Laboratoriumdiagnostiek

een praktische handleiding

Jaël de Kool - van der Woude, DVM MA (red.)

Laboratoriumdiagnostiek

Universiteit Utrecht

Faculteit Diergeneeskunde

Colofon:
ISBN: 978-90-393-6776-6
Uitgave april 2017
Druk en bindwerk: Grafisch bedrijf Ponsen & Looijen b.v., Wageningen

Laboratoriumdiagnostiek

een praktische handleiding

Onder redactie van Jaël de Kool-van der Woude, DVM MA

Auteurs van deze uitgave:

Departement Biochemie & Celbiologie
Dr. C. Bijleveld
Dr. M.J.H. Geelen
Dr. T. van Haeften
Drs. J.W. de Kool - van der Woude (redactie)
Prof. dr. A.G.M. Tielens

Departement Geneeskunde van Gezelschapsdieren
Drs. A.M. van Dongen
Drs. W.J.R. van der Leij
Dr. C.J. Piek
Drs. M. Prins
Prof. dr. E. Teske
Ing. J.P.H.M. Vossen

Departement Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren
Dr. B.M. Gadella
Prof. dr. T.J.G.M. Lam
Ing. A. Rijneveld
Dr. B.A.J. Roelen

Departement Gezondheidszorg Paard
Ing. M.M. Beitsma

Departement Infectieziekten & Immunologie
Dr. H.F. Egberink
Drs. M.A.M. van Dijk
Drs. M.B.H.M. Duijvestijn
Dr. E.R. Nijsse
Dr. H.W. Ploeger
Drs. R.E. Veneberg

Gezondheidsdienst voor Dieren:
Dr. Ir. A.E. Heuvelink

Voorwoord bij de uitgave van 2015

Laboratoriumdiagnostiek is binnen de veterinaire diagnostiek één van de pijlers van het aanvullend onderzoek om te kunnen komen tot een diagnose of verfijning van de differentiaal diagnose. Vaak kan een dierenarts met niet al te grote investeringen zelf heel wat van deze onderzoeken uitvoeren. Diagnostiek kan hierdoor snel plaatsvinden en kosten voor de eigenaar en de veehouder worden beperkt. In dit handboek worden verschillende technieken besproken en uitgelegd, en wordt nadere achtergrondinformatie gegeven.

Dit boekje, "Laboratoriumdiagnostiek, een praktische handleiding", is een vervolg op eerdere uitgaven over dit onderwerp. Wat in 1978 begon als een fraai uitgevoerde syllabus in een ringband met daarin de door Dr. M.J.H. Geelen geschreven "Handleiding voor het praktikum laboratorium diagnostiek", werd in 1987 gevolgd door een gedrukt boekwerk met dezelfde titel. In dat boekje werd het urine-, bloed- en pensvloeistofonderzoek beschreven zoals dat uitgevoerd werd in de practica voor studenten diergeneeskunde die verzorgd werden door het Laboratorium voor Veterinaire Biochemie. In 2000 werd onder redactie van Dr. M.J.H. Geelen een nieuwe, uitgebreidere uitgave gemaakt: "Handleiding voor de practische laboratorium diagnostiek" waarin ook hematologisch onderzoek, fecesverteringsonderzoek, parasitologisch fecesonderzoek en spermaonderzoek opgenomen werden. Bijdragen aan die uitgave werden geleverd door medewerkers van de (hoofd)afdelingen Biochemie, Geneeskunde van Gezelschapsdieren, Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren en Parasitologie van de Faculteit Diergeneeskunde.

Deze 2015 uitgave, "Laboratoriumdiagnostiek, een praktische handleiding", is wat onderwerpen betreft weer verder uitgebreid. Er zijn nu ook hoofdstukken opgenomen over interpretatie van uitslagen, over huidonderzoek en over melkonderzoek. Van de bestaande teksten uit de uitgave van 2000 is ruim en dankbaar gebruik gemaakt, maar alle hoofdstukken zijn opnieuw tegen het licht gehouden, waar nodig aangepast en de nadruk ligt duidelijk op de tegenwoordig gebruikte laboratoriumtechnieken. Ook deze versie zal ongetwijfeld niet het eeuwige leven hebben en de redactie hoort dan ook graag suggesties voor de volgende, herziene druk.

Voorwoord bij deze uitgave van 2017

Nu, twee jaar later, volgt de herziene uitgave van het boekje "Laboratoriumdiagnostiek, een praktische handleiding". De grootste verandering in deze uitgave is de toevoeging van het hoofdstuk over de diagnostiek aan melk. Daarnaast zijn er de nodige tekstuele verbeteringen doorgevoerd en hebben kleine aanvullingen plaatsgevonden om beter aan te sluiten bij de huidige mogelijkheden binnen de diagnostiek.

Lodewijk Tielens
Departement Biochemie en Celbiologie

Inhoudsopgave

INTERPRETATIE VAN UITSLAGEN

Kwaliteitscontrole, sensitiviteit/specificiteit en voorspellende waarde

Inleiding

Laboratoriumdiagnostiek is, naast de beeldvormende diagnostiek en de pathologische diagnostiek, een onderdeel van de aanvullende diagnostiek. Het geeft een aanvulling op informatie gekregen vanuit het signalement, de anamnese en het lichamelijk onderzoek van de patiënt. Bij de laboratoriumdiagnostiek gaat het om het fysisch, chemisch en microbiologisch onderzoek aan lichaamsvloeistoffen zoals urine, bloed, feces, pensvloeistof, melk, biopten en punctaten. Onderzoek kan gedaan worden naar het aanwezig zijn van pathologische bestanddelen, microbiële agentia, immuunresponsen of van afysiologische concentraties van normaal voorkomende stoffen en enzymen.

In de praktijk zijn er veel mogelijkheden om het laboratoriumonderzoek zelf met eigen apparatuur uit te voeren. Hierdoor is de uitslag vaak dezelfde dag al bekend en is het niet nodig om monsters te versturen. In dit boek worden de meest voorkomende onderzoeken in de praktijk beschreven. Hierbij wordt aandacht besteed aan verschillende manieren van monstername (en conservering daarvan) en aan de principes van veel gebruikte analysemethoden (chemisch, enzymatisch, immunologisch, microbiologisch, morfologisch/pathologisch).

Kwalitatief versus kwantitatief

Uitslagen kunnen kwalitatief en kwantitatief zijn. Kwalitatief geeft aan of een bepaalde parameter of micro-organisme wel of niet aanwezig is. Kwantitatief onderzoek geeft getalsmatig een bepaalde hoeveelheid aan van de onderzochte stof. Voor kwalitatief onderzoek is vaak een eenvoudige kleuring voldoende, kan een sediment van een urine worden gecontroleerd, kan onderzoek gedaan worden naar wormeieren in de feces of kan een schimmel- of bacteriekweek worden ingezet. Zeker als het gaat om het aantonen van pathologische bestanddelen of aanwezigheid van pathogenen die normaal niet in een dier voor mogen komen is kwalitatief onderzoek zeer geschikt. Bij sommige infectieziekten is dit echter niet altijd eenduidig, en is kwantitatief onderzoek noodzakelijk. Voor kwantitatief onderzoek zijn vaak wat meer uitgebreider apparatuur en andere methodes en technieken nodig.

Voor het interpreteren en vertalen van uitslagen is zowel de manier van uitvoering van het onderzoek van belang, als de overige informatie van de patiënt. Laboratoriumdiagnostiek is dus geen doel op zich maar een hulpdiscipline die voor de clinicus van grote waarde is bij het stellen van een diagnose. Op andere toepassingen zoals het vaststellen van de ernst van een aandoening, de prognose en de reactie op een ingestelde therapie ligt in dit boek minder nadruk.

Kwaliteitscontrole

Na het verkrijgen van een uitslag moet de uitslag worden vertaald naar een conclusie omtrent de gezondheidsstatus van de patiënt. Belangrijk is dan om te weten of de uitkomst op een juiste manier is verkregen. Daarnaast is het de vraag in hoeverre de uitkomst iets zegt of het dier al dan niet ziek is, en of de aanwezigheid van een infectieus agens direct is te relateren aan de oorzaak van de klinische klachten. Hierin zal altijd een mate van onzekerheid geaccepteerd moeten worden.

Bepaalde uitslagen kunnen variëren door zowel incidentele fouten als systematische fouten. Incidentele fouten komen bijv. door gebruik van te veel of te weinig monster, verkeerd noteren van de uitslag etc. Systemische fouten worden veroorzaakt door o.a. een verkeerde ijking van de apparatuur, gebruik van een batch reagens welke niet goed werkzaam is, het uitvoeren van bepalingen bij een verkeerde temperatuur.

Systematische fouten kunnen worden opgespoord door kwaliteitscontroles. Het is belangrijk om deze voor de eigen apparatuur regelmatig uit te voeren. Een interne controle wordt gedaan door een monster te nemen met een bekende concentratie en deze met eigen analyseapparatuur te bepalen om te controleren of de waarde overeenkomt met de werkelijke waarde in het monster. Een externe controle houdt in dat een monster naar een extern referentielaboratorium wordt gestuurd, waarna de uitslag wordt vergeleken met de uitslag door het eigen apparaat.

Variatie

Bij het uitvoeren van laboratoriumonderzoek is er altijd sprake van een analytische variatie. Dit wil zeggen dat wanneer in een bepaald plasmamonster herhaaldelijk een bepaalde parameter wordt bepaald, deze nooit altijd exact hetzelfde zal zijn. De mate van analytische variatie wordt uitgedrukt in precisie en geeft de kwaliteit van de testmethode aan. De precisie wordt aangeduid met de variatiecoëfficiënt (hoeveel procent de standaarddeviatie afwijkt van het gemiddelde). Tegenwoordig wordt steeds meer gebruik gemaakt van geavanceerde apparatuur en is deze variatiecoëfficiënt vaak klein.

Ook is er altijd spreiding binnen een populatie dieren omdat een bepaalde waarde over de dag in een dier kan variëren (de intra-individuele variatie) en is er een variatie aanwezig tussen individuen onderling (inter-individuele variatie). Door van een grote groep gezonde individuele dieren onder dezelfde omstandigheden een bepaling te verkrijgen, kunnen referentiewaarden worden vastgesteld. De variatie die optreedt in dit referentie-gebied komt voort uit de analytische, de intra-individuele en inter-individuele variatie.

Referentiewaarden

Door de inter-individuele variatie zijn biochemische parameters altijd verdeeld over de populatie. Voor biochemische parameters worden referentiewaarden vastgesteld door van de uitkomsten uit een gezonde populatie de middelste 95% te nemen. Wanneer een bepaalde parameter volgens een normale verdeling in de populatie voorkomt kan als referentie het gemiddelde + en - tweemaal de standaarddeviatie genomen worden. De meeste parameters zijn echter niet normaal verdeeld over de populatie en daarom wordt vaak gebruik gemaakt van percentielen. Dit betekent dat van alle bepalingen de laagste 2,5% en de hoogste 2,5% niet mee worden genomen om het referentiegebied vast te stellen. Dit betekent dus altijd dat 5% van alle gezonde dieren voor een bepaalde parameter een waarde heeft die buiten het referentiegebied ligt (zie fig. 1). Daarom is het ook beter te spreken over referentiewaarden, dan over normaalwaarden.

Omdat de biologische variatie per parameter nogal kan verschillen is er vaak een verschil in

het bereik van referentiegebieden per bepaling. Glucose heeft voor de meeste diersoorten bijvoorbeeld een smal referentiegebied, terwijl de referentiewaarde voor bijvoorbeeld creatinine sterk uiteen loopt.

Door de verschillende variaties zullen niet alle dieren die positief uit de test komen ook daadwerkelijk ziek zijn, We noemen een positieve test bij een gezond dier fout-positief. Het is dan ook belangrijk om na te gaan wat de kans is dat een positieve uitslag ook betekent dat het dier daadwerkelijk ziek is (de positief voorspellende waarde). Hetzelfde geldt voor een negatieve uitslag en de kans dat het dier ook daadwerkelijk gezond is (de negatief voorspellende waarde) en er geen sprake is van een fout-negatieve uitslag.

Door middel van referentiewaarden die voor een test zijn vastgesteld, de sensitiviteit en specificiteit van een test en de a priori kans dat het dier daadwerkelijk ziek is ten opzichte van de rest van de populatie, kunnen de positieve en negatieve voorspellende waarden van een individuele testuitslag worden vastgesteld.

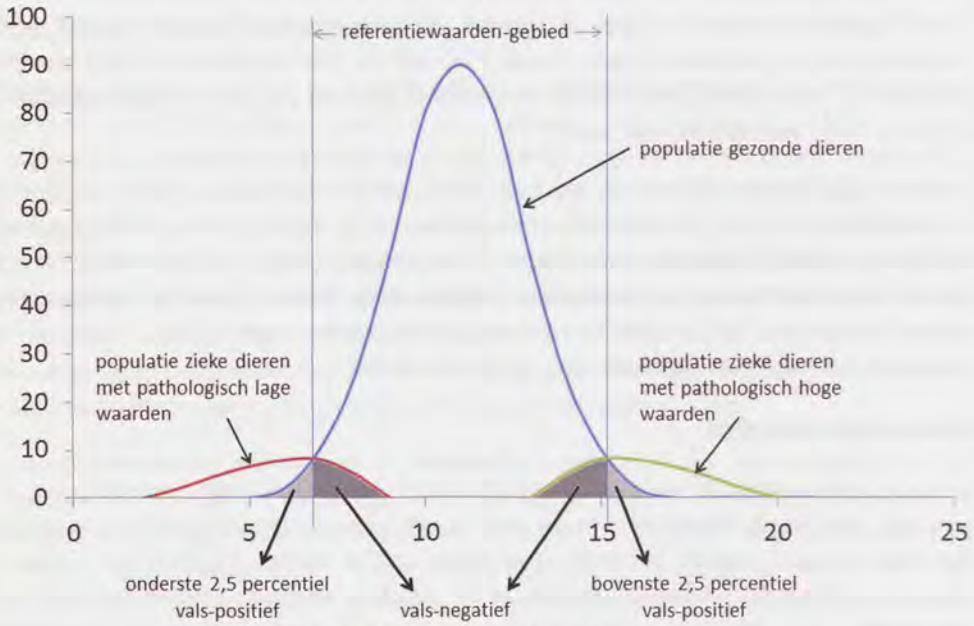


***Fig 1** Vaststellen van referentiewaarden*

In het kader van **infectieziekten** wordt diagnostiek niet alleen uitgevoerd om vast te stellen of een bepaald agens verantwoordelijk is voor ziekte maar soms ook bij gezonde dieren om na te gaan of het individu al dan niet is geïnfecteerd. Met positief en negatief voorspellende waarde wordt dan de kans bedoeld dat een positieve dan wel negatieve uitslag ook daadwerkelijk betekent dat het dier *geïnfecteerd* is. Omdat niet elke infectie leidt tot ziekte kan in de hieropvolgende tekst daar waar "ziekte" of "zieke dieren" staat ook gelezen worden "infectie" of "geïnfecteerde dieren""

Sensitiviteit en specificiteit

De sensitiviteit en specificiteit zijn parameters die iets zeggen over de waarde die toegekend wordt aan een test.

De **sensitiviteit,** oftewel de gevoeligheid van een test, geeft het percentage aan van zieke dieren die door de test ook als positief worden aangemerkt. Een hoge sensitiviteit zal bij een ziek dier bijna altijd een positieve test uitslag geven. Deze parameter zegt dus iets over het percentage fout-negatieven.

De **specificiteit** zegt iets over de populatie gezonde dieren en hoeveel procent hiervan door de test ook als negatief wordt aangewezen. Deze parameter zegt dus iets over het percentage fout-positieven.

Om de sensitiviteit en specificiteit van een test te bepalen moeten we weten of een dier daadwerkelijk ziek is, om daarna onze eigen testmethode toe te passen. Of een dier werkelijk ziek is, wordt vastgesteld met een test die als zogenaamde *gouden standaard* dient bij een bepaalde aandoening. Vaak zijn dit invasieve of dure onderzoeken zoals bijvoorbeeld een CT, MRI scan, virus isolatie vanuit een biopt e.d. De sensitiviteit en specificiteit worden dus altijd bepaald aan de hand van de gekozen *gouden standaard.*

Wanneer een bepaalde parameter (testresultaat) wordt geassocieerd met de aanwezigheid of de afwezigheid van een ziekte (of infectie) dan is een uitslag positief óf negatief. Wanneer we de uitslag daarna vergelijken met de uitkomsten van een gouden standaard dan kunnen we positieve uitslagen onderverdelen in werkelijk-positief en fout-positief. Ook van de negatieve uitslagen kunnen we een onderverdeling maken in werkelijk-negatief en vals-negatief. We kunnen dit overzichtelijk weergeven in een 2x2 tabel.

