process is present. Since neutrophil granulocytes possess strong phagocytic activity, their presence in most bacterial infections could be remarkable. However, these cells are the important members of innate immune response, and as a result of chemotactic mediator release they are able to leave blood circulation and migrate in tissues to the scene of inflammation. Thus, neutrophil granulocytes predominate in the acute phase of inflammation regardless of its location or cause (*Alhussien et al.*, 2016).

Fungal and atypical bacterial infections cause pyogranulomatous inflammation, in which proportions of neutrophils are generally lower than 60%, while mononuclear cells i.e. macrophages are present in 20-50%. The same cytological pattern can be seen in chronic inflammatory reactions, where re-

generative or reparative processes predominate. In protracted cases or in special inflammatory reactions e.g. *Mycobacterium bovis* infection, so called granulomatous inflammation is formed, in which proportions of macrophages can be higher than 50%, and epitheloid macrophages or multinucleated giant cells appear (MacNeill, 2017).

In contrast of other tissues e.g. salivary gland or subcutaneous tissue, lymphocytic inflammation is not characteristic in mammary gland. This kind of lesion usually occurs as a consequence of viral infections, late hypersensitivity reactions or immune-mediated disorders, and it means a high mononuclear infiltration where lymphocytes sometimes together with plasma cells predominate. In healthy udder and milk proportion of lymphocytes are usually moderate or low, according to different publishers they are generally present in 15% (Alhussien *et al.*, 2015) or between 10-27% (Riollet *et al.*, 2002). As SCC increases proportion of lymphocytes tend to decrease, if SCC is higher than 400.000 cells per mL lymphocyte ratios are merely 8.6% (Koess *et al.*, 2008).

Protothecal mastitis

Prototheca spp. algae as ubiquitous organisms can be found widespread in nature such as in soil, water sources or plants. However these single cell organisms are saprophytic occasionally they can act as facultative pathogenic microbes both in humans and animals.

Prototheca spp. can infect dairy cattle and create chronic inflammation in mammary gland as well as in sentinel lymph nodes (Pal *et al.*, 2014), which results in high SCC and reduced milk production. *Prototheca* spp. remain long term in udder tissue, they can persist during the dry period and be excreted via milk in the next lactation. Detection of infectious algae is relatively simple on different culture media e.g. blood agar or Sabouraud dextrose agar, although applying selective and differentiating medium could be more beneficial (Cremonesi *et al.*, 2022).

The aim of our study was to elaborate a practical and accurate laboratory procedure in order to enhance the precision of milk somatic cell differentiation in diverse forms of mastitis, as well as to develop a specific culturing and reliable microscopic evaluation method to provide quick and easy-to-perform detection for the presence of infectious algae in mastitis cases.

MATERIAL AND METHODS

Animals

Milk sample collection was carried out in a conventional free stall dairy farm that applies traditional machine milking technology. The study involved 12 dairy cows being at different stages of lactation, the animals were kept free in a group of sixty within an external paddock and stable wing, they were milked twice a day in a herringbone arranged milking parlor.

Altogether 32 udder quarters of the 12 animals were selected fortuitously, and these were sampled three times. Sample collection was performed during morning milking, between the first and second sampling 48 hours elapsed, while between the second and third sampling 7 days passed.

California Mastitis Test

In order to determine somatic cell counts and to reveal the presence of sub-clinical mastitis we used California Mastitis Test (CMT) described below.

Before starting test procedure, we cleaned the teats with a specific udder cleaner solution (Sanitizzante Capezzoli, Allegrini SpA, Grassobbio (BG), Italy), then teats were dried with paper towels. The plastic testing scale was flushed with clean water. After discarding the first few squirts of milk from each teat, the testing scale was held underneath the udder and two squirts from every teat were sprayed onto the scale in their corresponding circle. In order to have only the required amount of milk stayed behind, the testing scale was held sideways, and then as much CMT reagent solution (KerbaTEST, Albert Kerbl GmbH, Buchbach, Germany) as milk was put in each circle. By swerving the scale for ten seconds, the CMT solution with the milk was completely mixed. After combining milk with reagent results were read straight away in order to keep its validity and reliability.

As for the test interpretation, according to KerbaTEST description, when liquid remained in unchanged state, somatic cell count was less than 100.000 cells per mL of milk. In the case of mild strand formation, somatic cell count was estimated between 100.000 and 300.000 cells per mL. When strong coagulation occurred somatic cell count was more than 300.000 cells per mL, and as the highest category, in the case of solid gel formation, somatic cell count was above 500.000 cells per mL of milk. According to aforementioned categories, each samples received a numerical 0-4 CMT result, respectively.

Cytological examination

From the selected quarters ca. 80-100 mL milk samples were collected to sterile plastic urine containers and placed immediately at 6-8°C temperature. Samples were submitted to the laboratory as quickly as it was possible, during the storage and transportation period they were kept under the same cooling conditions.

