
2 Pathologisch onderzoek

Auteurs: Lonneke L. IJsseldijk¹, Joeske IJzer¹, Andrea Gröne¹

¹*Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht*

2.1 Materialen en methoden

2.1.1 Autopsie, macro- en microscopie

De autopsie is, na overleg met lokale partijen en het snijteam van Naturalis, en na goedkeuring van de stranding coördinator van LNV, omstreeks 17:00 uur op 01-12-2017 ter plaatse gestart. Het werk is rond 20:00 uur gestaakt door regen en gebrek aan verlichting en zwaar materieel en uitgesteld tot de volgende ochtend. Op 02-12-2017 zijn de werkzaamheden rond 8:00 uur hervat en in de middag ter plaatse afgerond.

De potvis is gemeten, het geslacht is bepaald en het dier is volledig gefotografeerd. De autopsie is, voor zover mogelijk, uitgevoerd volgens eerder beschreven protocollen en methoden (Kuiken & García-Hartmann 1993). Het onderzoek bestond uit een uitgebreid uitwendig en een inwendig onderzoek (voor details zie: IJsseldijk et al. 2018), waarbij alle aanwezige organen, voor zover mogelijk, bekeken, beschreven, beoordeeld en bemonsterd werden. Blubber diktes zijn gemeten op twee locaties (dorsaal en lateraal) craniaal van de linker borstvin. In het bijzonder werd er gelet op aanwijzingen die duiden op decompressieziekte (voor details zie: Jepson et al. 2003 en Fernández et al. 2005).

Voor het histologisch onderzoek werd weefsel gefixeerd en volgens standaardprocedure in paraffine ingebed en gesneden, waarna de coupes werden gekleurd met hematoxyline en eosine (H&E). Erkend veterinaire patholoog Dr. Joeske IJzer heeft de coupes beoordeeld om eventuele afwijkingen op celbasis vast te stellen en ten behoeve van het determineren van de doodsoorzaak van dit dier. Daarnaast is weefsel voor virologisch- en bacteriologisch onderzoek verzameld (respectievelijk ingevroren op -80°C en gekoeld op 4°C tot verdere analyses) en werden parasieten in 70% ethanol verzameld.

De aanwezigheid van parasieten werd gedocumenteerd. De beoordeling van de geassocieerde pathologie is onderdeel van het histologisch onderzoek. Parasieten werden geïdentificeerd op basis van morfologie door parasitoloog Herman Cremers.

2.1.2 Virologie

In totaal zijn 21 samples onderzocht op de aanwezigheid van Influenza virus, Morbilli virus en/of Herpes virus. Dit waren twee lymfe knopen, drie droge swabs (locaties blaasgat; oraal en bindvlies), vier huid laesies, acht weefsels (brein, lever, nier, blaas, maagwand, testes, hart, long en darm) en drie additionele samples (darminhoud, oogzenuw en bindvlies). Nucleïne-zuren werden geïsoleerd uit orgaan homogenaten en swabs. Influenza virus TaqMan RT-PCR is uitgevoerd met gebruik van primers en specifieke probes voor de detectie van Influenza virus Matrix genen. Voor Morbillivirus RT-PCR werden primers gebruikt welke een Phosphoproteïne gen fragment herkennen. Voor Herpes virus PCR werden primers gebruikt welke polymerase gen fragmenten herkennen. Verkregen fragmenten werden gezuiverd en vervolgens gesequenced voor bevestiging en identificatie. Virologisch onderzoek is uitgevoerd door Erasmus MC, Rotterdam.