		Werkelijke ziekte toestand (Gouden Standaard)		
		ziek	**gezond**	
Diagnostische testresultaten	+	Werkelijk positief (a)	Fout-positief (b)	**Totaal positief geteste dieren (a+b)**
	-	Fout-negatief (c)	Werkelijk negatief (d)	**Totaal negatief geteste dieren (c+d)**
		Totaal werkelijk zieke dieren (a+c)	**Totaal werkelijk gezonde dieren (b+d)**	

Tabel 1 *2x2 tabel voor diagnostische testen*

De sensitiviteit kunnen we vervolgens bepalen door het aantal dieren dat als werkelijk positief uit de test komt (a) te delen door het aantal werkelijk zieke dieren (a+c). De specificiteit is dan het aantal werkelijk negatieve dieren (d) gedeeld door de populatie werkelijk gezonde dieren (b+d).

Dus: Sensitiviteit = a/(a+c)
Specificiteit = d/(b+d)

De sensitiviteit en specificiteit zijn onafhankelijke parameters aangezien ze beiden iets zeggen over een verschillende populatie. Toch kunnen ze in sommige gevallen wel een verband met elkaar hebben. Als het gaat om biochemische parameters en een kwantitatieve test, en we vergelijken de uitslag met de referentie waarden dan is de specificiteit 95% (in de populatie gezonde dieren zal 95% binnen de referentiewaarden vallen en als gezond bestempeld worden). De sensitiviteit is echter afhankelijk van in hoeverre een parameter voor een bepaalde aandoening het referentiewaarden-gebied overlapt (zie fig. 1). Om de sensitiviteit te verhogen kunnen we makkelijk de grenswaarde voor het referentiewaarden-gebied opschuiven, waardoor deze smaller wordt. Maar hierdoor zullen meer gezonde dieren vallen in het gebied van de populatie met pathologische waarden, waardoor de specificiteit omlaag gaat.

Voorspellende waarde

Als dierenarts wil je weten hoe groot de kans is dat een dier daadwerkelijk de ziekte heeft waarvoor je test, wanneer de uitslag van de test positief is. Voor een individuele uitslag kunnen de sensitiviteit en specificiteit niet aangeven wat de kans is dat een positieve uitslag ook betekent dat het dier daadwerkelijk ziek is. Hiervoor moeten we weten hoe vaak de ziekte in de populatie voorkomt (de prevalentie). Aan de hand hiervan kan de positief voorspellende waarde voor een individuele positieve uitslag worden bepaald. Als we kijken naar tabel 1 kunnen we de positief voorspellende waarde bepalen door de werkelijk positieve dieren te delen door het totaal aantal positief geteste dieren. Op dezelfde manier kunnen we de negatief voorspellende waarde berekenen; de kans dat een dier ook werkelijk gezond is wanneer de testuitslag negatief is.

Positief voorspellende waarde (PVW): a/(a+b)
Negatief voorspellende waarde (NVW): d/(c+d)

Uit volgende voorbeeld wordt duidelijk dat de positief voorspellende waarde lager wordt wanneer een bepaalde aandoening maar sporadisch in een populatie voorkomt.

Bijvoorbeeld: In een populatie van 1000 dieren komt een bepaalde aandoening bij 1% van die dieren voor. Gebruiken we een test met een sensitiviteit van 0,99 en een specificiteit van 0,95 dan kunnen we de volgende 2 x 2 tabel maken.

		Werkelijke ziekte toestand (Gouden Standaard)		
		ziek	gezond	
Diagnostisch testresultaat	+	10	49,5	59,5
	–	0	940,5	940,5
		10	990	990

Voor het berekenen van de PVW moeten we de aantal werkelijk positief geteste dieren delen door de hoeveelheid zieke dieren.

De PVW voor deze test is 10 / 59,5 = 0,17 = 17%

Wanneer deze aandoening bijna altijd gepaard gaat met braken kunnen we de populatie veel kleiner maken door alleen dieren te testen die braken. Stel dat 10% van de dieren in de populatie braakklachten heeft. Dan houden we 100 dieren over waarvan er 10 dieren de aandoening hebben. De a priori kans is dan 10%. We kunnen dan de volgende 2x2 tabel maken.

		Werkelijke ziekte toestand (Gouden Standaard)		
		ziek	gezond	
Diagnostisch testresultaat	+	10	4,5	14,5
	–	0	85,5	85,5
		10	90	100

De PVW is hier dan 10 / 14,5 = 0,69 = 69%

Wanneer we nog meer symptomen zouden uitvragen, of een bijvoorbeeld een specifieke onderverdeling zouden maken in de frequentie van braken en het type braken, wordt de betrouwbaarheid van de uitslag nog groter.

Vaak is een ware prevalentie in een populatie niet bekend. Uit het voorbeeld hierboven weten we dat de kans groter is dat een dier aan een aandoening leidt wanneer er sprake is van bepaalde symptomen. Het is daarom erg belangrijk om de anamnese en lichamelijk onderzoek grondig uit te voeren. Hoe meer specifieke symptomen en afwijkingen er worden gevonden bij het klinisch onderzoek, hoe groter de a priori kans op de aan- of afwezigheid van de aandoening, waarvoor de test wordt uitgevoerd. Een goed uitgevoerd klinisch onderzoek heeft een enorm effect op de interpretatie van de uitslag van het aanvullend onderzoek.

Binnen de serologie wordt echter niet zozeer onderzocht of een dier ziek is, maar wordt vaak, m.b.v. antilichamen, onderzoek gedaan naar of een dier is geïnfecteerd of niet. Hierbij hoeven niet altijd ziekteverschijnselen aanwezig te zijn. Het dier kan namelijk wel zijn geïnfecteerd maar nog geen ziekteverschijnselen vertonen (hier is het begrip incubatietijd van belang), een dier kan subklinisch geïnfecteerd zijn (dit houdt in dat het dier wel geïnfecteerd is maar dat op infectie geen klinische verschijnselen zullen volgen), of een dier kan hersteld zijn van klinische verschijnselen (er zijn nog antilichamen aanwezig als gevolg van een voorgaande infectie, waarbij de klinische verschijnselen al weer zijn verdwenen, het dier is dus niet (meer) ziek). Het is dus van belang om te realiseren dat de aanwezigheid van antilichamen niet/niet altijd correleert met de aanwezigheid van (klinische) ziekteverschijnselen. De a priori kans op een infectie (de prevalentie) binnen de serologie is dan ook niet altijd afhankelijk van de klinische verschijnselen van het individu. Serologische diagnostiek wordt niet altijd uitgevoerd om bij een individueel dier een diagnose te bevestigen, maar kan bijvoorbeeld ook worden toegepast om te onderzoeken of een infectie aanwezig is in een populatie.

URINEONDERZOEK

Macroscopisch onderzoek, klinisch chemische analyse en sediment onderzoek

URINEONDERZOEK

Macroscopisch onderzoek, klinisch chemische analyse en sedimentonderzoek

Inleiding

Gedurende het hele leven is de vorming en uitscheiding van urine een van de lichaamsfuncties die zo constant is dat het vanzelfsprekend gevonden wordt. Onder normale omstandigheden wordt urine doorlopend geproduceerd door de nieren. Het is een van de voornaamste wegen voor uitscheiding van afvalprodukten en voor de homeostase van lichaamswater en elektrolyten.

Urine is per definitie een schoon en gewoonlijk steriel produkt. De stank van niet-verse urine komt door bacteriële afbraak van stoffen in de urine. Veel biologisch materiaal, inclusief urine, gaat stinken bij ontbinding na contaminatie van buiten.

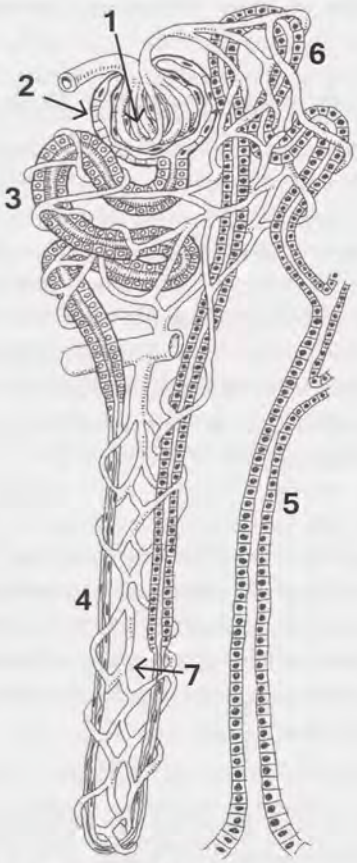
In tegenstelling tot plasma verandert de samenstelling van urine voortdurend. Daarom zijn er voor een aantal parameters geen duidelijke referentiewaarden. Onderzoek naar stoffen in de urine is dan ook semi kwantitatief, of de klaring moet worden bepaald.

Door rekening te houden met de omstandigheden waarin het urinemonster werd verkregen kunnen uitslagen wel passend geïnterpreteerd worden. Zo kan bijvoorbeeld een weinig geconcentreerd urinemonster (laag soortelijk gewicht) best voorkomen bij een gezond dier maar is niet passend bij een patiënt die een zeer matige vochtbalans heeft (uitgedroogd is).

Kort overzicht anatomie en fysiologie van de nieren

Een zoogdier heeft de beschikking over twee nieren die elk zijn opgebouwd uit microscopische structurele en functionele eenheden: de nefronen. Het nefron bestaat weer uit drie onderdelen: de glomerulus, de tubulus en de verzamelbuis. De tubulus en de verzamelbuis liggen voor het grootste gedeelte in de medulla (het merg) van de nier en zijn omringd door haarvaten. Het interstitium van de medulla waar de tubulus in ligt, heeft een osmotische gradiënt. Op deze manier kan er naast actief transport ook passieve uitwisseling plaatsvinden tussen urinewegen en de circulatie. Uiteindelijk zal de samenstelling van de urine dan ook aanzienlijk verschillen van die van het plasma. Per diersoort kan de lengte van de tubulus verschillen. Hoe langer de tubulus in de medulla, hoe sterker het concentrerend vermogen. Met name bij zee- en woestijndieren is een groter concentrerend vermogen van belang.

Om afvalstoffen uit het plasma te verwijderen zijn in de nieren drie processen van belang. Hierbij gaat het om glomerulaire filtratie, tubulaire reabsorptie en tubulaire secretie. Sommige stoffen worden enkel uitgescheiden door middel van glomerulaire filtratie (bijv. creatinine), andere stoffen door zowel filtratie als tubulaire reabsorptie (bijv. glucose), weer andere stoffen komen in de urine terecht nadat er zowel filtratie als reabsorptie en secretie heeft plaatsgevonden (bijv. ureum). De mate waarin een stof vanuit het plasma in de urine terecht komt, noemen we klaring. Alleen wanneer een stof enkel door glomulaire filtratie wordt uitgescheiden en er in de tubuli geen reabsorptie en secretie plaatsvindt, is de klaring gelijk aan de glomerulaire filtratie rate (GFR)/de bloedconcentratie van de stof. Met de GFR wordt de hoeveelheid gefilterd bloed in ml per minuut aangeduid. De GFR wordt beïnvloed door de hoogte van de effectieve filtratiedruk en de hoeveelheid en de kwaliteit van het filtrerend oppervlak.



1 glomerulus

2 kapsel van Bowman

3 proximale tubulus

4 lus van Henle

5 verzamelbuis

6 distale tubulus

7 bloedvaten

Fig 1. Nefron

Glomerulaire filtratie op basis van grootte en lading

Glomerulaire filtratie is een passief proces waarbij de glomurulaire filtratiedruk de drijvende kracht is. De glomerulaire membraan laat vervolgens selectief bepaalde stoffen door op basis van grootte en lading. De glomerulaire vaatkluwen bestaat uit een arterieel vaatbed waarvan de architectuur in stand wordt gehouden door wat het mesangium wordt genoemd. De glomerulaire filtratiedruk wordt - grotendeels onafhankelijk van de systemische bloeddruk - gereguleerd door middel van variatie in lumen van aanvoerende en afvoerende vaten en ontspanning/contractie van het mesangium. De glomerulaire membraan bestaat uit verschillende lagen (endotheel, basaalmembraan en podocyten) die gezamenlijk de selectiviteit voor grootte en lading van de membraan bepalen. Het samenspel van filtratiedruk, de selectiviteit van de membraan maar ook de hoeveelheid oppervlak bepalen de glomerulaire filtratiecapaciteit. Grote (eiwit)moleculen (> 70kD), maar ook moleculen gebonden aan deze eiwitten en lipoproteïnes kunnen de glomerulaire membraan niet passeren. Albumine heeft een grootte van ong. 67kD, maar blijft voor het grootste gedeelte achter in het plasma vanwege zijn negatieve lading, welke door de negatief geladen glomerulaire vaatwand wordt tegengehouden. Met name zal dus water samen

met kleine moleculen als glucose, aminozuren, elektrolyten, creatinine, ureum en bicarbonaat de glomerulaire membraan passeren.

Rondom de glomerulus is het kapsel van Bowman gelegen dat het glomerulaire filtraat (de primaire urine) naar het tubulaire stelsel leidt.

Tubulaire reabsorbtie en secretie

De primaire urine komt vervolgens in de tubulus, die te vergelijken is met de steel van de trechter en bestaat uit 3 delen. (1) De proximale tubulus komt als eerste direct na het kapsel van Bowman en heeft vele windingen. Daarna volgt de lange en rechte (2) lus van Henle waarvan het descenderende deel loopt van de cortex (de schors) van de nier, waar de glomeruli liggen, tot in de medulla (het merg) van de nier. Daar maakt de lus van Henle een scherpe bocht en gaat als ascenderend deel weer terug om dicht bij de glomerulus uit te komen. Hier eindigt de tubulus in (3) de distale tubulus als een tweede serie windingen.

Proximale tubulus

In de proximale tubulus worden belangrijke stoffen als Na+, K+, bicarbonaat, glucose en aminozuren actief terug geresorbeerd. Passief zal dan, door de osmotische verandering, ook water volgen. Hierdoor blijft het soortelijk gewicht ongeveer gelijk, maar neemt het totale volume met ongeveer 70% af. Veel van deze bloedcomponenten hebben een nierdrempel, d.w.z. bij een verhoogde bloedspiegel kunnen ze niet volledig worden terug geresorbeerd in de proximale tubulus en worden ze via de urine uitgescheiden.

Lus van Henle

De descenderende lus van Henle is goed doorlaatbaar voor water, maar niet voor de opgeloste stoffen in de primaire urine. De osmotische en oncotische drukverschillen tussen dit deel van de lus van Henle, het interstitium en de haarvaten zorgen ervoor dat water zich vanuit de tubulus verplaatst naar het hypertone interstitium en van daar naar de haarvaten.
De ascenderende lus van Henle is juist niet doorlaatbaar voor water, maar hier vindt wel actieve terugresorptie plaats van elektrolieten zoals natrium, kalium en chloride.
In de distale tubulus vindt onder invloed van aldosteron excretie van kalium plaats en terugresorptie van natrium en chloride, waarbij water passief het natrium volgt.

De verzamelbuis

Na het doorlopen van de tubulus zijn belangrijke stoffen terug geresorbeerd naar het bloed en is vooral het volume van de primaire urine afgenomen. Het echte concentreren vindt plaats in het laatste gedeelte van het nefron, de verzamelbuis. In de verzamelbuis vindt terugresorptie plaats van water, maar alleen onder invloed van het hormoon ADH. Deze terugresorptie is ook gedeeltelijk afhankelijk van een hypertoon interstitium van de medulla. In de verzamelbuis wordt ook ureum actief uitgescheiden naar het interstitium. Dit is eveneens van belang voor het in stand houden van het hypertone merg.