Laboratory procedures were carried out according to *Dosogne et al. (2003)* with some modifications in dilution, centrifugation and staining. The processing started with a gentle, manual homogenization of the samples within the original collecting containers. After that 4 mL aliquot of each samples were transmitted to sterile centrifuge tubes and diluted by 10 mL of Phosphate buffer solution (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA), pH 7.4. Following multiple manual homogenization, diluted samples were centrifuged at 1500 rpm, 4°C for 5 minutes by VWR Mega Star 600R centrifuge unit (VWR International LLC, Radnor, Pennsylvania, USA). Most of the high fat content supernatant was removed from the samples by manual pipetting, and as a result 1-1.5 mL sedimentation remained in the bottom of the tubes. From the sedimentations 10 µL aliquots were transmitted to specific adhesive glass slides (HistoBond® +M, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Germany) and they were distributed in a circular area with a diameter of 12-15 mm by using the pipette tip in order to create thin smears. Preparations were let dry overnight on room temperature by placing the slides on smooth, horizontal surface.

Smears were fixed and stained by Romanowsky-type fast staining kit (RAL 555®, RAL Diagnostics, Martillac, France). After complete drying, preparations were laid above staining trough and applied by RAL fixative medium sprayed out of a 100mL volume glass atomizer in a way to create a thin covering on the surface. Following 60 minutes of fixation smears were stained by the red component of RAL 555 kit with the same aforementioned spraying technique. After 1 minute staining time, residual dye was discarded and the edges of slides were cleaned by paper towels. The blue component of the staining kit was applied in the same way as the red dye with a quick incubation period as long as 25 seconds. Following the removal of blue colorant, slides were dipped in clean distilled water 5-6 times for 1 second in order to wash off residual dye. Then glass slides were let dry at room temperature in a diagonal standing position for 1 hour. After that smears were treated by Entellan® rapid mounting medium (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) and covered by glass coverslips, they were allowed to dry for 1 hour after that.

Smears were evaluated under light microscope (OLYMPUS BX43, OLYMPUS Corporation, Tokyo, Japan) at magnification 100-1000X. Enumeration of somatic cells was carried out by a manual cell counter (ABACUS CC-100, Twinex PRO Kft., Budapest, Hungary) according to *Leitner et al.* (2000). First, in cytological evaluation general cellularity of samples were estimated in low power fields, according to the average numbers of cells in several fields of view, samples were scored 1-4 as low, moderate, high and very high cellularity, respectively. Thereafter at 400-600X magnification somatic cells were analyzed, and depending on their morphological characteristics they were referred into four different groups: neutrophil granulocyte, macrophage, lymphocyte and epithelial cells, respectively. The last category included all the glandular and ductal epithelial cells derived from the mammary gland parenchyma, although other cell types such as red blood cells or squamous epithelial cells were not considered. In order to enhance the accuracy of results 100-400 nucleated cells were counted depending on the cellularity score of the certain sample. In samples with low cellularity 100 cells were counted and classified, samples with moderate cellularity 200 cells, while with high and very high cellularity scores 400 cells were analyzed and referred. The ratio of each cellular type was determined by percentage calculation. Furthermore, when during microscopic evaluation figures of infectious algae appeared among somatic cells, their presence were recorded, as well.

Preparation of Prototheca Isolation Medium (PIM agar)

In order to detect *Prototheca* spp. colonies a selective differential medium, *Prototheca* Isolation Medium (PIM) agar was applied according to *Pore's* (1973) description. The components needed for the preparation of the medium are detailed in Table 1.

At first potassium hydrogen phthalate and sodium hydroxide were dissolved in 1 L distilled water, following complete dissolution, the remaining ingredients were added to the mixture.

The medium was boiled to dissolve the components completely by heating magnetic stirrer (HSC Ceramic Hot Plate Stirrer, VELP Scientifica, Via Stazione, Italy). hexachlorocyclohexane (0.01g / liter) is an optional ingredient that was added to eliminate arthropod contaminants. The pH was adjusted to 5.1 ± 0.1 at 25°C. The medium was sterilized by Systec VE 55 autoclave (Systec Ltd., Linden, Germany) at 121°C for 15 minutes. Simultaneously, 0.25 g 5-fluorocytosine (Molekula Limited, Darlington, United Kingdom) was dissolved in 10 mL distilled water and then sterilized by filtering through 0.22 µm PES syringe fil-

ter (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S.). Immediately before pouring into Petri dishes, sterile 5-fluorocytosine stock solution was added to *Prototheca* Isolation Medium cooled to between 44 and 47°C.

Until use, poured plates were stored in refrigerator at $4 \pm 2^\circ\text{C}$. At this temperature, the culture medium retained its quality for two weeks.