2.1.3 Bacteriologie

In totaal zijn zes weefsels (long, lever, nier, hersenen, pulmonaire lymfe knopen en milt) en twee additionele samples (bloed en darminhoud) verzameld voor bacteriologisch onderzoek. Het

verzamelde materiaal werd op twee bloedagarplaten en één MacConkeyagarplaat gesmeerd. Eén bloedagarplaat werd anaeroob bebroed (2x24h bij 37°C), de andere bloedagarplaat en MacConkeyplaat werden aeroob bebroed (2x24h bij 37°C). Bij hersen- en long weefsel werd daarnaast een extra plaat ingezet (zgn. chocoladeplaat); deze werd microaërofiel 2x48h bij 37°C bebroed. Bij darminhoud werd ook een zogenoemde BGA plaat ingezet voor onderzoek op Salmonella. Alle platen werden dagelijks beoordeeld op bacteriegroei door een erkend microbioloog. Verdachte kolonies werden geïdentificeerd met behulp van MALDI-TOF. Bacteriologisch onderzoek werd uitgevoerd bij het Veterinair Microbiologisch Diagnostisch Centrum van de Faculteit Diergeneeskunde.

2.1.4 Leeftijdsbepaling en reproductie status

Een longitudinale doorsnede door een tand van een tandwalvis, zoals de potvis, onthult jaarlijkse groeiringen die kunnen worden afgelezen om de leeftijd te bepalen. Eén tand uit de onderkaak is door Naturalis, Leiden vrijgegeven en geanalyseerd om de leeftijd te bepalen volgens de beschreven methode in Perrin & Myrick (1980). Dit onderzoek is uitgevoerd door specialisten van de Veterinaire Universiteit in Hannover, Duitsland. Daarnaast is een monster van de testes histologisch onderzocht om de hoeveelheid sperma productie te beoordelen.

2.2 Resultaten

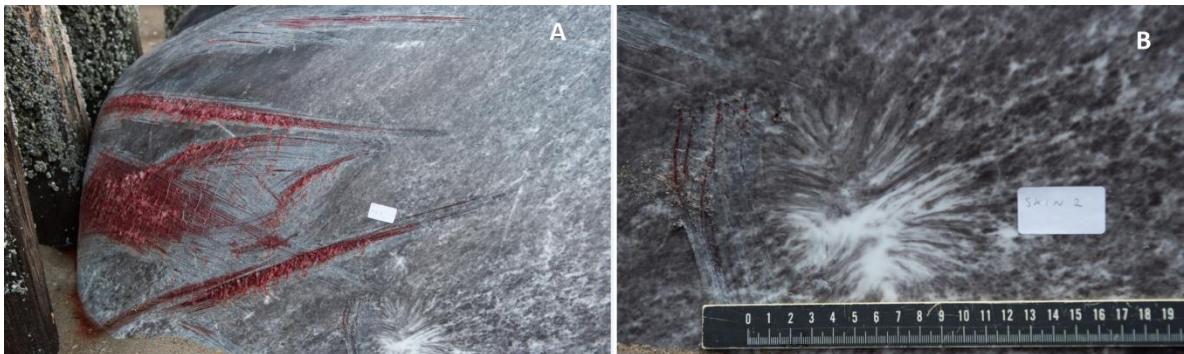
2.2.1 Metingen en uitwendige observaties

De mannelijke potvis had een totale lengte van 12,56 meter, een omtrek van 6,16 meter en blubber diktes tussen de 9-11 centimeter. Het geschatte gewicht op basis van de totale lengte was ~20ton (Lockyer 1991). Het dier lag op zijn rechter zijde (Figuur 1), waardoor alleen de linker zijde kon worden geïnspecteerd. Ook was de onderliggende rechterzijde niet bereikbaar. Uitwendig werden geen tekenen van acuut of chronisch trauma en/of verstrikking gevonden.