Eiwituitscheiding

De kleine hoeveelheid albumine en andere laag moleculaire eiwitten welke door de glomerulaire

filtratie in de primaire urine terechtkomen, worden door de proximale tubulus weer terug geresorbeerd. In sommige gevallen is de capaciteit van de proximale tubulus overstegen. Urine van gezonde dieren bevat gewoonlijk slechts spoortjes eiwit. Dit zijn laag moleculaire eiwitten of eiwitten die afkomstig zijn uit de cellen van het tubulus-epitheel of de lagere urinewegen. De gebruikelijke klinisch chemische bepalingen tonen deze spoortjes eiwit niet aan. Vaak bevat de urine ook een niet detecteerbare hoeveelheid albumine. Bij honden kan onder niet-pathologische condities de eiwituitscheiding via de urine tot max. 0,6 g/l oplopen. Met de gebruikelijke testen wordt dan een spoor eiwit gevonden.

Wanneer er sprake is van aantoonbaar eiwit in de urine spreken we van proteïnurie. Afhankelijk van waar het eiwit vandaan komt kunnen we proteïnurie onderverdelen in prerenaal, renaal en postrenaal. Bij prerenale proteïnurie is er sprake van een sterke verhoging van plasma-eiwitten. Bijvoorbeeld myoglobine bij hevige spierbeschadiging, hemoglobine bij ernstige intravasale hemolyse, of immunoglobulines bij bepaalde neoplasieën of ontstekingsprocessen. Bij renale protëinurie is er sprake van een aandoening aan de nieren zelf. Dit kan het gevolg zijn van schade aan de glomerulus waardoor de permeabiliteit voor eiwit is toegenomen. Het kan ook het gevolg zijn van een tubulair probleem waardoor de normaal gesproken kleine hoeveelheid in de primaire urine niet meer geresorbeerd kan worden. Ook een combinatie van een glomerulair en tubulair probleem is mogelijk wanneer er sprake is van renale proteïnurie. Postrenale proteïnurie kan ontstaan door toevoeging van ontstekingseiwitten of bloed uit de urinewegen als gevolg van bijvoorbeeld een ontstekingsproces. Als er sprake is van proteïnurie is het in eerste instantie vaak niet mogelijk om na te gaan waar het vandaan komt. Proteïnurie is dan ook een algemeen symptoom voor afwijkingen aan nieren en/of de urinewegen en geeft geen aanwijzingen wat betreft de herkomst van het eiwit. Bij een positieve eiwitreactie van de urine is het vaak gewenst verder onderzoek te doen of te laten doen naar de aard van het eiwit.

Proteïnurie is niet altijd pathologisch. Een eenmalige proteïnurie of een proteïnurie die na een aantal dagen verdwijnt kan optreden bij oestrus, partus, gedurende de eerste levensdagen, na zware spierarbeid of bij heftige emoties (bijv. transport). Wel pathologisch is een doorlopende eiwituitscheiding, waarvan de hoeveelheid echter geen graadmeter is voor de ernst van de afwijking. Zo is er bijv. bij chronische nephritis slechts sprake van sporen eiwit in de urine.

Historie urineonderzoek

Het gebruik van urineonderzoek voor diagnostiek is al zo oud als de mensheid. De Egyptenaren onderkenden al dat veranderingen in de urine verband hielden met ziekte. Sommige van deze waarnemingen zijn terug te vinden in hiëroglyfen op muren van grotten en graven. Daarna schreven de Babyloniërs, de Sumeriërs en de Hindoes over het belang van urine bij het onderkennen van ziekten. De z.g. "honing urine" trok mieren aan en was zeer waarschijnlijk afkomstig van diabetici. Hippocrates wees 400 jaar voor onze jaartelling bij herhaling op het belang van urineonderzoek voor het herkennen van ziekten. Hij gaf een goede omschrijving met zijn hypothese dat urine het filtraat was van de lichaamsvloeistoffen welke door de nieren werden gefilterd. Klinisch chemisch en microscopisch onderzoek van urine kwam pas ruim 2300 jaar

later tot ontwikkeling. In de middeleeuwen werd het urineonderzoek steeds populairder. In deze periode zijn verscheidene boeken verschenen welke verschillende ziektebeelden met bijbehorende afwijkingen van de urine beschreven. In de 15e en 16e eeuw werd diagnostiek steeds vaker alleen gedaan aan de hand van de urine en werd de patiënt verder niet meer onderzocht. Door de vertaling uit het Latijn van deze oude werken en de uitvinding van de boekdrukkunst konden patiënten steeds meer zelf een diagnose stellen op basis van hun eigen urine. Dit werd versterkt doordat artsen steeds vaker agressieve therapieën als aderlating gingen gebruiken. Doordat urineonderzoek hierdoor steeds meer door leken werd gedaan, was het rond de 17e eeuw omgeven met veel mystiek en pure kwakzalverij. Dit werd ook wel uromantie genoemd.

Vandaag de dag is het urineonderzoek erg belangrijk binnen de diagnostiek. Daarnaast is het goedkoop en is onderzoek van de urine nog steeds een belangrijk onderdeel van het gehele onderzoek van de patiënt. De fysische eigenschappen als geur, kleur en helderheid en het soortelijk gewicht zijn heldere parameters voor verder onderzoek. Maar ook de klinisch chemische analyse en het microscopisch onderzoek aan het sediment geven waardevolle informatie.

Het verzamelen en bewaren van urine

Urine-analyse levert alleen bruikbare resultaten als bij het verzamelen en het bewaren van het urinemonster mogelijke foutenbronnen uitgesloten worden. Het gezegde dat een analyse niet beter is dan het monster, is zeer zeker waar voor urineonderzoek. Voordat urine verzameld wordt, is het dan ook van belang om na te gaan hoe en waarin de urine opgevangen en bewaard gaat worden.

Bewaren

Het is erg belangrijk dat urine wordt opgevangen in schone containers. Er moet op gelet worden dat de container goed afgespoeld is met water. Overblijfselen van schoonmaakmiddelen kunnen in met name de klinisch chemische bepalingen foute uitkomsten geven. Voor bacteriologisch onderzoek moet urine uiteraard in een steriele container worden verzameld. Voor het uitvoeren van de meeste, moderne urinetesten is in z'n totaliteit niet meer nodig dan 10 ml urine, goed gemengd en niet gecentrifugeerd.

Als de analyse niet binnen 3 uur uitgevoerd wordt, moeten urinemonsters gekoeld (4-8°C) bewaard worden. Zulke monsters moeten binnen 12 uur onderzocht worden. Als urine langer bewaard moet worden, bijv. voor het verzamelen van 24-uurs urine, kan een conserveringsmiddel worden toegevoegd. Raadpleeg het laboratorium voor een geschikt middel. In aanwezigheid van een conserveermiddel is het klinisch chemisch onderzoek vaak niet meer betrouwbaar. De urine blijft wel geschikt voor het microscopisch onderzoek van het sediment. Moeten monsters langer dan 24-48 uur bewaard worden dan is het aan te bevelen ze meteen in te vriezen. Het sediment met cellen en kristallen kan dan echter niet meer beoordeeld worden, omdat het een amorf geheel geworden is. Voor het invriezen moet de urine worden gecentrifugeerd bij 4500 rpm (wat overeenkomt met 2000 RCF bij een centrifuge met een straal van 75 mm) gedurende 5 minuten.

Verzamelen

Er zijn verschillende methodes voor het opvangen van urine, waarbij elke methode zijn voor- en nadelen heeft.

Spontane urine

De meest makkelijke en minst invasieve methode is het opvangen van urine tijdens de spontane mictie (urinelozing). Bij de hond en kat kan de eigenaar makkelijk zelf op deze manier urine opvangen. Het is dan wel van belang om hierbij goede instructies te geven. Bij de hond kan bijvoorbeeld gebruik gemaakt worden van een lange soeplepel of een steelpan. Ook kan urine worden opgevangen door de hond bij een boom of struik te laten plassen op een opengevouwen vuilniszak. Voor het opvangen van urine van de kat kan gebruik gemaakt worden van een lege kattenbak of een kattenbak gevuld met niet-vochtabsorberend materiaal (bijv. een gesnipperde vuilniszak of speciale kattenbakkorrels die geen vocht absorberen).
De eerste urine tijdens de mictie is het meest gecontamineerd met bacteriën en vuil van het perineum en de vulva of het preputium. Daarom is het belangrijk om zoveel mogelijk de midstroom urine op te vangen. Het opvangen van alleen midstroom urine is bij de kat vaak onmogelijk.
Bij runderen en paarden is het opvangen van midstroom urine erg makkelijk door het grote volume dat ze produceren. De mictie kan bij de koe worden opgewekt door met wat papier of stro over de vulva te wrijven. Vaak gaan koeien ook spontaan urineren als ze opstaan na even te hebben gelegen. Hier kan gebruik van gemaakt worden op het moment dat van meerdere koeien uit de koppel urine afgenomen moet worden. Als een rustig moment wordt afgewacht, kunnen dieren hierna worden opgejaagd waarna een aantal dieren spontaan zal gaan plassen. Bij het paard kan urine opgevangen worden door het dier eerst een paar uur op stenen te zetten. Paarden urineren niet graag op een harde ondergrond. Wanneer het dier daarna weer op stro gezet wordt, zal het dier gaan plassen en kan de midstroom urine worden opgevangen.

Bij alle diersoorten is eigenlijk het enige nadeel van het opvangen van de spontane urine, dat het monster niet bruikbaar is voor bacteriologisch onderzoek.

Katheterisatie

Het opvangen van urine door middel van een katheter is niet altijd even eenvoudig. Bij mannelijke dieren is dit vaak makkelijker dan bij vrouwelijke dieren. Katheterisatie is niet altijd mogelijk bij het wakkere dier. Het grote voordeel van deze methode is dat het monster nauwelijks gecontamineerd is. Het distale deel van de urethra bevat echter normaal gesproken enkele bacteriën. Daarom is het ook bij katheterisatie verstandig om de eerst opgevangen urine niet mee te nemen in het te onderzoeken monster. Bij het goed uitvoeren van deze techniek is de kans op een infectie van de blaas door bacteriën van buitenaf erg klein. Het op de juiste manier uitvoeren van de katheterisatie is dus erg belangrijk.

Wanneer een dier in de kliniek wordt opgenomen en 24 uur per dag wordt verzorgd, kan voor een langere periode een katheter worden geplaatst. Alleen dan is het mogelijk om voor kwantitatieve bepalingen een 24-uurs monster te nemen. Het risico op een bacteriële infectie van de blaas wordt groter naar mate de katheter langer blijft zitten.

Bij koeien is het, na enige oefening, makkelijk om voor het opvangen van urine gebruik te maken van een starre catheter. Met name wanneer van meerdere dieren uit een koppel urine moet worden verzameld is dit in sommige gevallen sneller dan te wachten op spontane mictie. Bovendien is deze urine minder gecontamineerd met vuil en bacteriën en geschikt voor het inzetten van een bacteriologisch onderzoek (BO). Ook bij het paard is katheterisatie mogelijk en wordt vooral gedaan wanneer het nodig is om een BO in te zetten.

Cystocentese

Cystocentese is het puncteren van de blaas voor het nemen van een urinemonster. Door de steriele uitvoering is het genomen monster met name geschikt voor het doen van bacteriologisch onderzoek. Daarnaast kan het vaak makkelijk bij het wakkere dier worden uitgevoerd. Aangezien de blaas gepalpeerd moet worden, is cystocentese niet mogelijk bij paarden en runderen. Soms kan het urinemonster wat bloed bevatten doordat een bloedvat is aangeprikt. Belangrijk is wel dat de blaas enigszins is gevuld. Bij een lege blaas is het moeilijk om de blaas te palperen en bij het prikken niet de tegenoverliggende wand te raken. Hierdoor kan hematurie ontstaan. Bij een overvulde blaas is cystocentese gecontraïndiceerd, vanwege een klein risico op het ontstaan van een blaasruptuur.

Bij kleine dieren zoals het konijn en de cavia, met een dunne blaaswand, is er een groot risico op scheuren hiervan als het dier zich verzet. Anesthesie voorafgaand aan de cystosentese is bij deze dieren geïndiceerd.

Hygiëne

Bij het afnemen van urine is het belangrijk om rekening te houden met de hygiëne. Zeker als er een vermoeden is van een infectieuze aandoening, is voorzichtigheid geboden. Houd altijd rekening met de mogelijkheid dat het dier een zoönose heeft. Denk hierbij aan bijv. *Leptospirosa* spp. (ziekte van Weil) of een infectie met *E. coli*. Maar ook andere pathogenen die via de feces of de vulva worden verspreid kunnen besmetting veroorzaken wanneer er onhygiënisch gewerkt wordt. Neem bij risicopatiënten bij voorkeur urine af via katheterisatie of cystosentese en vergeet daarbij zeker niet om handschoenen te dragen.

Macroscopisch onderzoek (fysische eigenschappen)

Urine is geen "standaard vloeistof". Terwijl concentraties van bloedbestanddelen slechts veranderen binnen nauwe grenzen variëren de concentraties van urinebestanddelen normaal gesproken nogal sterk. Deze variatie komt onder andere door variatie in voedselopname. Daarom is het ook niet verbazend dat urinemonsters zo verschillen in direct waarneembare eigenschappen. Onder pathologische condities kan de variatie nog groter zijn.

Desondanks geven de fysische eigenschappen van de urine vaak al een indicatie met betrekking tot de aard van een ziekte of de aanwezigheid van pathologische bestanddelen. Door alleen te letten op een aantal algemene eigenschappen van verse urine (volume, kleur, geur, helderheid en mogelijkheid tot het vormen van schuim) kan het klinisch

chemisch onderzoek gerichter en beter worden geïnterpreteerd. Voor een goede interpretatie is ook documentatie van de bevindingen van belang. Door gebruik te maken van een standaardformulier (zie bijlage: uitslagformulier unrineonderzoek op pag. 50-51) wordt een goed totaaloverzicht gekregen van de bevindingen van het gehele urineonderzoek. Hieronder worden de belangrijkste fysische eigenschappen van urine beschreven.

Volume

De hoeveelheid gevormde urine vertoont sterke schommelingen. Het urinevolume reflecteert de vochtopname en het vochtverlies (waterbalans). De hoeveelheid geproduceerde urine varieert tegengesteld aan het vochtverlies via andere wegen. De mate van urinevorming is gewoonlijk omgekeerd gecorreleerd met het soortelijk gewicht van urine. De referentiewaarde bestrijkt, afhankelijk van vele factoren, een uitgebreid traject. Toch zijn voor elke diersoort grenzen aan te geven. Wanneer er geen urine wordt uitgescheiden spreken we van anurie. Bij oligurie wordt er minder urine dan normaal uitgescheiden. Is er sprake van meer plassen dan normaal, dan noemen we dat polyurie. Het volume is door monstername niet te bepalen. Het is dan belangrijk om in de anamnese te vragen naar toe- of afname van de hoeveelheid urine die het dier uitplast.

Gemiddelde dagelijkse urineproductie per diersoort		
	referentiewaarden	
paard	3 - 6	l/dag
rund	6 - 12	l/dag
schaap en geit	0,5 - 1	l/dag
varken	2 - 4	l/dag
hond	25 - 41	ml/kg lichaamsgewicht per dag
kat	22 - 30	ml/kg lichaamsgewicht per dag
mens	1 - 1,2	l/dag

Tabel 1 *Dagelijkse urineproductie per diersoort*

Geur

De geur van vloeistof ontstaat doordat enkele moleculen van vluchtige stoffen terecht kunnen komen op ons neusslijmvlies. De geur van vers-geloosde, niet-pathologische urine is afkomstig van vluchtige organische zuren en is karakteristiek voor de diersoort. Sexe verschillen in urinegeur binnen een diersoort komen ook voor. De twee belangrijkste afwijkingen van de urinegeur zijn een sterke ammoniakgeur en de geur van aceton.

Ammoniak ontstaat door de bacteriële afbraak van ureum. Urine waarin naast bacteriën ook eiwit (bloed, etter) voorkomt heeft als gevolg van eiwitafbraak door bacteriën een typische rottingslucht. Een ammoniakgeur in verse urine kan ontstaan bij een bacteriële blaasontsteking doordat bacteriën in de blaas ureum hebben afgebroken. Als urine een tijd buiten de koelkast wordt bewaard zal uiteindelijk ook een scherpe ammoniakgeur ontstaan. Dit komt door

bacteriële contaminatie tijdens en na de afname.

Aceton in de urine ontstaat bij overmatige afbraak van TAG uit het vetweefsel. Het overschot aan vrijgekomen vetzuren zal in de lever omgezet worden tot ketonlichamen waaronder aceton. Met name bij een negatieve energiebalans (bijv. slepende melkziekte bij het rund), of een lagere insuline secretie/gevoeligheid. Bij dit laatste wordt de afbraak van TAG niet meer geremd door insuline. Dit kan voorkomen als complicatie bij diabetes mellitus (suikerziekte). Naast een overmatige ammoniakgeur en aceton kunnen ook bepaalde geneesmiddelen een afwijkende geur van urine veroorzaken.