Table 1

Composition and preparation of *Prototheca* Isolation Medium (PIM agar)

Component	Grams / liter
Potassium hydrogen phthalate	10.0
Sodium hydroxide (NaOH)	0.9
Magnesium sulphate ^a (MgSO ₄)	0.1
Potassium hydrogen phosphate ^a (KH ₂ PO ₄)	0.2
Ammonium chloride ^a (NH ₄ Cl)	0.3
Glucose ^a	10.0
Thiamine-HCl ^a	0.001
Hexachlorocyclohexane ^b	0.01
Agar	20.0
Distilled water to	1.0 L
Adjust pH to 5.1 ± 0.1 at 25°C	
Sterilization: 121°C for 15 minutes in autoclave.	
Filter-sterilized component	
5-Fluorocytosine (5-FC) *	0.25

^a Essential nutrient

^b Optional ingredient for the elimination of arthropod contaminant

* Fungal inhibitor especially for *Candida* and *Cryptococcus* spp.

Selective Culturing of *Prototheca* spp.

The quarter milk samples were aseptically removed from their containers and diluted by mixing 10 mL aliquot with 90 mL 0.1% peptone water. The inoculated plates were incubated in normal atmospheric conditions at 37°C for 72 h.

Colonies suspected of being *Prototheca* spp. were subcultured on PIM plates, and subjected to initial species identification which included macroscopic evaluation of colony morphology as well as microscopic assessment of the colony samples stained by Löffler's methylene blue solution (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Statistical analysis

Statistical analysis of data was carried out with R software 3.6.4 version (R Core Team [2022]. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL1).

In order to determine correlation between CMT, cellularity and different cell types General Lineal Modell (binomial logit function) was utilized under the following formula: $Y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_4X_4 + \beta_5X_5 + \beta_6X_6 + \varepsilon$, in which CMT and cellularity were dependent variables (Y), while the ratios of lymphocytes, macrophages, neutrophil granulocytes, results of *Prototheca* spp. culturing on PIM agar and their microscopically evaluation (X_{1-5}), the last two as binary variables with either negative (0) or positive (1) dimensions. Sampling as an independent variable (X_6) was involved because sample collection took place at three different times. Although all the circumstances and the personnel were the same, some latent alteration might happen which could have an impact on the final results.

According to CMT and *Prototheca* spp. culturing results three groups were created: 1. CMT and *Prototheca* negative, 2. CMT positive and *Prototheca* negative, and 3. CMT and *Prototheca* positive, respectively. A Shapiro-Wilk normality test was applied to the groups to examine the distribution of the variables (neutrophils, macrophages, lymphocytes and epithelial cells), Frequency distributions of different cell types were also calculated, then a non-parametric; Kurksal-Wallis H test with a Mann-Whitney post-hoc test was applied on the data. In addition, Pearson's product-moment correlation test was used to describe the nature of relation between cellularity and CMT values.

All correlations were considered significant on 95% confidence interval ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

CMT results

Altogether 96 quarter samples were collected, unfortunately one sample during the second sampling became technically inappropriate, and thus it was excluded from further investigation. 81% of quarter samples had at least one-plus (+) CMT score in the first sampling, while 90% in the second and 31% in the third sampling, respectively. In summary it meant 67.3% prevalence, from which 6.3% was clinical and 93.7% subclinical mastitis.

On individual level prevalence values were much higher, which meant 33% clinical and 100% subclinical mastitis, ergo all the involved animals had minimum one quarter impaired in at least one of the samplings.

Recent CMT based studies show that clinical and subclinical prevalence in dairy herds worldwide are 12% and 43%, respectively. In Europe these values are quite similar, 26% and 41%, respectively (*Krishnamoorthy et al., 2021*).

These results differ largely from our findings, although in some studies only high CMT scores (+++ and +++) were considered as positive case.

Cellularity

Comparing CMT results and estimated cellularity values indicated tight correlation. Reliability of microscopically assessment was proved by high correlation coefficient (0.75) in spite of cellularity values were derived from subjective estimation ($p < 0.01$) and not from usual microscopic somatic cell count like in other studies (*Takano et al.*, 2018).

Mean values of cellularity show about three times difference between the CMT negative and positive cases (Table 5.). This finding may suggest that however, cellularity results were derived from subjective evaluation instead of automatic somatic cell count, microscopically estimation can possess similar diagnostic values as CMT, although further investigations are necessary to confirm.

Somatic cell differentiation

With microscopically evaluation somatic cells were classified in four different groups: neutrophil granulocytes, macrophages, lymphocytes, and epithelial cells, respectively.