De huid vertoonde meerdere lijnvormige krassen, voornamelijk op het rostrum en de laterale zijde, welke zijn geïnterpreteerd als stranding gerelateerde beschadigingen, onder andere door schuring tegen paalhoofden (golfbrekers) waartegen de potvis lag (Figuur 2A). Daarnaast vertoonde het dier op verschillende plekken ronde, stervormige littekens door eerdere beschadigingen (Figuur 2B), welke niet gerelateerd waren aan de stranding. Daarnaast waren de transversale uitsteeksels van de wervels extern zichtbaar (Figuur 1), wat een sterke indicatie is van een slechte bspiering en minimale spek dikte bij dergelijke walvissoorten. In het midden van de blubberlaag waren parasieten aanwezig, later geïdentificeerd als *Phyllobothrium delphini*.



Figuur 1. Ligging van potvis op rechter zijde, met transversale uitsteeksels van de wervels extern zichtbaar door matige bespiering en blubber diktes. Foto's: Bas Niemans (UU).



Figuur 2. Externe beschadigingen aan rostrum (A) en stervormige littekens (B) zichtbaar op de linker zijde van de gestrande potvis. Foto's: Bas Niemans (UU).

2.2.2 Inwendige observaties

De bovenliggende linker kant van de potvis werd geopend en organen, voor zover zichtbaar, beoordeeld. In de maag werden voedselresten terug gevonden, welke verder werden onderzocht in de sectiezaal (zie hoofdstuk 3). De maagwand was beschadigd en leek macroscopisch ulceratief. Er werden tientallen nematoden aangetroffen, later geïdentificeerd als *Anisakis simplex*. De darmen waren gedilateerd en stuwung van bloed was zichtbaar in de bloedvaten op zowel de darmen als in het darmvlies. Er waren meerdere vergroeiingen van het darmvlies tussen verschillende darmlussen, met bindweefselvorming. Dit wijst op een chronische (oude) darmvlies ontsteking (Figuur 3). De delen van de darm welke konden worden onderzocht waren maar matig gevuld. Er zijn geen afwijkingen waargenomen in de lever, milt, pancreas, nieren, blaas en geslachtsorganen, maar postmortale gasvorming en verkleuring bemoeilijkte de beoordeling.

De longen waren soepel en in de bronchie werd schuim (oedeem) aangetroffen. Deze bevinding is een indicatie van levend stranden. Daarnaast werd er in de rechter long een zeer geringe hoeveelheid maaginhoud gevonden, wat een verslikkingspneumonie suggereert. Ook dit past bij levend stranden en is eerder waargenomen bij o.a. enkele van de potvissen die in 2016 op Texel strandde. Ook werd er deels-verteerde maaginhoud in de slokdarm aangetroffen (later verzameld voor het dieet

onderzoek), wat braken voortijdig aan het sterven suggereert. Er zijn geen afwijkingen gevonden in het hart en aan de kop, maar door tijd limitatie kon het brein niet uit de kop worden verwijderd en daardoor niet macroscopisch worden beoordeeld. Een brein monster is door het achterhoofsgat genomen en histologisch verder onderzocht.



Figuur 3. Foto's van de darmen van de potvis met duidelijk stuwung in de vaten en vergroeiingen tussen de darmlussen. Foto's: Youri van Es (WMR).

2.2.3 Histologisch onderzoek

De schaafplekken op de huid van de potvis toonde bloedingen, waaruit kan worden afgeleid dat het dier ten minste enkele van deze plekken in het leven en vermoedelijk tijdens de stranding heeft verkregen. Er zijn in geen van de huid stukken die zijn onderzocht ontstekingsinfiltraten gevonden. De rugspier toont microscopisch degeneratie (afbraak) en andere veranderingen die kunnen passen bij spierschade (capture myopathy). Het longoedeem werd histologisch bevestigd, maar er zijn geen verdere indicatie gevonden welke de verslikkingspneumonie kunnen bevestigen. Ook werden de bevindingen in de maagwand (macroscopisch geïnterpreteerd als ulceraties) niet bevestigd en postmortale veranderingen lijken de meest waarschijnlijke verklaring. De darmen toonde ook postmortale veranderingen (ontbinding), maar de vergroeiingen konden wel nog worden onderzocht. Aanwezigheid van bindweefsel bevestigd een oude chronische darmvliesontsteking (peritonitis), en er werden geen ontstekingscellen meer waargenomen. Dit doet sterk vermoeden dat dit niet verklarend is voor de stranding en vermagering en suggereert dat het dier geen grote nadelige gevolgen van deze afwijking heeft ervaren. De sterk uitgezette bloedvaten op de buitenzijde van de darmen passen bij shock. In geen van de andere onderzochte weefsels zijn afwijkingen of ontstekingen gevonden.