Kleur

De gele kleur van de urine wordt veroorzaakt door met name urobiline wat een restproduct is van de heemafbraak. Verder zijn er nog tal van andere factoren die de kleur van de urine kunnen beïnvloeden, zoals het dieet, medicatie, bewaaromstandigheden etc. De intensiteit van de kleur staat, evenals het soortelijk gewicht, in nauw verband met de concentratie van de urine. Donker geel bij geconcentreerde urine (oligurie), licht geel bij verdunde urine (polyurie). De kleur van de urine is verder specifiek voor de diersoort. Paardenurine is bijvoorbeeld donker.

Voor het bepalen van de kleur is het belangrijk dat het potje waar de urine in zit kleurloos en helder is. Daarnaast moet er gebruik worden gemaakt van een goede witte lichtbron (liefst daglicht) en een witte achtergrond.

Een afwijkende kleur kan wijzen op de aanwezigheid van bepaalde opgeloste stoffen. Een rode kleur is een sterke aanwijzing voor bijmenging van bloed en/of hemoglobine, maar ook bepaalde plantenkleurstoffen (porfyrines) kunnen een dieprode kleur geven. Dit laatste kan nog wel eens bij konijnen voorkomen. Galkleurstoffen en bilirubine kunnen zorgen voor een geelbruine tot geelgroene kleur. Een bruine kleur kan veroorzaakt worden door myoglobine/porfyrinen.

Helderheid

Verse urine is in het algemeen helder, behalve bij enkele diersoorten als paard, konijn en cavia. Aangezien de calciumhuishouding bij deze dieren via de nieren wordt gereguleerd zal een overmaat aan calcium uitgescheiden worden via de nieren. Zeker in geconcentreerde urine kan de consistentie door urinekristallen zoveel toenemen dat van 'sludge' gesproken wordt (zand- tot kleiachtig). Bij gezonde paarden bevat urine daarnaast vaak slijm van klieren in het nierbekken. De urine kan bij deze dieren variëren van stroperig tot helder water.

Voor het bepalen van de helderheid van de urine is het van belang dat de urine in helder glaswerk zit. Troebelheid kan ontstaan bij afkoeling door het neerslaan van zouten. Bij verse urine is eventuele troebeling het gevolg van bacteriën, erytrocyten, leukocyten, etc. (het "georganiseerde sediment"), of onopgeloste zouten als fosfaat, uraat, carbonaat of oxalaat (het "ongeorganiseerde sediment"). Het neerslaan van bepaalde zouten is vaak afhankelijk van de pH van de urine. Melkachtige urine ontstaat vaak door bijmenging van pus of vetten.

Bij echte vlokken in de urine kan er sprake zijn van fecale contaminatie of samenklontering van kristallen. In een urinemonster dat verzameld is tijdens de spontane mictie, kunnen bijmengingen ook afkomstig zijn vanuit de genitaaltractus of het perineum. Bij de hond en de kat is microscopisch onderzoek naar het sediment van de urine van belang wanneer er sprake is van troebele urine.

Soortelijk gewicht

Het soortelijk gewicht (S.G.) hangt samen met de geproduceerde hoeveelheid urine en dus met de concentratie van de opgeloste stoffen. Een donker gekleurde urine heeft over het algemeen dan ook een hoog S.G. Net als voor de pH van urine geldt ook hier dat het gebied van het abnormale S.G. en dat van de referentiewaarde elkaar overlappen. Daarom zegt het S.G. van urine alleen iets in samenhang met andere waarnemingen.

Het S.G. wordt uitgedrukt als de verhouding tussen het gewicht van het te onderzoeken monster en het gewicht van eenzelfde hoeveelheid gedestilleerd water. Het S.G. heeft dan ook geen eenheid. In de dierenartspraktijk wordt voor de bepaling van het S.G. gebruik gemaakt van een refractometer. Dit optische instrument bepaalt de brekingsindex, die net als het S.G. afhankelijk is van de hoeveelheid opgeloste stoffen. Deze indirecte methode houdt vooral rekening met de hoeveelheid opgeloste moleculen en niet met het gewicht van de verschillende moleculen. Omdat eiwitten normaal gesproken niet in de urine voorkomen, maar wel relatief grote moleculen zijn, hebben eiwitten in de urine vaak weinig invloed op het gemeten S.G. Daarnaast zal het aandeel aan eiwitten, in de urine van een dier met nierfalen, niet in verhouding staan tot de hoeveelheid ionen en andere stoffen.

Elke soort vloeistof heeft zijn eigen refractometer waarbij de S.G. schaal speciaal voor die vloeistof is bepaald. Zo zijn er naast refractometers voor urine bijvoorbeeld ook refractometers voor wijn om het glucosegehalte te bepalen en refractometers voor zoutwater-aquaria om het zoutgehalte te bepalen. Naast refractometers voor humane urines zijn er ook refractometers voor honden- en kattenurines. Het S.G. van honden- en humane urine ligt dicht bij elkaar. Hiervoor is een refractometer voor humane urines afdoende. Het S.G. van urine van kat kan daarentegen hoger zijn dan de schaal aan kan geven. Aangezien je juist specifiek wilt weten of er sprake is van een laag S.G. of niet, is een speciale refractometer voor urine van de kat in de praktijk niet nodig. Mocht het S.G. te hoog zijn om te bepalen, dan is het mogelijk om de urine te verdunnen. Bij een verdunning van 1:1 met gedestilleerd water, zal het S.G. achter de punt halveren.

Bij het aflezen is het wel erg belangrijk om te letten op de juiste schaal. Vaak hebben refractormeters verschillende schalen (bijvoorbeeld de refractor index (η) en een schaal voor plasma eiwitten). De schaal van het S.G. wordt vaak aangeduid met U.G. en begint uiteraard bij 1.000 en loopt tot ong. 1.050.

Een hoog S.G. geeft aan dat de nieren de urine goed kunnen concentreren. Een laag S.G. zegt echter nog niet direct iets over een mogelijk minder concentrerend vermogen van de nieren, maar kan bijvoorbeeld ook het gevolg zijn van veel vochtopname. Een sterk verhoogd

S.G. kan duiden op ernstige dehydratie.

Gewoonlijk heeft geconcentreerde urine met een hoog S.G. een donker gele kleur. Echter, urines van dieren met diabetes mellitus die veel suiker uitscheiden, kunnen toch licht gekleurd zijn ondanks een normaal tot hoog S.G. De toegevoegde suikers in de tubulus van de nefronen zorgen namelijk voor een osmotische aantrekking van water, waardoor er polyurie en urine met een lichte kleur ontstaat. Door de toegevoegde glucose is het S.G. echter niet afwijkend. Een andere manier om de hoeveelheid opgeloste stoffen te bepalen in de urine is door middel van een osmometer. Deze methode is betrouwbaarder omdat zij nauwelijks beïnvloed wordt door de eigenschappen van de verschillende deeltjes. Deze methode is echter alleen beschikbaar in gespecialiseerde laboratoria. Verder kan het S.G. van urine ook met sneldiagnostikum bepaald worden. Voor dierlijke urines zijn deze sticks echter niet betrouwbaar en kan dan ook niet gebruikt worden. De pH van de urine blijkt namelijk van invloed te zijn op het testresultaat.

Gemiddeld soortelijke gewicht van de urine per diersoort			
	gemiddeld		gemiddeld
paard	1.025 - 1.060	varken	1.010 - 1.030
rund	1.025 - 1.045	hond	1.020 - 1.045
schaap	1.015 - 1.045	kat	1.035 - 1.060

Tabel 2 *Soortelijk gewicht van de urine per diersoort*

Uitvoering: bepaling van het soortelijk gewicht van de urine

Fig 2. *Refractormeter*

Instellen van de schaal

Voordat het S.G. wordt bepaald, moet worden gecontroleerd of de refractometer goed is geijkt:

- Til het venster op en plaats een paar druppels demi water op het prismavlak. Sluit het venster voorzichtig.
- Richt het uiteinde van het instrument in de richting van een heldere lichtbron. Stel de schaal scherp door het oogstuk te draaien.
- Als de grenslijn tussen wit en blauw niet samenvalt met de 1.000/1.333-lijn dan kan deze worden bijgesteld door aan de schaalcorrectieschroef te draaien.
- Open het venster en verwijder het water met een zacht doekje. De refractometer is nu gebruiksklaar.

Meten

- Plaats enkele druppels urine op het prismavlak. Sluit het venster voorzichtig.
- Richt het uiteinde van het instrument in de richting van een heldere lichtbron.
- Lees op de schaal voor het S.G. van de urine de juiste waarde af bij de scheidingslijn van wit naar blauw. Zorg ervoor dat de juiste schaal wordt afgelezen.

N.B. Bij erg troebele monsters kan de scheidingslijn onduidelijk of zelfs afwezig zijn. In dat geval kan direct zonlicht of een zeer heldere lichtbron (bijv. microscooplampje) gebruikt worden. Eventueel kan de urine worden gecentrifugeerd.

De refractometer is een optisch instrument. Ruw hanteren of laten vallen is uit den boze. Om krassen op het relatief zachte prisma-oppervlak te voorkomen is het belangrijk om zorgvuldig te werk te gaan. Maak na gebruik venster en prisma-oppervlak schoon met een vochtig doekje (eventueel water gebruiken) en verwijder daarna het vocht met een droog doekje.

Klinisch chemische analyse

Om een compleet beeld te krijgen van afwijkingen in de urine is het belangrijk om naast het macroscopisch onderzoek de urine klinisch chemisch te onderzoeken. In de klinische chemie wordt voor het aantonen van pathologische bestanddelen in urine gebruik gemaakt van sneldiagnostica: voorbehandelde strips, die een kleurreactie vertonen bij aanwezigheid van de gezochte stof (de "dompel-en-aflees" methode). De testzones op de strips zijn tegen aanraking, verontreiniging en stukwrijven beschermd. Met sneldiagnostica is het mogelijk om semikwantitatief onderzoek te doen naar bepaalde stoffen. Dit betekent dat de mate van kleur omslag aangeeft of er meer of minder van een bepaalde stof in de urine zit, maar het bepalen van een precieze concentratie is onmogelijk. Hiermee is een snelle uitspraak mogelijk over pathologische veranderingen in de urine en geeft het een aanwijzing voor verder laboratoriumonderzoek.

Uitvoering: klinisch chemische analyse van de urine met behulp van teststrips

- Zorg ervoor dat de urine op kamertemperatuur is en dat het monster goed is gemengd.
- Dompel bij voldoende monster de strip in zijn geheel zo kort mogelijk in de urine.
- Vervolgens moet overtollige urine worden verwijderd door de strip met de rug langs het buisje of potje omhoog te halen (niet met de kant van de testzones aangezien hierdoor ook reagens verwijderd wordt).
- Klop daarna de strip af, waardoor altijd een standaard hoeveelheid urine gaat deelnemen aan de reactieprocessen.

Bij onvoldoende urine om de teststrip volledig onder te dompelen, kan met een pipet een paar druppels per testzone worden gepipetteerd.

- Lees met behulp van de bijgeleverde kleurenschaal de strip af. Op deze kleurenschaal staat ook na hoeveel seconden elke testzone afgelezen moet worden.

Voor bijna alle bepalingen geldt dat kleurveranderingen die alleen aan de randen worden waargenomen of pas na langere tijd dan aangegeven worden waargenomen, diagnostisch geen betekenis hebben.
Verder is voor al het klinisch chemisch onderzoek heldere urine nodig. Wanneer de urine bij macroscopisch onderzoek troebel is gebleken, kan die eerst worden gecentrifugeerd (ong. 5 minuten op ± 1500 rpm (± 200 RCF bij een centrifuge met een straal van 75 mm).

Verschillende fabrikanten hebben eigen sneldiagnosticastrips op de markt gebracht, waarbij het principe van de verschillende testen vaak overeenkomt. Verschillende combinaties van bepalingen zijn mogelijk. Meestal zijn ze echter ontworpen voor humaan gebruik en zijn niet alle testzones ook veterinair bruikbaar. Ook is de sensitiviteit en specificiteit per diersoort vaak

anders. In het volgende gedeelte zullen de verschillende onderdelen van het klinisch chemisch onderzoek besproken worden, waarbij ook de beperkingen van de humane urinestrips worden aangeven.

1. pH

De zuurgraad van urine is sterk afhankelijk van het dieet. Plantaardig voeding geeft alkalische urine en zien we dus bij herbivoren (referentie: 7,5-8). Carnivoren hebben juist een lagere pH van de urine door hun eiwitrijke dieet (referentie: 6-7). Als paarden gevoerd worden met haver kan de pH van de urine dalen tot onder de 7. Het gebied van de abnormale pH overlapt dan ook gedeeltelijke dat van de referentiewaarde. De pH van urine heeft op zichzelf een beperkte waarde en zegt dus alleen iets samen met andere informatie.

Het meest betrouwbare is het om de pH te meten met een pH-meter. Deze betrouwbaarheid weegt echter niet op tegen de kosten en arbeid ten opzichte van een teststrip.

Op veel van de teststrips is een testzone voor de bepaling van pH aanwezig. Deze testzone bevat dezelfde pH-indicator als standaard pH-papier. Hiermee kan op dezelfde manier de pH van de urine worden bepaald.

Een acidotische urine (lage pH) kan onder andere wijzen op musculaire eiwitafbraak, een metabole acidose (bijv. overproductie van ketonlichamen of lactaat) en hypokalemie. Een alkalische urine (hoge pH) kan onder andere veroorzaakt worden door een bacteriële infectie waardoor ammoniak wordt gevormd, een metabole alkalose of door bepaalde medicijnen. Ook bij lang bewaren van de urine na monstername kan de pH van de urine hoger worden. Bacteriën die tijdens of na afname in de urine terecht zijn gekomen, kunnen ureum afbreken tot ammoniak, wat leidt tot een verhoging van de pH.

2. Eiwit

De sneldiagnostica of colorimetrische testen op eiwit in urine zijn gebaseerd op het principe van de "eiwitfout van indicatoren". Dit fenomeen werd in 1910 door Sörensen beschreven. Het verklaarde de schijnbare veranderingen in pH die ontstaan wanneer bepaalde kleurstofindicatoren gebruikt worden voor de bepaling van de zuurgraad in biologisch, eiwithoudend materiaal. Zowel bij een hogere pH als bij de aanwezigheid van eiwitten vind een kleuromslag plaats. Het reagens tetrabromophenol is gebufferd bij een pH van 3. Door deze buffer wordt de kleur van de indicator bepaald bij de afwezigheid van eiwit.

Het is belangrijk om de teststrook zo kort mogelijk in de urine te dopen om uitwassing van de buffer te voorkomen. Bij alle urines zal na verloop van tijd een kleuromslag plaatsvinden vanwege het overschrijden van de buffercapaciteit. Aangezien het reagens sneller reageert op de aanwezigheid van eiwit dan op de overschrijding van de buffercapaciteit, moet de testzone direct worden afgelezen. Basische urines kunnen ook meteen na onderdompeling een lichte kleuromslag geven. Bij het konijn, de cavia en de grote herbivoren is er dan ook altijd sprake van een fout-positieve aanwezigheid van een spoortje eiwit. Basische urine (zeker die van het rund en het paard) moet verdund worden met azijnzuur tot +/- pH 5 voor een betrouwbaarder resultaat.

Het reagens op de teststrip is het meest gevoelig voor albumine en minder gevoelig voor hemoglobine of andere globulines (zoals bijv. Bence-Jones bodies die in de urine kunnen komen bij verschillende soorten tumoren). Bij aanwezigheid van deze eiwitten kan dan soms een fout-negatief resultaat worden verkregen. De concentratie aan eiwit in urine is afhankelijk van de mate van de algemene concentratie van de urine. Door bepaling van het S.G. zal dus steeds een oordeel moeten worden gevormd over de mate van concentratie door de nieren. Een zwak-positieve reactie bij een hoog S.G. wijst dan op een zeer geringe eiwituitscheiding, bij een laag S.G. echter op een grotere uitscheiding.