Relative values of cell differentiation were collected separately into three groups based on CMT and *Prototheca* spp. culturing results. Descriptive statistics of the somatic cell types are shown in Table 2., while a summarization of the Kruskal-Wallis H test is illustrated in Table 3. Results show significant differences of somatic cell counts between each group.

Shapiro-Wilk test results of frequency distribution are demonstrated via bar graphs (Chart 1.) which indicate that cell distributions of somatic cells were not normal. Table 4 demonstrates chi-square and probability values of the different cell types in Kruskal-Wallis H test.

The sum of the three sampling showed that in CMT negative quarters 60% of somatic cells were neutrophil granulocytes, which ratio is much higher than results derived from other studies (*Alhussien et al.*, 2016). However in CMT positive but *Prototheca* spp. negative cases these cells were present in 74% that shows good correlation with data from the same publication.

It is interesting that in our study in *Prototheca* spp. positive samples only 60.25% of cells were neutrophil granulocytes, although CMT scores and cellularity were high (Figure 1.).

Table 2

Descriptive statistics of somatic cell types according to three groups of CMT and *Prototheca* spp. culturing results

Group	Variable	Mean	Standard Deviation	N
1	neutrophil gr. %	59,74	19,00	20
	macrophage %	26,34	15,99	20
	lymphocyte %	6,73	3,68	20
	epithelial cell %	7,19	6,41	20
2	neutrophil gr. %	20,80	16,94	70
	macrophage %	5,98	8,44	70
	lymphocyte %	1,49	1,28	70
	epithelial cell %	0,03	0,17	70
3	neutrophil gr. %	64,10	26,60	5
	macrophage %	16,35	7,25	5
	lymphocyte %	18,95	21,66	5
	epithelial cell %	0,60	0,63	5

Group 1. CMT and *Prototheca* negative

Group 2. CMT positive and *Prototheca* negative

Group 3. CMT and *Prototheca* positive

Table 3

Kruskal-Wallis H test values on somatic cells according to CMT and *Prototheca* spp. culturing results

Group	N	Mean ranks			
		Neutro- phils	Macro- phages	Limpho- cytes	Epithelial cells
1	20	77.68b	79.6b	76.97b	81.15b
2	70	37.36a	37.24a	37.21a	37.63a
3	5	78.2b	72b	83.2c	60.6ab
Kurksal -Wallis test re- sults	p- value	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

Group 1. CMT and *Prototheca* negative

Group 2. CMT positive and *Prototheca* negative

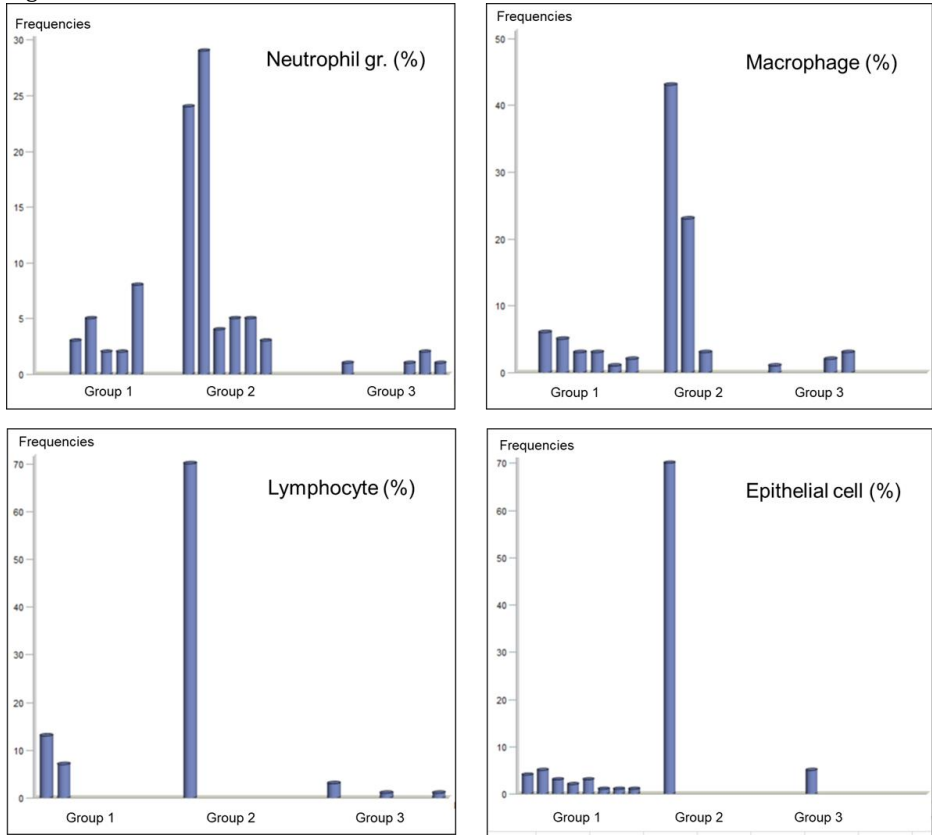
Group 3. CMT and *Prototheca* positive

N = number of samples

a, b, c indicate significant differences between groups

Chart 1

Frequencies of cellular distribution in the three groups of CMT and *Prototheca* spp. culturing results