2.2.4 Virologie

Er werd geen indicatie voor een Morbilli- of Influenza virus infectie gevonden. Wel werd er een klein fragment (~200 nucleotides) van een Equid gammaherpesvirus in de blaas gedetecteerd, maar de sequentie data kon niet worden uitgebreid en een Herpesvirusinfectie daardoor niet bevestigd. Contaminatie van de instrumenten of door omgevingsfactoren kon niet worden uitgesloten.

2.2.5 Bacteriologie

Uit de long, lever, nier, hersenen, pulmonaire lymfe knoop en milt werd een anaerobe mengcultuur met onder andere de bacterie *Clostridium perfringens* gekweekt, wat een gram-positieve staafvormige bacterie is die gezien kan worden als een normaal voorkomende bacterie in vegetatie of vlees in staat van ontbinding. Deze bacterie werd daarnaast aangetroffen in grote hoeveelheden in de darminhoud. Uit de darminhoud werden geen bacteriën met significantie voor een specifieke ziekte en uit het bloed werden geen bacteriën gekweekt.

2.2.6 Leeftijd en reproductiestatus

De leeftijd van de potvis is gedetermineerd op 15 jaar (14-16). Er was gering sperma productie in de testes. Op basis van de totale lengte van de potvis, de leeftijd en hoeveelheid sperma productie ging het hier om een sub-adult dier.

2.3 Discussie en conclusie

De potvis die op 1 december te Domburg strandde was een jongvolwassen mannelijke potvis van 15 jaar oud. De potvis was levend gestrand, maar waarschijnlijk spoedig daarna overleden aan de gevolgen van het levend stranden. De strandingsoorzaak was de vermagering waar het dier onder leed; het dier had zichtbaar weinig rugspier en zeer matige vetreserves. Er is geen onderliggende ziekte gevonden die de vermagering, met daarbij behorende verzwakking, kan verklaren.

Levend stranden van walvisachtigen is meestal fataal en ook bij deze potvis werd strandings geassocieerde pathologie gevonden. Liggend op het strand kan een walvis, die geen zwaartekracht gewend is, moeilijker ademen en hierdoor ontstaat een zuurstofgebrek. Door het zuurstofgebrek, en daarnaast grote druk op de spieren aan de zijde waarmee het dier het strand raakt, gepaard met bewegingen welke een dier maakt om weer vrij te komen, zal er vermoedelijk zeer ernstige spierschade (capture myopathy) opgetreden. De sterk uitgezette bloedvaten op de buitenzijde van de darmen bij de Domburgse potvis passen bij shock, wat een gevolg is van de strandingsgerelateerde veranderingen en onderdeel van het sterfproces. Veranderingen in de longen waren een laatste indicatie dat het dier levend op het strand had gelegen en daar overleed.

Tijdens het pathologisch, virologisch en bacteriologisch onderzoek werden geen indicaties gevonden voor een infectieuze ziekte. Daarnaast werden geen indicaties gevonden voor trauma, bijvoorbeeld als gevolg van een aanvaring met een schip; voor verstrikking, bijvoorbeeld in vistuig; en voor decompressieziekte, bijvoorbeeld als gevolg van geluidsverstoring. Tot nu toe is de meest waarschijnlijke verklaring voor het stranden een onvoldoende voedselopname gedurende langere tijd. Het volgende hoofdstuk zal onder andere verder ingaan op de voedingstoestand van dit dier.