Deze klassieke methode voor het aantonen van eiwitten heeft bij honden en katten een beperkte betrouwbaarheid. Met name de specificiteit binnen een gezonde populatie katten blijkt in verschillende onderzoeken niet boven de 30% uit te komen. Interpretatie van mogelijke proteïnurie moet dan ook zorgvuldig gebeuren. Verderop in dit hoofdstuk wordt dan ook ingegaan op verder onderzoek naar het eiwitten in de urine.

3. Bloed en hemoglobine

In urine van gezonde dieren komt nooit klinisch chemisch aantoonbaar bloed voor. Een positieve reactie op bloed is dan ook pathologisch. Onderscheid moet worden gemaakt tussen hemoglobinurie (aanwezigheid van hemoglobine in urine) en het veel vaker voorkomende hematurie (aanwezigheid van erytrocyten in urine).

Erytrocyten (ery's) kunnen langs de hele urogenitaaltractus in de urine komen. Hemoglobine kan in de urine komen bij iedere vorm van versnelde intravasale erythrolyse. De grootte van het hemoglobinemoleculen en de nierdrempel voor hemoglobine zijn zodanig dat het dan in urine wordt uitgescheiden. Hemoglobine in de urine kan ook voorkomen wanneer erytrocyten in urine tijdens of na afname hemolyseren. Dit laatste zal eerder voorkomen in alkalische urine dan in zure urine. Bij macroscopisch onderzoek kan een rode kleur van de urine een aanwijzing geven voor hematurie of hemoglobinurie. Bij hematurie is de urine vaak troebel door de aanwezigheid van hele cellen in de urine die het licht verstrooien. Hemoglobine daarentegen is een oplosbaar eiwit en hemoglobinurie veroorzaakt daarom geen troebeling; natuurlijk kan een dergelijke urine ook door andere oorzaken troebel zijn.

Verder kunnen ery's in tegenstelling tot hemoglobine van urine gescheiden worden door centrifugeren, waarna het sediment rood van kleur is. Het supernatant zal dan een negatieve uitslag geven bij de chemische analyse voor bloed. Bij microscopisch onderzoek van het sediment zijn de ery's dan goed herkenbaar. Toch duidt een rode kleur van het sediment niet altijd op de aanwezigheid van ery's, aangezien hemoglobine o.a. in paarden-urine met slijm en/of zouten afgecentrifugeerd kan worden en ook dan een rood sediment geeft.
Het klinisch chemisch aantonen van bloed en hemoglobine is gebaseerd op de peroxidaseachtige activiteit van de heemgroepen van hemoglobine. Heem kan zuurstof uit peroxides (H_2O_2 en organische peroxides) overdragen op oxidabele stoffen. Heem is dus een "pseudo-peroxidase". Dit betekent ook dat bepaalde oxiderende schoonmaakmiddelen kunnen zorgen voor een fout-positieve uitslag.

Intacte erytrocyten worden door aanraking met de testzone gelyseerd, waarbij het vrijgekomen hemoglobine de oxidatiereactie kan katalyseren. Bij weinig bloed in de urine, wordt dit zichtbaar als kleine gekleurde vlekjes (locale verkleuring op de plekken waar de erytrocyten kapot zijn gegaan). Op deze manier kan onderscheid gemaakt worden tussen hematurie en hemoglobinurie (waarbij de hele testzone in zijn geheel is verkleurd). Vaak is echter al een deel van de ery's gelyseerd of is de concentratie ery's zo hoog dat de verkleuring egaal is.

Aangezien de kleuromslag veroorzaakt wordt door de heemgroepen van hemoglobine, kunnen andere moleculen met een heemgroep zorgen voor een fout-positieve uitslag. Dit is dan ook het geval bij myoglobinurie. Myoglobine in de urine kan veroorzaakt worden door ernstige spierafbraak. De kleur van de urine is dan vaak roodbruin tot bruin.

Is het genomen urine monster rood verkleurd door de aanwezigheid van plantenkleurstoffen, dan zal dit een negatieve uitslag geven. Bij rode urine is dit een makkelijke manier om hematurie en hemoglobinurie uit te sluiten.

4. Bilirubine

Bilirubine is het normale afvalproduct van de afbraak van heem. Bilirubine komt vrij wanneer erytrocyten aan het einde van hun levensduur worden afgebroken. Om dit onoplosbare bilirubine uiteindelijk uit te scheiden wordt het afgegeven aan het bloed en gebonden aan albumine naar de lever vervoerd. Hier wordt het bilirubine, door conjugatie met glucuronzuur, water-oplosbaar gemaakt. Vervolgens wordt het geconjugeerde bilirubine met de gal uitgescheiden in de darm. Alleen bij een slechte nierfunctie of een hoge concentratie bilirubine in het bloed kan er sprake zijn van bilirubinurie. Dit laatste is met name het geval bij een obstructie van de galwegen, waardoor bilirubine weer 'terug lekt' naar de circulatie. De concentratie geconjungeerd bilirubine in het bloed is dan hoger dan nierdrempel. Een uitzondering hierop is de gezonde reu waarbij bij geconcentreerde urine bilirubinurie kan optreden.

Wanneer er sprake is van uitgesproken bilirubinurie, dan is er een hoge concentratie geconjungeerd bilirubine (direct bilirubine) in het bloed aanwezig. Ongeconjungeerd bilirubine (indirect bilirubine) is gebonden aan albumine en zal bij normaal functionerende nieren niet in de urine terecht komen. Geconjungeerd bilirubine is met name verhoogd bij een obstructie van de galwegen. Bij een verhoogde afbraak van erytrocyten zal zowel de ongeconjungeerde als de geconjugeerde bilirubine in het bloed zijn verhoogd en hierbij zal er in ernstige gevallen ook sprake kunnen zijn van bilirubinurie. Bilirubine geeft een donkere kleur aan de urine (theekleur). Het aantonen van bilirubine is gebaseerd op het binden van bilirubine aan een diazoniumzout (vroeger veel gebruikt als kleurstof). Door koppeling van bilirubine aan dit zout ontstaat in het zure milieu van het testpapier een complex met een blauw-paarse kleur. Belangrijk is dat het geconjungeerde bilirubine een onstabiele verbinding is. Dit betekent dat het bilirubine na verloop van tijd spontaan verdwijnt en zelfs sneller als het wordt blootgesteld aan licht en niet gekoeld wordt bewaard. De urine moet dan ook binnen een uur na monstername worden getest op de aanwezigheid van bilirubine. Bij rund en paard is de ervaring met sneldiagnostica

voor het onderzoek op bilirubine gering. Voor kleine huisdieren blijken deze sneldiagnostica goed te voldoen.

5. Glucose

De glomerulaire capillairen van de nieren laten glucose passeren, maar in de tubulus wordt nagenoeg alle glucose geresorbeerd. Alleen wanneer de bloedglucosespiegel zo hoog is dat de proximale tubulus niet meer in staat is alle glucose terug te resorberen overschrijdt de glucoseconcentratie in het bloed de nierdrempel. Normaal gesproken bevat de urine dus geen glucose. Wanneer er wel sprake is van glucosurie kan dit komen door een hoge concentratie aan glucose in het bloed. Verder kan een remming van het reabsorptiemechanisme van de proximale tubulus zelf ook zorgen voor de aanwezigheid van glucose in de urine. Dit kan door een beschadiging, of door remming van bepaalde stoffen of medicijnen. Om onderscheid tussen beide mogelijkheden te maken moet de glucoseconcentratie in het bloed worden gemeten.

Glucose in de primaire urine, welke niet of onvoldoende kan worden terug geresorbeerd, zorgt in het latere deel van de tubulus voor de osmotische aantrekking van water. Hierdoor kan de nier slecht concentreren, ontstaat er polyurie en urine met een lichte kleur. Toch zal het S.G. nauwelijks afwijkend zijn, of misschien wel licht verhoogd door de aanwezigheid van glucose. De meest bekende oorzaak van glucosurie bij de hond en de kat is diabetes mellitus (suikerziekte). Bij katten kan ook glucose in de urine worden aangetroffen als gevolg van stress. De klinisch chemische bepaling van glucose in urine berust op de uitermate specifieke omzetting van glucose door het enzym glucose-oxidase. Glucose wordt door dit enzym en lucht-zuurstof geoxideerd tot gluconzuur. De zuurstof wordt hierbij gereduceerd tot H_2O_2. Dit H_2O_2 wordt vervolgens door het eveneens aanwezige enzym peroxidase gebruikt om het kleurloze chromogeen te oxideren tot een gekleurde verbinding.

$$\text{glucose} + O_2 \xrightarrow{\text{glucose oxidase}} \text{gluconzuur} + H_2O_2$$

$$\underset{\text{(gereduceerd en kleurloos)}}{H_2O_2 + \text{chromogeen}} \xrightarrow{\text{peroxidase}} \underset{\text{(geoxideerd en groen)}}{\text{chromogeen} + H_2O.}$$

Fig. 3 *Reacties betrokken bij het aantonen van glucose*

Wanneer er naast glucose ook stoffen in de urine aanwezig zijn waardoor het door glucose gevormde H_2O_2 gereduceerd wordt, kan er een fout-negatief resultaat ontstaan. Zo'n aspecifieke reductie treedt bijv. op met vitamine C, dat in hondenurine in hoge concentraties kan voorkomen of bij de aanwezigheid van ketonlichamen. Veel fabrikanten hebben ervoor gezorgd dat deze interferentie niet voor kan komen.

6. *Ketonlichamen*

Ketonlichamen (aceton, acetoacetaat, 3-hydroxybutyraat) kunnen in de lever worden gevormd bij verhoogde afbraak van vetzuren.

Fig. 4 *De structuurformules van de verschillende ketonlichamen*

Zodra het gehalte aan ketonlichamen in het bloed boven de drempelwaarde stijgt, zullen deze stoffen in de urine verschijnen. Dit is het geval wanneer het organisme overschakelt van een stofwisseling gebaseerd op verbranding van koolhydraten naar een stofwisseling gebaseerd op verbranding van vetten, zoals bijv. bij diabetes mellitus. Bij niet-diabetici verschijnen ketonlichamen in de urine tijdens vasten, een (te) hoge energievraag, bij slecht (arm) kuilvoer of bij onvoldoende voedselopname. Dit komt tamelijk vaak voor bij zieke dieren; vooral jonge dieren neigen dan tot ketonurie.

Bij gezelschapsdieren is diabetes mellitus de voornaamste oorzaak van ketonurie. Bij herkauwers, waar de glucosespiegel laag is in vergelijking met andere diersoorten, ontstaat makkelijk ketose tijdens een negatieve energiebalans (te weinig energieopname in verhouding tot het gebruik). We zien dit bijvoorbeeld bij slepende melkziekte, een afwijking die vaak voorkomt bij koeien met een hoge melkgift, die daardoor een verhoogde behoefte aan koolhydraten (lactose) hebben, en bij koeien met een gebrek aan eetlust (bijv. als gevolg van pneumonie, mastitis, metritis), waardoor de toevoer van koolhydraat verlaagd is. Bij schapen ontstaat ketose bovendien vaak tijdens de dracht.

Ketonlichamen verschijnen in de urine voordat er sprake is van een belangrijke toename van ketonlichamen in het bloed. Bij ernstige vormen van ketose is ook de bloedspiegel voor ketonlichamen aanzienlijk verhoogd. Ook door koolhydraat-vrije voeding zal ketonurie optreden, welke makkelijker bij jonge dan bij volwassen dieren optreedt. Wanneer er sprake is van een veel te hoge concentratie ketonlichamen in het bloed en daarmee in de urine, dan kan de acetoacetaat spontaan decarboxyleren tot aceton. Dit kan soms goed te ruiken zijn in de urine of de uitademingslucht.

Voor het aantonen van ketonlichamen beschreef Rothera in 1908 voor het eerst de nitroprussidtest voor ketonlichamen in urine. Sinds die tijd zijn er vele modificaties van de "Rothera"-test ontwikkeld voor klinische toepassing. Die modificaties verschillen in gevoeligheid ondanks dat ze allemaal dezelfde typen reagentia gebruiken.

Nitroprussidnatrium reageert alleen met stoffen die een ketogroep bevatten; de reactie met 3-hydroxybutyraat is dus negatief. Bij ketose wordt 3-hydroxybutyraat het meest uitgescheiden, maar de uitgescheiden hoeveelheid acetoacetaat is niet veel minder. Daarom is de nitroprussidtest toch een bruikbare indicator voor de ernst van de ketose.

Door de grote gevoeligheid van de nitroprussid-reactie treedt ook in urine van klinisch gezonde melkkoeien vaak een positieve reactie op. Zeker aan het begin van de lactatie hebben koeien vaak een fysiologische verhoging van ketonlichamen. Daarnaast worden ketonlichamen bij gezonde herkauwers ook geproduceerd in de penswand en is de concentratie ketonlichamen bij deze dieren ook afhankelijk van de voeding. Voor het vaststellen van ketonurie moet daarom een 20x verdunde urine een duidelijk positieve reactie geven.

7. Urobilinogeen, nitriet, leukocyten en S.G.

Op veel humane teststroken zitten ook testzones voor het aantonen van urobilinogeen, nitriet, leukocyten en het soortelijk gewicht. Deze bepalingen zijn veterinair niet relevant of onbetrouwbaar.

Urobilinogeen geeft aan dat er veel uitgescheiden bilirubine via de darm, weer terugresorbeerd wordt in de systemische circulatie. Na filtratie door de nieren komt dit in de urine terecht. Dit kan het geval zijn bij overmatige afbraak van erytrocyten (hemolyse). Deze bepaling is veterinair echter onbetrouwbaar en daarom niet relevant.

Nitriet ontstaat in de urine door de omzetting van nitraat door bacteriën in de blaas en is daarmee een aanwijzing voor een bacteriële blaasinfectie (pyurie). Alleen bij het paard wordt de nitriet-bepaling gebruikt voor de diagnose van een blaasinfectie. Bij de gezelschapsdieren komt te vaak een fout-positieve of fout-negatieve uitslag voor en daarom is de bepaling voor nitriet bij deze dieren onbruikbaar.

Bij een blaasontsteking zullen ook leukocyten in de urine terecht komen. Deze kunnen ook chemisch worden aangetoond, maar geven bij hond en kat vaak een fout-positieve of fout negatieve uitlag.

Het S.G. wordt klinisch chemisch bepaald doordat in de aanwezigheid van kationen er protonen vrijkomen van het reagens op de testzone. Aangezien het soortelijk gewicht ook wordt veroorzaakt door andere grotere moleculen is dit vaak niet betrouwbaar. Ook zal het S.G. bij alkalische urines te laag uitvallen en bij zure urine te hoog. Veterinair is het klinisch chemisch bepalen van het S.G. dan ook slecht bruikbaar en kan het veel beter met de refractometer worden bepaald.

Onderzoek van het urinesediment

Onderzoek van het urinesediment is vast onderdeel van een routine urine-analyse. Enige kennis, vaardigheid en routine is wenselijk voor het correct identificeren van de verschillende componenten van het urinesediment. Een pathologische situatie moet onderscheiden kunnen worden van het normale beeld. Expertise in het onderzoek van sedimenten wordt verkregen door oefening. De kans op zowel methodische als interpretatiefouten is aanzienlijk. Bij de interpretatie van het onderzoeksresultaat dient hiermee rekening te worden gehouden.

Monster

Het is belangrijk om gebruik te maken van verse urine voor onderzoek van het sediment.

Wanneer binnen drie uur na monstername het onderzoek wordt uitgevoerd is de kwaliteit gegarandeerd. Wordt het onderzoek later uitgevoerd, dan dient de urine koel bewaard te worden bij 4-8°C. Urinemonsters die ouder zijn dan 24 uur zijn ongeschikt voor het onderzoek van veel onderdelen in het urinesediment. Door het staan degenereren georganiseerde structuren, zoals cellen en cylinders, met name door bacteriegroei waardoor de urine alkalischer wordt.

In monsters die in de koelkast zijn bewaard kan het zijn dat er kristalvorming heeft plaatsgevonden. Voordat deze monsters worden onderzocht is het van belang om ze op kamertemperatuur te laten komen. Voor het uitvoeren van het onderzoek is het daarnaast belangrijk om de urine goed te mengen voordat er een gedeelte van het monster wordt gecentrifugeerd. Deeltjes in de urine zijn namelijk naar de bodem gezakt.

De minimale hoeveelheid urine die nodig is voor het sedimentonderzoek is 10 ml. Met name wanneer er sprake is van een laag soortelijk gewicht van de urine is dit van belang .