Group 1. CMT and *Prototheca* negative
 Group 2. CMT positive and *Prototheca* negative
 Group 3. CMT and *Prototheca* positive

Table 4

Chi-square and p-values of different somatic cells in Kruskal-Wallis H test

Somatic cell type	chi-square values	p-values
neutrophil granulocyte	7.563	0.0227
macrophage	10.479	0.0053
lymphocyte	1.529	0.4654
epithelial cell	1.265	0.5311

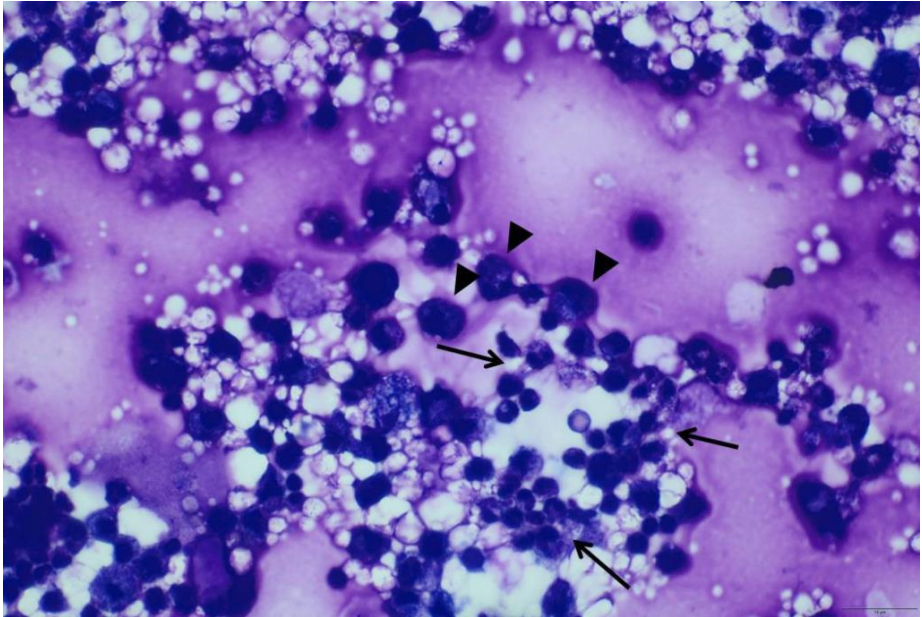


Figure 1. High cellularity milk sample with a mixed population of inflammatory cells: neutrophil granulocytes (arrow) and macrophages (arrowhead). RAL 555 rapid stain, 600X

In addition relative numbers of macrophages in our study substantially deviate from data published by *Alhussien et al.* (2016), for instance in our CMT negative samples the mean percentage of macrophages was only 23.8%, which seems much lower than their findings. The cause of difference could have technical background because in our study macrophages were classified separately from epithelial cells, while in other researches the two cell groups had been categorized together as large mononuclear cells (*Alhussien et al.*, 2015). However in the case of *Prototheca* spp. positive samples ratio of macrophages were very homologous to the aforementioned literature data that was 17%. This is also true for the lymphocyte numbers, because in both CMT negative and positive cases the mean lymphocyte ratio were 22% and 6.2%, respectively.

Cellularity values and somatic cell counts of CMT negative and CMT positive but *Prototheca* spp. negative samples are showed in Table 5. In contrast to cellularity results somatic cell counts do not show remarkable differences between CMT negative and positive groups when samples were free from *Prototheca* spp. High numbers of neutrophil granulocytes in negative samples may

suggest the presence of concurrent bacterial infection which can cause increased relative values, although somatic cell counts remain under the CMT cut off.

Table 5

Mean cellularity scores and somatic cell counts in CMT negative and positive samples from first, second and third sampling

Samples (sampling)	Mean cellularity	Mean neutrophil (%)	Mean macrophage (%)	Mean lymphocyte (%)	Mean epithelial (%)
CMT negative (I.)	1.33	71.00	18.83	5.42	4.58
CMT negative (II.)	1.00	58.00	18.75	10.50	12.75
CMT negative (III.)	1.60	53.58	33.88	6.00	6.53
CMT positive (I.)*	3.83	80.50	12.75	5.20	1.54
CMT positive (II.)*	3.75	71.44	18.38	8.72	1.47
CMT positive (III.)*	3.57	70.10	24.32	4.79	0.75

* *Prototheca*-positive samples are not included

Prototheca spp. positive samples

During microbiological culturing 7 samples were found as *Prototheca* spp. positive, in which 5 cases were confirmed microscopically, as well (Figure 2.).