Uitvoering: het maken van een urinesediment

1. Noteer voor het centrifugeren de volgende waarnemingen:
   - Wijze van monstername
   - Tijdsduur tussen monstername en verwerking
   - Het macroscopisch aspect, pH en S.G. van de urine
   - Hoeveelheid monster gebruikt voor sedimentonderzoek.
2. Zorg dat het monster op kamertemperatuur is en zwenk het goed.
3. Giet 10 ml over in een centrifugebuis. Wanneer minder urine gebruikt is, moet dit bij de uitslag worden vermeld.
4. Centrifugeer 5 minuten op ± 1500 rpm. Dit komt overeen met 200 RCF bij een centrifuge met een straal van 75 mm.

N.B. De centrifuge mag daarna niet geremd worden anders wervelt het sediment weer op.

5. Na centrifugeren moet het supernatant in een vloeiende beweging worden afgegoten tot een volume van 0,5 ml overblijft.
6. Het sediment moet in het achterblijvende volume weer worden gesuspendeerd. Dit kan door voorzichtig te tikken tegen de buis of met behulp van een pipet.

N.B. goed suspenderen is van belang om het sediment goed te verdelen voor microscopische analyse

7. Daarna kan een druppel op een voorwerpglaasje worden gepipetteerd. Hiervan kan een natief preparaat worden gemaakt door hier een dekglaasje op te leggen.

Gebruik een dekglaasje dat kleiner is dan het opbjectglas (bij voorkeur 22x22mm). Op deze manier kunnen de randen goed worden gecontroleerd op cylinders.

Het bekijken van het urinesediment

Standaard wordt van het sediment van de urine een natief preparaat gemaakt en bekeken onder de microscoop. Bij het bekijken van deze ongekleurde sediment preparaten is het belangrijk om de condensor van de microscoop omlaag te zetten en zo min mogelijk licht op het preparaat te laten vallen.

Het sediment wordt eerst bekeken onder een kleine vergroting (10x10), om de algemene samenstelling van het sediment te beoordelen en om grote structuren zichtbaar te maken. Een gezichtsveld bij deze vergroting wordt een low power field (lpf) genoemd. Het beoordelen van individuele structuren vindt plaats onder een hogere vergroting van 10x40. Een gezichtsveld bij deze vergroting wordt een high power field (hpf) genoemd. Grotere structuren, zoals korrel en hyaline cylinders, kunnen naar de zijkanten van het dekglaasje drijven waardoor het van belang is om ook goed de zijkanten van het preparaat te scannen.

Het bekijken van slechts enkele gezichtsvelden kan een foutieve uitslag opleveren. Voor een goed resultaat is het belangrijk om minimaal 10 gezichtsvelden met zowel een lage als een hoge vergroting te onderzoeken. Het is het beste om het gehele dekglaasje te bekijken bij een lage vergroting om regio's te ontdekken waar structuren zijn samengeklonterd. Deze kunnen de resultaten negatief beïnvloeden.

De wijze van verwerking van resultaten moet nauwkeurig gebeuren. Hierbij is het ook belangrijk dat altijd achterhaald moet kunnen worden hoe het monster is verkregen, bewaard en verwerkt. Bij een onduidelijk resultaat of bij een resultaat dat niet in overeenstemming is met het klinisch beeld van de patiënt, is het gewenst het onderzoek te herhalen in een nieuw verzameld monster.

Structuren

Er zijn drie typen structuren die belangrijke klinische betekenis kunnen hebben: cellen, cylinders en kristallen. In urine van gezonde dieren kunnen alle typen cellen en kristallen regelmatig voorkomen; echter in zeer kleine aantallen. Een veel gebruikte klinische indeling is de volgende:

Georganiseerd sediment	Ongeorganiseerd sediment
erytrocyten	kristallen
leukocyten	amorf materiaal
epitheelcellen (3 typen)	vetdruppeltjes
cylinders	
spermacellen	
micro-organismen	

Georganiseerd sediment

ERYTROCYTEN

In ongekleurde verse urine zijn erytrocyten bleek van kleur. De biconcave vorm kan veranderen door het soortelijk gewicht. In normaal tot hoog geconcentreerde urine ontstaan de zgn. doornappeltjes; dit zijn ery's waaraan vocht is onttrokken. In urine met een S.G.< 1.010 treedt lysis van de ery's op door osmotische wateropname.

Erytrocyten moeten niet worden verward met leukocyten, gisten, vetdruppeltjes en luchtbelletjes. Leukocyten zijn groter dan erytrocyten, zijn minder uniform en hebben een granulair aspect in tegenstelling tot het gladde aspect van de erytrocyten. Om onderscheid te maken tussen gisten en vetdruppeltjes kan het sediment wordt aangezuurd waardoor de cellen lyseren en de gisten en vetdruppeltjes aanwezig blijven. Gisten kunnen soms budding laten zien.

Het vinden van minder dan 5 ery's/hpf heeft geen klinische betekenis. Meer ery's zijn een aanwijzing voor bloedverlies. Bij een iatrogene bloeding door cystocentesis kan er sprake zijn van meerdere erytrocyten per hpf, terwijl er geen sprake is van een pathologisch proces.

LEUKOCYTEN

Ook hier is het zo dat enkele, sporadisch voorkomende, leuko's geen klinische betekenis hebben. Meer dan 5 leuko's/hpf wijst op een ontsteking en het massaal optreden van leuko's - dit heet pyurie - wordt vooral gezien bij acute ontstekingen. Vaak worden er neutrofielen gevonden, maar elk type leukocyt zou gevonden kunnen worden. Onderscheid maken tussen verschillende typen leuko's is in urinepreparaten heel moeilijk en vaak ook niet mogelijk.

EPITHEELCELLEN

Het is normaal om een klein aantal epitheelcellen in het sediment aan te treffen. Deze zijn afkomstig van de normale turnover van cellen vanuit de urogenitaaltractus. Er wordt onderscheid gemaakt in:

Plaveiselepitheel

Afkomstig uit de meest distale delen van de urinewegen; urethra en vagina. Het zijn vliesachtige, grote platte cellen met weinig structuur en geen zichtbare kern. Vaak zijn ze dubbelgevouwen, over elkaar liggend. Het zijn de grootste cellen (ong. 50 µm) die in een normaal urinesediment worden gevonden. Behalve als ze in grote hoeveelheden worden gevonden, hebben plaveiselepitheelcellen geen betekenis.

Overgangsepitheel

Afkomstig uit blaas, ureters en nierbekken. Het zijn ronde tot ovale cellen met meestal een korrelige structuur. De cellen zijn kleiner dan plaveiselepitheelcellen en groter dan ery's, leuko's en tubulaire cellen. De grootte kan wel sterk uiteenlopen. De kern is meestal zichtbaar en relatief klein. De grootte van de cellen zegt iets over de herkomst. Distaal (blaas) zijn ze veel groter dan proximaal (nierbekken). Proximaal zijn de cellen vaker kolomvormig dan rond of ovaal. Een verhoogd aantal overgangsepitheelcellen in het sediment kan wijzen op een hyperplasie van de blaas. Dit kan voorkomen bij een

blaasontsteking of een poliep. Verder kunnen er veel overgangsepitheelcellen aanwezig zijn wanneer het monster is genomen d.m.v. katheterisatie. Ook kan er sprake zijn van een overgangsepitheelcarcinoom. Door middel van een kleuring kan hier onderscheid tussen worden gemaakt. Bij een carcinoom zullen de cellen en de kernen verschillend zijn van grootte. Verder kan er sprake zijn van zowel bi- als multinucleaire cellen, kunnen in de kern een wisselend aantal nucleoli aanwezig zijn en in verschillende groottes, en kan er sprake zijn van mitose figuren.

Nier-tubulair-epitheel
Afkomstig uit de niertubuli. Kleine, ronde tot kubusvormige cellen met een relatief zeer grote kern. Soms wat kommavormig. Vaak in clusters. De cellen zijn niet altijd eenvoudig te onderscheiden van leukocyten. Het vinden van nierepitheel wijst op een degeneratief proces in de nier(tubuli). Door hun lange passagetijd in de niertubuli zijn de cellen vaak vervormd. Identificatie van niertubuluscellen is dan ook vaak lastig en ze zijn vaak moeilijk te onderscheiden van andere epitheelcellen.

CYLINDERS
De niertubuli en de verzamelbuisjes zijn bekleed met hyalien materiaal (mucoproteïnen). Bij een proteïnurie (zowel renaal als extra-renaal) kan er in de verzamelbuisjes een overmatige neerslag van mucoproteïne ontstaan welke kan loslaten en in de urine terecht kan komen. Dit zijn de hyaliene cilinders. Hyaliene cilinders zijn vaak lastig te herkennen in het sediment. Zeker wanneer er teveel licht op het preparaat valt, wordt er door de hyalinecilinders heen gekeken.

Wanneer er sprake is van beschadiging van de tubuli komen met de mucoproteïnen ook cellen mee. Deze celresten bevinden zich dan in de hyaliene cilinders. Zijn deze resten ondefinieerbaar dan worden het korrelcilinders genoemd. Een kleine hoeveelheid korrelcylinders (<2/lpf) is niet afwijkend en dit aantal kan licht stijgen bij inspanning. Grote hoeveelheden kunnen een aanwijzing zijn voor ernstige tubulaire beschadiging. Cylinders kunnen ook herkenbare cellen bevatten, zoals leuko's, ery's en soms nierepitheelcellen. We spreken dan van erytrocyten-, leukocyten- of epitheelcylinders. Ze zijn echter zeldzaam. De aanwezigheid van epitheelcylinders kan een aanwijzing zijn voor acute tubulaire beschadiging door necrose, intoxicatie (bijv. ethyleenglycol = antivries), ernstige ontsteking, hypoperfusie of hypoxemie.

Na verloop van tijd krijgen de korrel- en cellulairecylinders een glad oppervlak en zijn in ze tegenstelling tot hyaliene cylinders wel goed zichtbaar in het preparaat. Dit worden wascylinders genoemd en die worden alleen gevonden bij stasis en chronische nierziekten.

Het vinden van meerdere cylinders duidt in het algemeen op een degeneratief proces in de nier. Erg veel cylinders signaleren een acute nefritis.

MICRO-ORGANISMEN

Bacteriën
Tijdens bewaren van een urine ontstaat snel een bacterieflora. Deze veroorzaakt

veranderingen in het monster; b.v. een pH-verandering. De gevolgen daarvan worden o.a. besproken bij de tripelfosfaten. Zowel staafvormige bacteriën als coccen kunnen in de urine voorkomen. Vaak bewegen ze, maar niet alle bewegende deeltjes zijn bacteriën. Wanneer het monster niet ouder is dan 2 uur en er sprake is hematurie en pyurie (aanwezigheid van pus en leukocyten), is de aanwezigheid van bacteriën een sterke aanwijzing voor een bacteriële infectie. Wanneer wel bacteriën in het preparaat worden gevonden, maar geen pyurie en het dier geen klinische verschijnselen heeft die duiden op een cystis, is er sprake van occulte bacterurie. Er moet dan worden nagegaan in hoeverre de waarneming van belang is. Voor bevestiging en specificatie van een bacterurie is het nodig om het sediment te kleuren met een Diff-Quick en/of een Gram kleuring of om een kweek in te zetten.

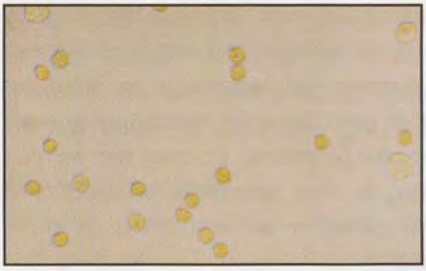
Gisten, spermacellen en schimmels

Gistcellen, spermacellen en soms schimmelhyfen zijn bijna altijd te beschouwen als een verontreiniging zonder klinische betekenis. De gist *Candida* sp. wordt beschouwd als normale flora van de urinewegen en kan in hoeveelheid toenemen bij een urineweg-aandoening, recent gebruik van antibiotica of de aanwezigheid van glucose in de urine als gevolg van diabetes mellitus.

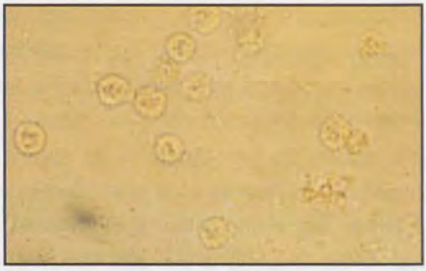
Parasieten

Door fecale contaminatie kunnen wormeieren in de urine terechtkomen. Heel zelden kan er sprake zijn van een parasitaire infectie van de urinewegen (bijv. *Cappilaria* spp. die met name in Noord-Amerika en Europa voorkomt). Wormeieren zijn groot en kunnen bij een lage vergroting goed zichtbaar worden. Ze moeten niet worden verward met plantenpollen.

Georganiseerd sediment in urine van de hond

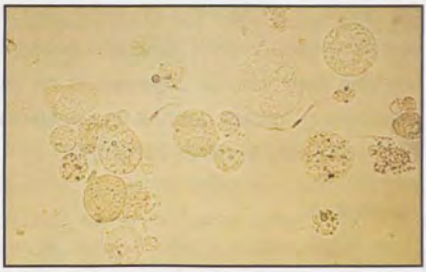


Erytrocyten (+ 2 leukocyten)

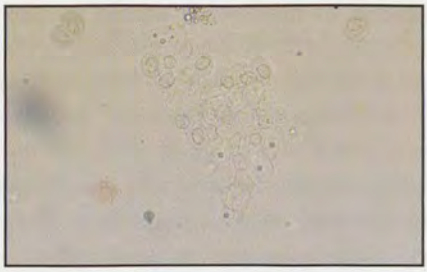


Leukocyten

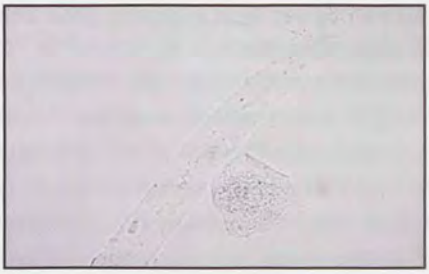
Plaveiselepitheel



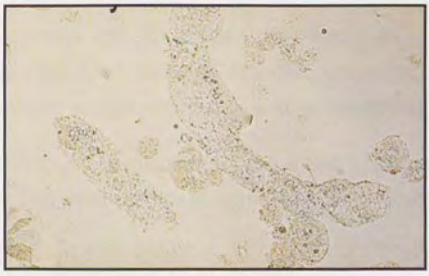
Overgangsepitheel



Nierepitheel



Hyalienecylinder



Korrelcylinder

Ongeorganiseerd sediment

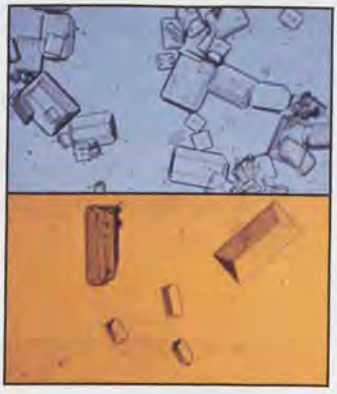
KRISTALLEN

Wanneer er kristallen in de urine aanwezig zijn, is er sprake van urolithiasis. Kristalvorming ontstaat door het neerslaan van anorganische zouten, organisch materiaal of iatrogene componenten. Bij een lage pH kristalliseren met name organisch materiaal en iatrogene componenten terwijl bij een neutrale tot hoge pH met name anorganische zouten kristalliseren. Een uitzondering hierop is calciumoxalaat dat bij lage tot neutrale pH neerslaat. Daarnaast is kristalvorming afhankelijk van o.a. de vocht-opname, de samenstelling van de voeding, de hoeveelheid urine en daarmee de concentratie aan elementen. Ook bij het gebruik van medicaties kunnen kristallen ontstaan. Variabele vormen kunnen worden gezien bij het gebruik van bijvoorbeeld sulfonamides, ampiciline, contrast-vloeistof en allopurinol. Tijdens het bewaren van urine treedt soms alsnog kristallisatie op, met name bij bewaring in de koeling. Daarom is het van belang te werken met zo vers mogelijk materiaal en het monster op kamertemperatuur te laten komen voordat deze wordt gecentrifugeerd.

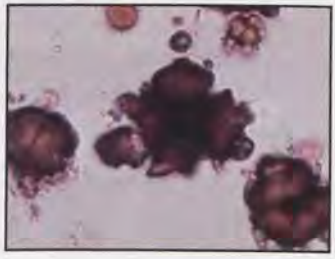
Een aparte plaats nemen de stenen in die vooral ontstaan in alkalische urine: fosfaten en carbonaten. Deze zijn bij gezelschapsdieren in veel gevallen een rechtstreeks gevolg van infectie van urinewegen. Andersom kunnen kristallen in de urine ook een predisponerende factor zijn voor het ontstaan van een bacteriële urineweginfectie. Naast het wegnemen van de primaire oorzaak van de kristallen, kunnen kristallen ook worden tegengegaan door verbetering van wateropname en door in de voeding de mineralen en eiwitsamenstelling aan te passen.

Veel voorkomende kristallen:

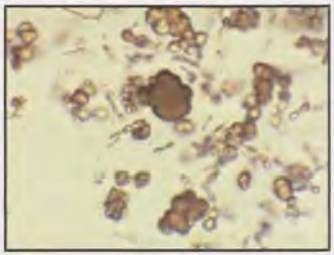
Tripelfosfaat of struviet (dakvormig, doodskistjes)
De chemische elementen zijn ammonium, magnesium en fosfaat. Het zijn dakvormige kristallen van uiteenlopende vorm en grootte. Soms is echter een geheel andere vorm aanwezig die we wel omschrijven als varenblaadjes. Tripelfosfaten komen frequent voor bij hond en kat, maar hebben alleen betekenis als ze in grotere aantallen aanwezig zijn. Tripelfosfaten zien we met name in urines met een wat hogere pH. Onder tripelfosfaat wordt het hele kristal verstaan, vergruisd tripelfosfaat wordt met struviet aangeduid.



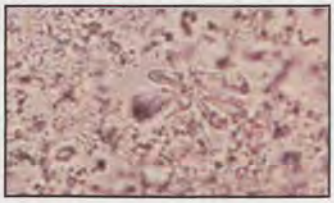
Ammonium(bi)uraat (donker gekleurde bollen)
Bolvormige structuren, licht- tot donkerbruin van kleur, met soms doornige uitsteeksels en die neerslaan bij een hoge pH van de urine (hiernaast). Uraatzouten van natrium, kalium en magnesium of calcium zien er amorf uit en hebben een geelbruine kleur na centrifugatie (volgende pagina). Deze uraatzouten slaan neer bij een



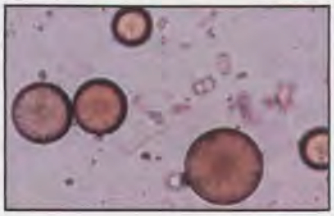
lagere pH. Uraten worden veel gevonden bij Dalmatische honden als gevolg van een bijzondere stofwisseling bij dit ras waardoor urinezuur onvoldoende wordt omgezet in allantoïne. Bij andere rassen geeft het vinden van deze kristallen een indicatie van een leverprobleem; in het bijzonder van de ammoniakstofwisseling b.v. bij een porto-systemische shunt. Bij een lage pH van de urine is er urinezuur aanwezig i.p.v. uraat.



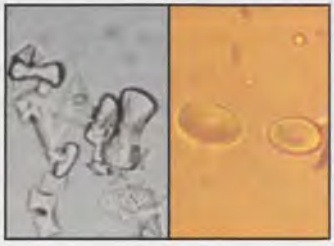
Calciumfosfaat (pijlpuntvormig)
Kunnen zowel bij honden als katten voorkomen en zien er vaak vormloos uit. Voor het ontstaan van deze kristallen is een hoge pH van de urine nodig.



Calciumcarbonaat (grote geel/bruin of kleurloze ronde vormen met radiale strepen)
Deze kristallen komen zelden voor bij de hond en kat. Alleen bij herbivoren zoals het paard, cavia en konijn is normale urine troebel door het voorkomen van grote hoeveelheden calciumcarbonaatkristallen.



Calciumoxalaat monohydraat (haltervormig (links), ovaal rechts))
Deze kristallen kunnen zowel bij honden als bij katten voorkomen. Een lage wateropname en een zure urine geven een verhoogd risico. Bij een aandoening waarbij sprake is van hypercalciurie of een ethyleenglycol-intoxicatie komen ze in grote hoeveelheden voor in de urine.

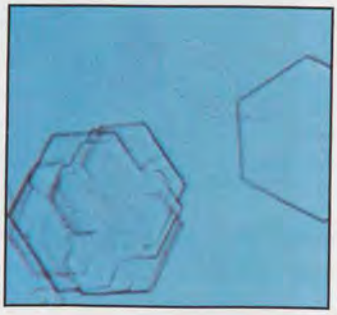


Calciumoxalaat dihydraat (vierkant, envelopvormig)
Deze kristallen variëren sterk in grootte. De vorm is echter altijd exact dezelfde, nl. vierkant met er overheen een diagonaal, oplichtend kruis. Ze worden veel gezien en hebben in beperkte hoeveelheid geen enkele klinische betekenis. Bij een ethyleenglycol intoxicatie komen ze echter massaal voor.

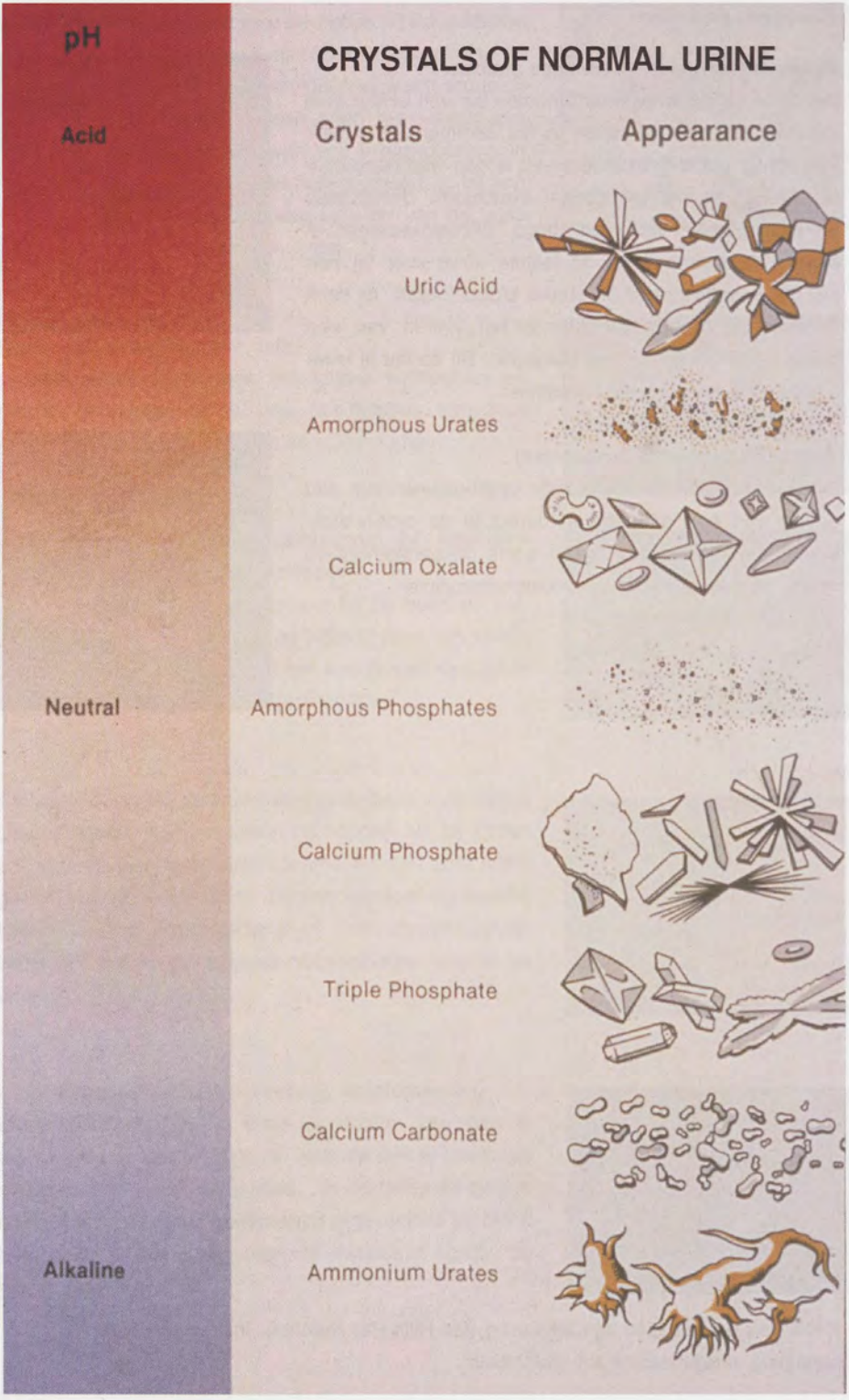
Zeldzame kristallen:

Bilirubine (lichtbruine takvormige structuur)
Bilirubine kan worden waargenomen als een helder gele kleuring van diverse cellen in het sediment. Bilirubine kan echter ook uitkristalliseren en is dan waarneembaar als kleine, bruine "takachtige" structuren. Bilirubinurie is een gevolg van een hoge bilirubinespiegel in bloed (bilirubinemie) en dit laatste komt voor bij een slechte leverfunctie of bij sterke bloedafbraak. In sterk geconcentreerde hondenurine is het vinden van een spoor bilirubine echter niet afwijkend. Bij de kat is ieder signaal van bilirubine wèl afwijkend.

Cystine (transparante zeshoekjes)
Cystine kristallen en soms zelfs cystinestenen zijn een gevolg van een aangeboren defect in de cystinestof-wisseling. De kristallen liggen soms dakpansgewijs op elkaar en dan ontstaan vage honingraatstructuren.



De foto's van de kristallen zijn afkomstig van Hills Pet Nutrition, Inc. uit de folder "Behandeling van kristalurie en urolithiasis".


pH
CRYSTALS OF NORMAL URINE
Acid
Crystals
Appearance
Uric Acid
Amorphous Urates
Calcium Oxalate
Neutral
Amorphous Phosphates
Calcium Phosphate
Triple Phosphate
Calcium Carbonate
Alkaline
Ammonium Urates

Overig onderzoek

Eiwitten in de urine

Vergelijkend onderzoek van de meest gebruikelijke methoden voor het aantonen van proteïnurie leerde dat met alle methoden zowel fout-positieve als fout-negatieve resultaten verkregen kunnen worden. Het interpreteren van eiwituitslagen van urinemonsters moet dan ook gedaan worden met enige voorzichtigheid. Het is heel belangrijk om alle gegevens van de diagnostiek (signalement, anamnese, lichamelijk onderzoek en macroscopisch onderzoek van de urine) mee te nemen in de interpretatie. De afwezigheid van proteïnurie is vaak wel een betrouwbare aanwijzing voor een "gezond" urogenitaal apparaat.

Schuimvorming

Schuimvorming is erg makkelijk te testen en geeft aan dat er stoffen in de urine zitten die de oppervlaktespanning verlagen. Hiervoor kan urine in een reageerbuisje worden overgegoten (ongeveer 4-5 cm hoog). Vervolgens is het de bedoeling om de reageerbuis tussen duim en wijsvinger zo hoog mogelijk vast te pakken en heel snel heen en weer te bewegen (niet te voorzichtig). Door dit schudden zullen belletjes ontstaan die normaal gesproken binnen een halve minuut beginnen weg te trekken. Blijft het schuim een langere tijd staan dan noemen we dat persisterende schuimvorming.
Geelbruin of groen persisterend schuim duidt op de aanwezigheid van galkleurstoffen naast galzouten (kleur van het schuim). Persistent, vlokkig schuim duidt op eiwitten en persistent rood schuim op hemoglobine.

Sulfosalicylzuur

In de VS wordt veel gebruik gemaakt van een test met hetzelfde principe als de BANG-proef, die vroeger veel gebruikt werd om te onderzoeken of een urine eiwit bevat. De urine werd daarbij eerst aangezuurd en dan gekookt. Bij de huidige methode wordt sulfosalicylzuur gebruikt om eiwitten te denatureren. Een oplossing van 5% sulfosalicylzuur wordt in de verhouding 1:1 aan urine toegevoegd, waarbij de urine meteen troebel wordt bij de aanwezigheid van eiwitten. Koken is daarbij dan niet meer nodig. Belangrijk is, dat zowel bij de kookproef volgens BANG als bij de sulfosalicylzuur-methode het supernatant van de urine wordt gebruikt. Eiwitrijk materiaal uit het sediment zal namelijk een fout-positief resultaat geven. Evenals de teststrip geeft ook de sulfosalicylzuur-methode bij de kat vaak een fout-positieve uitslag. Waarschijnlijk scheiden katten ook normaal al vaak niet-albumine eiwitten uit via de urine.

Voor zowel de kookproef volgens BANG als de sulfosalicylzuurmethode geldt dat alle aanwezige eiwitten zullen denatureren en hierbij dus niet alleen albumine wordt aangetoond.

Kwantatief en kwalitatief eiwit onderzoek

In de meeste gespecialiseerde diagnostische laboratoria zijn steeds meer onderzoeken mogelijk. Hier kan betrouwbaarder zowel kwalitatief als kwantitatief onderzoek gedaan worden naar het eiwitgehalte.

Binnen de humane geneeskunde wordt als gouden standaard voor een kwantitatieve bepaling, de hoeveel eiwit bepaald in urine die gedurende 24 uur is opgevangen. In de dierenartspraktijk is het vrijwel onmogelijk om van een dier alle urine gedurende 24 uur op te vangen. De eiwit:creatinine ratio bepaling is hiervoor een goede vervanging.

Creatinine is een afbraakproduct van creatinefosfaat in spierweefsel en wordt door het lichaam met een vrij constante snelheid geproduceerd en door de nieren uitgescheiden. Daarnaast wordt creatinine na uitscheiding via de glomerulus niet teruggeresorbeerd door de tubulli, waardoor de uitscheiding onafhankelijk is van de hoeveelheid terugresorptie. Bij een goed geconcentreerde urine zal een hoge concentratie creatinine aanwezig zijn (veel water is geresorbeerd in de tubili en de verzamelbuis).

Door het creatinine-gehalte mee te nemen wordt gecorrigeerd voor het soortelijk gewicht van de urine. Een kleine hoeveelheid eiwit in geconcentreerde urine hoeft niet afwijkend te zijn (bijv. bij de reu). De eiwit:creatinine ratio kan dan de bevestiging of uitsluitsel geven van een proteïnurie n.a.v. een positieve uitslag van de dipstick. Voor in de praktijk zijn ook urinesticks beschikbaar om de eiwit:creatinine ratio te bepalen. In 2011 heeft het UVDL onderzoek gedaan naar de betrouwbaarheid van deze strip en deze bleek onvoldoende.

Voor kwalitatief onderzoek naar de verschillende eiwitten in de urine kan gelelektroforese uitgevoerd worden (SDS-page). Hierbij worden de eiwitten op grootte gescheiden en krijg je daar een indruk van.

Microalbuminurie

Ook komen er steeds meer testen op de markt voor in de praktijk, waarbij kleine hoeveelheden albumine in de urine aangetoond kunnen worden, die niet met de standaardtesten bepaald kunnen worden. Zo zijn er al dipsticks op de markt die geïmpregneerd zijn met humane antilichamen tegen albumine. Het UVDL heeft onderzoek gedaan naar veterinair gebruik van deze strips, maar nog geen bruikbare gevonden.

Humaan is bekend dat kleine hoeveelheden albumine aanwijzingen geven voor een verhoogd risico op nierfalen en een hartinfarct. Ook bij honden en katten zijn deze kleine hoeveelheden aanwijzingen voor onderliggende systemische aandoeningen. Het aantonen van albumine wordt in het laboratorium gedaan d.m.v. een ELISA, waarbij gebruik gemaakt wordt gemaakt van antilichamen. In de toekomst zullen steeds meer laboratoria een test aanbieden waarbij soortspecifieke antilichamen tegen albumine gebruikt gaan worden.

Bacteriologisch onderzoek

Het inzetten van bacteriologisch onderzoek is belangrijk om na te gaan of een bacteriële infectie de oorzaak is van een blaasontsteking. Tegenwoordig is dit heel goed zelf in de praktijk uit te voeren. Urine moet afgenomen zijn d.m.v. cystosynthese of bij het paard en rund via katheterisatie.