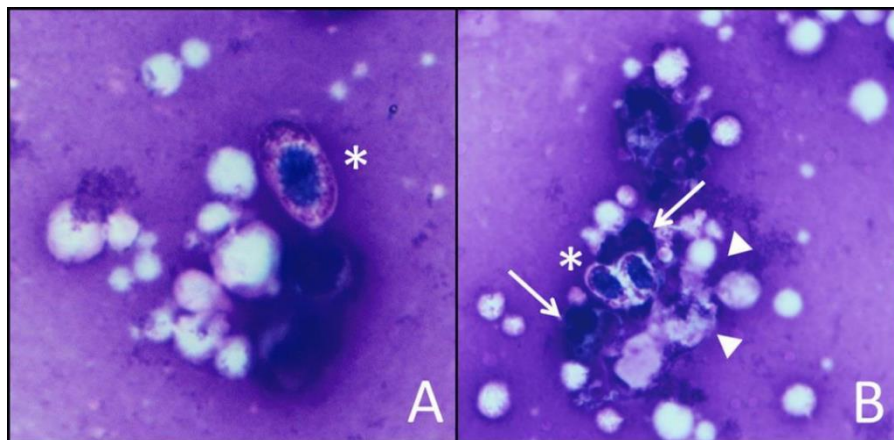


Figure 2. *Prototheca* spp. in mastitis positive milk; A: single *Prototheca* spp. cell (asterix) RAL 555 rapid stain, 1000X ; B: Two *Prototheca* spp. cells (asterix) among neutrophil granulocytes (arrows) and lipid vacuoles (arrowheads) RAL 555 rapid stain, 600X

Table 6

Comparing results of culturing on PIM agar and microscopic examination of *Prototheca*-positive samples from first, second and third sampling

Sam-ple	Cultur-ing I.	Microscopic evaluation I.	Cultur-ing II.	Microscopic evaluation II.	Cultur-ing III.	Microscopic evaluation III.
14.	+	+	+	+	+	+
15.	-	-	+	-	-	-
28.	+	+	+	-	+	+

One sample was positive for infectious algae in the course of the second sampling, but it was negative during the first and the third occasion. Moreover this sample was derived from the right caudal quarter of a cow, whose right cranial quarter gave constantly positive samples for *Prototheca* spp. during the whole study. Thus positivity of the right caudal quarter is questionable; it is strongly suspicious for cross contamination (Table 6.). Statistical assessment showed significant correlation between results of culturing as well as microscopically affirmation of *Prototheca* spp. positivity and CMT scores and cellularity values ($p < 0.05$), although analysis could not find normal distribution in the case of any cell types.

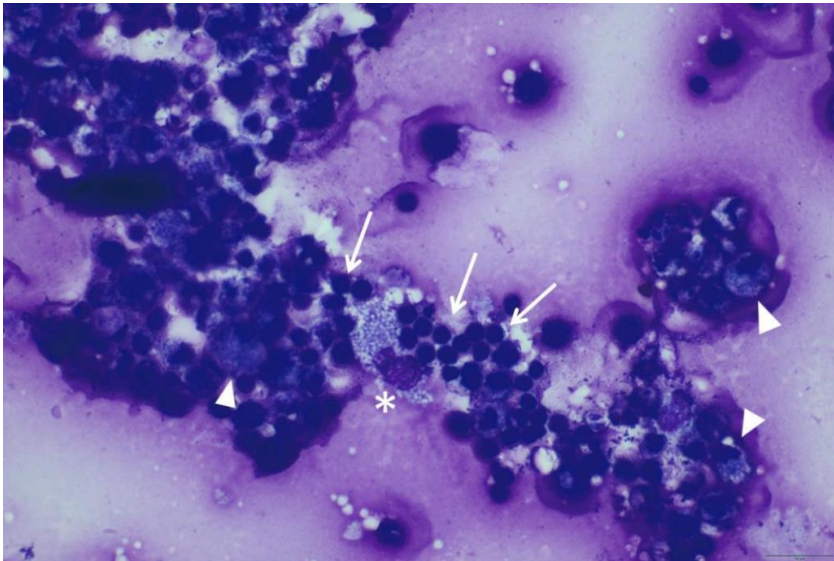


Figure 3. *Prototheca* spp. positive milk sample with high cellularity and large numbers of small lymphocytes (arrows) and macrophages (arrowheads). In the center a mammary foam cell (asterix) can be seen. RAL 555 rapid stain 600X

Besides relative numbers of somatic cell types a remarkable cytological pattern was notified in some samples that were positive for *Prototheca* spp. (Figure 3.). In half of these cases macrophages and lymphocytes displayed strong predominance, moreover medium and large sized lymphocytes were frequently present. In addition statistical analysis of *Prototheca* spp. algae and the ratio of macrophages showed tight correlation ($p=0.005$). This finding is supported by the fact that infections caused by fungi, algae or some kind of bacteria (e.g. *Mycobacterium* spp.) produce pyogranulomatous or granulomatous inflammation, in which ratio of macrophages can be more than 50% (Pal et al., 2014).

Table 7

CMT results, cellularity scores and somatic cell counts in *Prototheca*-positive samples from first, second and third sampling

Samples (sampling)	CM T	Cellularity	Neutrophil (%)	Macrophage (%)	Lymphocyte (%)	Epithelial cell (%)
14. (I.)	4	4	73.25	19.75	7.00	0.00
14. (II.)	4	4	76.50	19.00	4.50	0.00
14. (III.)	4	4	89.75	5.75	3.25	1.25
14. mean	4	4	79.84	14.83	4.91	0.41
15. (II.)	4	4	83.25	13.50	3.00	0.25
28. (I.)	4	4	20.25	24.50	54.00	1.25
28. (II.)	4	4	18.00	19.00	62.50	0.50
28. (III.)	4	4	60.75	12.75	26.00	0.50
28. mean	4	4	33.00	18.75	47.50	0.75
Grand mean	4	4	66.00	15.08	18.30	0.62

Although in our *Prototheca* spp. negative samples high numbers of macrophages seldom occurred, so this presumed unique cytological pattern requires further investigation.

CMT scores, cellularity values and somatic cell counts of *Prototheca* spp. positive samples are showed in Table 7.

CONCLUSIONS

In summary, it has been concluded, that laboratory techniques applied in our study could be helpful supplementary methods besides routine laboratory tests in order to reveal pathological background of mastitis more accurately,

as well as to monitor the progression of inflammatory reactions in the mammary gland tissue.

PIM agar as a selective and differentiating culture medium has been proved to be appropriate diagnostic tool in the detection of *Prototheca* spp. in cow's milk. Although molecular diagnostic tests e.g. Polymerase Chain Reaction (PCR) could be more accurate, because microbial culturing can only detect live agents with adequate dividing ability. It is true that specificity and sensitivity values of microscopically assessment is much lower than culturing, but it could help with the identification of inoperative microbes.

According to the low number of animals and samples being involved, current research should be considered as a preliminary study, which requires more investigations involving much higher number of samples in order to draw further conclusions.

REFERENCES

- Alhussien, M., Kaur, M., Pasumarti, M., Kimothi, S. P., Mohanty, A K., Dang, A. K. (2015). A comparative study on the blood and milk cell counts of healthy, subclinical and clinical mastitis Karan Fries cows. *Veterinary World*, 8(5), 685-689. DOI: [10.14202/vetworld.2015.685-689](https://doi.org/10.14202/vetworld.2015.685-689)
- Alhussien, M., Manjari, P., Sheikh, A. A., Seman, S. M., Reddi, S., Mohanty, A K., Dang, A. K. (2016). Immunological attributes of blood milk neutrophils isolated from crossbred cows during different physiological conditions. *Czech J. Anim. Sci.*, 61(5), 223-231. DOI: [10.17221/63/2015-cjas](https://doi.org/10.17221/63/2015-cjas)
- Baumrucker C.R., Macrina A.L. (2016). Hormones and Regulatory Factors in Bovine Milk. Reference Module in Food Science, Elsevier, ISBN 9780081005965; (Latest download: 18/05/2022, LINK: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780081005965008155>)
- Boutinaud, M. and Jammes, H. (2002). Potential uses of milk epithelial cells: A review. *Reprod. Nutr. Dev.*, 42(2), 133-147. DOI: [10.1051/rnd:2002013](https://doi.org/10.1051/rnd:2002013)
- Bytyqi, H., Zaugg, U., Sherifi, K., Hamidi, A., Gjonbalaj, M., Muji, S., Mehmeti, H. (2010). Influence of management and physiological factors on somatic cell count in raw milk in Kosova. *Veterinarski Arhiv*, 80(2), 173-183.
- Cremonesi, P., Monistero, V., Moroni, P., Barberio, A., Almeida, R., Latorre, A. A., Castiglioni, B. (2022). Detection Method. In: Paul L.H. McSweeney, John P. McNamara (Eds), *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Third Edition. Elsevier Academic Press, Amsterdam, Netherlands, 457-468, DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22977-6>.
- Dosogne, H., Vangroenweghe, F., Mehrzad, J., Massart-Leën, A. M., Burvenich, C. (2003). Differential leukocyte count method for bovine low somatic cell count milk. *J Dairy Sci.* 86(3), 828-834. DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(03\)73665-0](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(03)73665-0)
- Harmon, R. J. (1994). Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. *J. Dairy Sci.* 77(7), 2103-2112. DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(94\)77153-8](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(94)77153-8)
- Kehrl, M. E., Shuster, D. E. (1994). Factors Affecting Milk Somatic Cells and Their Role in Health of the Bovine Mammary Gland. *J. Dairy Sci.* 77(2), 619-627. DOI: [10.3168/jds.s0022-0302\(94\)76992-7](https://doi.org/10.3168/jds.s0022-0302(94)76992-7)
- Koess, C., Hamann, J. (2008). Detection of mastitis in the bovine mammary gland by flow cytometry at early stages. *Journal of Dairy Research*, 75(2), 225-232. DOI: [10.1017/s0022029908003245](https://doi.org/10.1017/s0022029908003245)

- Leitner, G., Chaffer, M., Krifucks, O., Glickman, A., Ezra, F., Saran, A. (2000). Milk leucocyte populations in heifers free of udder infection. *Journal of Veterinary Medicine, Series B*, 47 (2), 133 – 138. DOI: [10.1046/j.1439-0450.2000.00329.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00329.x)
- Leitner, G., Shoshani, E., Krifucks, O., Chaffer, M., Saran, A. (2000). Milk leucocyte population patterns in bovine udder infection of different aetiology. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 47(8), 581-589. DOI: [10.1046/j.1439-0450.2000.00388.x](https://doi.org/10.1046/j.1439-0450.2000.00388.x)
- MacNeill, A. L. (2017). General Principles of Inflammation. In: Barger, A. M., MacNeill, A. L. (Eds), *Small Animal Cytologic Diagnosis*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 23-44. DOI: [10.1201/9781315373560-2](https://doi.org/10.1201/9781315373560-2)
- Monteiro-Riviere N. A. (2006). Integument. In: Eurell J. A., Frappier B. L. (Eds), *Dellmann's Textbook of Veterinary Histology*, with CD, 6th Edition. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa, USA, 340-342. ISBN: 978-0-781-74148-4
- Olechnowicz, J., Jaskowski, J. M. (2011). Reasons for culling, culling due to lameness, and economic losses in dairy cows. *Medycyna Weterynaryjna*, 67(9), 618-621.
- Ózsvári, L., György, K., Illés, B. C., Bíró, O. (2003). A tőgygyulladás által okozott gazdasági veszteségek számszerűsítése egy nagyüzemi holstein-fríz tehenészetben (Quantification of economic losses caused by mastitis on a large-scale Holstein-Friesian dairy farm). *Magyar Állatorvosok Lapja* 125 (május), 273–79.
- Pal, M., Abraha, A., Rahman, T., Dave, P. (2014). Protothecosis: an emerging algal disease of humans and animals. *Int. J. LifeSc. Bt & Pharm. Res.*, 2014;3(4) 16.
- Pore, R. S. (1973). Selective medium for the isolation of Prototheca. *Appl Microbiol*. 26(4), 648-649. DOI: [10.1128/am.26.4.648-649.1973](https://doi.org/10.1128/am.26.4.648-649.1973)
- Riollet, C., Rainard, P., Poutrel, B. (2002). Cells and Cytokines in Inflammatory Secretions of Bovine Mammary Gland. In: Mol, J. A., Clegg, R. A. (Eds) *Biology of the Mammary Gland. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 480. Springer, Boston, MA, 247-258. DOI: [10.1007/0-306-46832-8_30](https://doi.org/10.1007/0-306-46832-8_30)
- Schwarz, D., Diesterbeck U. S., König S., Brügemann K., Schlez K., Zschöck M., Wolter W., Czerny C.-P. (2011). Flow cytometric differential cell counts in milk for the evaluation of inflammatory reactions in clinically healthy and subclinically infected bovine mammary glands. *J. Dairy Sci.*, 94, 5033-5044. DOI: [10.3168/jds.2011-4348](https://doi.org/10.3168/jds.2011-4348).
- Sharma, N., Singh, N. K., Bhadwal, M. S. (2011). Relationship of Somatic Cell Count and Mastitis: An Overview. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2011;24(3), 429-438. DOI: [10.5713/ajas.2011.10233](https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10233)
- Takano, P. V., Scapini, V. A. C., Valentini T., Kolling Girardini L., Nogueira de Souza F., Libera A. M. M. P. D., Heinemann M. B., Chande C. G., Cortez A., Collet S. G., Diniz S. A., Blagitz M. G. (2018). Milk cellularity and intramammary infections in primiparous and multiparous Lacaune ewes during early lactation. *Small Rum. Res.*, 167, 117-122. DOI: [10.1016/j.smallrumres.2018.08.015](https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2018.08.015).

URL1: <https://www.R-project.org/>.



© Copyright 2022 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.