Verschillende kweekbodems zijn verkrijgbaar en urine kan in de eigen praktijk in een kleine stoof op kweek worden gezet. Kleurverandering van het medium en kolonievorming geven in bepaalde mate aan om welke bacterie het gaat. Het grote voordeel is dat urine hierdoor meteen na afname ingezet wordt en niet vervoerd hoeft te worden naar het laboratorium. Ook is het onderzoek hierdoor goedkoper. Wanneer specifieke typering van bacteriën noodzakelijk is of het inzetten van antibiogram, dan moet de urine in het laboratorium verder worden onderzocht.

Bijlage: uitslagformulier urineonderzoek

Datum: Patiënt:

Klinisch probleem:

Wijze van monstername: Tijdstip monstername:

Wijze van bewaring: Tijdstip uitvoering onderzoek:

Fysische eigenschappen:

Volume: Helderheid:

Kleur: S.G.:

Geur:

Klinisch chemische analyse:

pH Eiwit

Bloed Bilirubine

Glucose Ketonlichamen

Urinesediment

Parameter	Uitslag				LPF / HPF
1. Sediment	TWM				
2. Leukocyten[2]	0-5	5-15	15-30	>30	HPF
3. Erytrocyten[2]	0-5	5-15	15-30	>30	HPF
4. Epitheel[1,2]	0-5	5-10	> 10		HPF
5. Bacteriën[2]	>100				HPF
6. Hyaline cylinder[3]	0-1	1-3	> 3		LPF
7. Korrel cylinder[3]	0-1	1-3	> 3		LPF
8. Was cylinder[3]	0-1	1-3	> 3		LPF
9. Calcium-oxalaat (di-hydraat)	0-1	1-3	> 3		LPF
10. Calcium-oxalaat (mono-hydraat)	0-1	1-3	> 3		LPF
11. Calciumfosfaat	0-1	1-3	> 3		LPF
12. Calciumcarbonaat[5]	0-1	1-3	>3		LPF
13. Ammonium uraat	0-1	1-3	> 3		LPF
14. Triple fosfaat	0-1	1-3	> 3		LPF
15. Triple fosfaat (varenblad)	0-1	1-3	> 3		LPF
16. Urinezuur	0-1	1-3	> 3		LPF
17. Bilirubine kristallen	0-1	1-3	> 3		LPF
18. Naaldvormige kristallen	Gezien				LPF
19. Vetbolletjes	Gezien				HPF
20. Sperma	Gezien				HPF
21. Amorf neerslag	Gezien				HPF
22. Schimmel/gist	Gezien				LPF
23. Cystine kristallen	Gezien				LPF
24. Cholesterol kristallen	Gezien				LPF
25. Sediment opmerkingen	RNTB[4]	NTB[4]			

TWM = Te weinig materiaal.

1 Plaveilselepitheel, overgangsepitheel en nierepitheel (dit bestaat o.a. uit: rond-epitheel, kubus-epitheel, staart-epitheel etc.).

2 Cellen en bacteriën worden per gezichtsveld (p.g.) gekwantificeerd bij een 400x vergroting (HPF = high power field).

3 Cylinders worden altijd per gezichtsveld (p.g.) gekwantificeerd bij een 100x vergroting (LPF = low power field).

4 Bij RNTB (rest niet te beoordelen) en NTB (niet te beoordelen) de reden van het niet te beoordelen bij de opmerkingen opgeven.

5 Indien geen calciumcarbonaat bij een paard aanwezig is, wordt dit met een opmerking aangegeven.

BLOEDONDERZOEK

Hemoanalyse en hematologie

HEMOANALYSE

Inleiding

Tegenwoordig maakt bloedonderzoek een belangrijk deel uit van de diagnostiek. Steeds meer apparatuur is in de praktijk beschikbaar om een scala aan bloedparameters te bepalen. Maar ook gespecialiseerde laboratoria bieden steeds meer bepalingen aan die een dierenarts kan laten uitvoeren. Het grote verschil tussen urineonderzoek en bloedonderzoek is dat het bij bloedonderzoek bijna altijd om kwantitatieve bepalingen gaat. In tegenstelling tot de urine wordt de samenstelling van het bloed zoveel mogelijk constant gehouden. Het bloed heeft als voornaamste functies om als buffer te fungeren, zuurstof en voedingstoffen naar de verschillende organen te brengen en afvalstoffen en warmte af te voeren. Omdat weefsels continu bepaalde stoffen aan het bloed afgeven en andere daaruit opnemen en bovendien de opname en afgifte van de verschillende weefsels verschillend is, wisselt de samenstelling van het bloed doorlopend binnen bepaalde marges; toch streeft het organisme i.v.m. het juiste functioneren van de lichaamscellen naar een zo constant mogelijke samenstelling van het interne milieu.

De schommelingen in de samenstelling van het bloed die onder fysiologische omstandigheden voorkomen bij gezonde dieren vallen binnen bepaalde, vaak nauwe grenzen (de referentiewaarden). Onder pathologische condities slaagt het organisme er vaak niet meer in de samenstelling van het bloed constant te houden. Onder deze omstandigheden kunnen door bloedonderzoek overschrijdingen van de referentiewaarden worden vastgesteld.

Door een toename in onze kennis van de pathofysiologie in combinatie met een betere methodologie heeft het chemisch bloedonderzoek de laatste decennia een enorme vlucht genomen. Vele huidige behandelingsmethoden berusten hoofdzakelijk op de uitkomsten van het chemische bloedonderzoek. Juist vanwege dit grote belang van het chemisch onderzoek past hier een ernstige waarschuwing: slordig afnemen van bloedmonsters met verkeerd gekozen antistollingsmiddelen maken uitkomsten waardeloos.

De behandelend dierenarts moet de uitkomsten van het bloedonderzoek altijd toetsen aan de klinische bevindingen bij de patiënt. Bloedparameters waarvan de uitkomsten niet in overeenstemming zijn met de toestand van de patiënt moeten opnieuw uitgevoerd worden of de differentiaal diagnose moet worden bijgesteld. Vaak is het interpreteren van de uitkomsten van het bloedonderzoek voor de dierenarts belangrijker dan het zich eigen maken van dergelijke bepalingsmethoden.

Historie bloedanalyse

Al in de oudheid brachten de Grieken veranderingen in het bloed in verband met ziekten. Afhankelijk van het soort ziekte scheidt afgenomen bloed zich in verschillende lagen. Ook aan de kleur van het bloed werd in dit verband belang toegekend. Het veel later in zwang geraakte aderlaten is ook een duidelijke uiting van de waarde die men hechtte aan een juiste samenstelling van het bloed, immers door het aderlaten werden volgens de toen heersende opvattingen schadelijke stoffen verwijderd.

In de geschiedenis is het meten van bepaalde stoffen in het bloed voor diagnostiek pas goed tot ontwikkeling gekomen door het besef dat bijna alle processen in het lichaam van chemische aard zijn. Het was François de la Boë Sylvius die in 1669 in Leiden als eerste in Europa een chemisch laboratorium aan een medische faculteit oprichtte. Niet veel later ontwikkelde Antonie van Leeuwenhoek in Leiden de eerste microscoop. Toch heeft het medische bloedonderzoek tot de twintigste eeuw moeten wachten voor het goed tot ontwikkeling kwam. Deze vertraging is gedeeltelijk toe te schrijven aan het feit dat de injectietechniek voor het toedienen van geneesmiddelen in 1853 ontwikkeld is en het was pas vele jaren later dat de injectiespuit algemeen beschikbaar kwam en ook gebruikt kon worden voor het verzamelen van bloedmonsters. Wanneer er bloed nodig was in grotere volumina dan verkregen kon worden door een vingerprik, was de procedure tot ongeveer 1920 om een vene vrij te prepareren en door venasectie werd dan bloed opgevangen. De andere vertragende omstandigheid voor de ontwikkeling van het bloedonderzoek was het grote monster dat vereist was. Zo was voor de bepaling van urinezuur rond 1920 nog 20-25 ml nodig (nu: 20-25 µl) en bovendien kostte een bepaling erg veel tijd (3 uur voor een bloedsuikerbepaling, nu 5 sec).

Sinds de tweede wereldoorlog heeft het bloedonderzoek een explosieve ontwikkeling doorgemaakt. Aan de ene kant is dat te danken geweest aan ontwikkelingen in de instrumentele analyse (de ontwikkeling van instrumenten die detectie anders dan met het blote oog of microscoop mogelijk maken, zoals vlamemissiefotometrie, atomaire absorptie, veel scheidingstechnieken zoals dunne laag-, gas-, en vloeistof-chromatografie en massaspectrometrie). Hierdoor heeft de vooruitgang in instrumentele analyse ook geleid tot verlaging van detectiegrenzen waardoor de ontwikkeling van microchemische methoden gestimuleerd werd. Hierdoor zijn veel analyses mogelijk in slechts enkele µl monster. Aan de andere kant heeft er een sterk doorgevoerde automatisering plaatsgevonden van het routine-bloedonderzoek. Er zijn nu apparaten beschikbaar waarmee in 300 monsters in één uur tijd 20 verschillende bepalingen inclusief dataverwerking gedaan kunnen worden.

Historisch overzicht

Enkele jaartallen

- 18000 v.C. Hart in mammoet juist geplaatst in grotbeschildering; Aurignacmens, Spanje
- 1000 v.C. Kleurverschil (tussen wat nu als arterieel en veneus bloed bekend is); Sumeriërs, Perzië
- 400 v.C. Afhankelijk van soort ziekte, scheidt afgenomen bloed zich in verschillende lagen (versnelde bezinkingssnelheid van eerst rode en dan witte cellen nu bekend als oorzaak); Polybus, schoonzoon van Hippocrates, Griekenland
- 1553 Bloed stroomt niet rechtstreeks van ene kamer naar andere, maar via longen, waar het helrood wordt door de voeding met ingeademde lucht; M. Servetius, Zwitserland; verbrand op brandstapel voor deze vinding
- 1649 Eerste poging tot bloedtransfusie; Rev. F. Potter, Engeland
- 1658 Rode bloedcellen ontdekt; J. Swammerdam, Nederland
- 1666 Geslaagde transfusie in hond en mens; R. Lower, Engeland
- 1674 Rode cellen geven bloed zijn kleur; hun doorsnede gemeten; A. van Leeuwenhoek, Nederland

- 1735 Eerste vermelding van bloedanalyses bij patiënten; B. Langrish, Engeland
- 1831 Eerste semi-kwantitatieve bepaling van anorganische elementen in bloed en ook van een organische component: ureum; W.O. 'Shaughnessy, Engeland
- 1851 Eerste echte kwantitatieve bepaling van een organisch bestanddeel van bloed: urinezuur; A.B. Garrod, Engeland
- 1878 Het kleuren van cellen uitgevonden; P. Ehrlich, Duitsland
- 1913 Bepaling van bilirubine in serum; Hymans v.d.Bergh, Nederland
- ± 1920 Toepassing van vele reeds bestaande methoden bij het bloedonderzoek o.a. creatinine (Jaffe, 1886), niet-eiwit stikstof (Kjeldahl, 1883), glucose (Fehling, 1848; Benedict, 1911, Folin & Wu, 1920), ureum (met urease, Van Slyke)
- 1930 Toepassing van de colorimeter voor bloedonderzoek
- ± 1945 Eerste bepalingen van enzymactiviteiten in sera (amylase, lipase, phosphatases)
- 1957 Eerste Autoanalyzer automaat voor bloedonderzoek, Skeggs, USA
- 1960 Toepassing van radio-immunologische methoden in het bloedonderzoek (sindsdien Ria's, Elisa's en Emit's) Yalow & Berson, USA
- 1968 Toepassing van "droge chemie" technologie in een teststrook voor semi-kwantitatieve bepaling van glucose in bloed
- In de tweede helft van de tachtiger jaren heeft combinatie van "droge chemie" en reflectiefotometrie er toegeleid dat kwantitatieve bepaling van bloedparameters, inclusief enzymen, mogelijk is op strips waar veel apparatuur in de praktijk op is gebaseerd.

Uit: Bloed (1968) p. 161-163, van Leo Vroman (1915-2014), bioloog, hematoloog en in Nederland vooral bekend als dichter.

Monstername en verwerking

Bloedafname dient zoveel mogelijk bij patiënten in rust te gebeuren en het beste is als het dier nuchter is. Zo kan er vlak na een maaltijd sprake zijn van een fysiologische hyperlipemie wat invloed kan hebben op een aantal bloedbepalingen. Gezien de bouw van hun maag-darmtractus, zijn de grote huisdieren echter over het algemeen moeilijk nuchter te krijgen. Het afnemen van bloed gebeurd bij de kleine huisdieren meestal uit één van de voorpoten (vena cephalica) of de hals (vena jugularis). Bij het paard wordt bloed vaak afgenomen uit de vena jugularis en bij het rund kan ook gebruik worden gemaakt van de vene onderaan de staartbasis. Juiste afname is belangrijk om hemolyse tijdens afname te voorkomen.

Het is belangrijk om een bloedmonster zo snel mogelijk te onderzoeken, omdat tijdens het bewaren veranderingen kunnen optreden. Hierbij kan gedacht worden aan het neerslaan van eiwitten of het afbreken van glucose door rode bloedcellen. Wanneer snel onderzoek niet mogelijk is, kunnen die veranderingen in het algemeen geremd worden door bepaalde antistollingsmiddelen (anticoagulantia) en/of afkoeling.

In zoogdieren is het totale bloedvolume ong. 7% van het lichaamsgewicht. Van het bloedvolume mag maximaal 10% worden afgenomen (7ml bloed per kg lichaamgewicht). Bij vogels, reptielen en kleine zoogdieren wordt een percentage van 1% van het lichaamsgewicht aangehouden, mits het dier niet in kritieke toestand is. Bij een rat van 500 gr, mag dus maximaal 5ml bloed worden afgenomen.

Afhankelijk van de bepaling kan naast volbloed ook alleen plasma of serum worden gebruikt voor de analyse. Plasma is de fractie van het bloed die geen cellen bevat. Zowel voor de analyse van volbloed als plasma, moet het bloed eerst onstolbaar worden gemaakt. Hierbij bevatten zowel bloed als plasma nog alle stollingseiwitten. Serum wordt bereid door het bloed goed te laten stollen en daarna af te draaien. Bij centrifugatie wordt al het vocht uit het stolsel geperst. Het supernatant bevat dan, evenals plasma, geen cellen meer, terwijl de stollingseiwitten in dit geval ook niet meer aanwezig zijn.

Het onstolbaar maken van bloed en plasma gebeurt door het toevoegen van een antistollingsmiddel (de meest gebruikte in de praktijk zijn heparine, EDTA, citraat en NaF). Welk antistollingsmiddel gebruikt wordt, hangt niet alleen af van wat er bepaald moet worden maar ook van de bepalingsmethode. Internationaal zijn er afspraken gemaakt over de kleur van de verschillende verzamelbuisjes. Er zijn vijf verschillende buizen beschikbaar met elk hun eigen kleur.

Heparine - groen

Heparine is een anticoagulans dat ook fysiologisch in het bloed voorkomt. Het bindt aan het eiwit antitrombine waardoor de stolling extra sterk wordt geremd. Deze antistolling kan niet meer ongedaan gemaakt worden. Omdat het geen interactie aangaat met elektrolyten of cofactoren is heparine goed bruikbaar voor de meeste biochemische bepalingen. Het monster kan direct na afname gecentrifugeerd en gepipetteerd worden voor de bereiding van plasma.

EDTA - paars

Voor hematologische bepalingen is het gebruik van EDTA als anticoagulans ideaal. Hierbij gaat het om de bepaling van de hematocriet (Ht), reticulocyten, thrombocyten, leuko's en differentiatie, maar ook voor de Coomb's en bloedgroep bepaling. EDTA vangt Ca^{2+} en andere bivalente kationen weg. Ca^{2+} is nodig om het stollingsproces te activeren, en dat kan door toevoeging van EDTA niet meer plaatsvinden. Door de interactie met kationen (die mogelijk ook co-factoren van eiwitten zijn) is EDTA veel minder geschikt voor biochemische bepalingen. Zeker voor de bepaling van calcium en elektrolyten is EDTA niet bruikbaar. Het is belangrijk om een EDTA buis ten minste voor 70% te vullen. Bij minder vullen zal het bloed hypertoon worden, waardoor de cellen krimpen. Dit leidt tot afname in Ht en de grootte van de erytrocyten (MCV) en een toename in de hemoglobineconcentratie van de erytrocyten (MCHC).

Citraat - blauw

Dit anticoagulans wordt met name gebruikt voor het onderzoek naar stollingstijden, stollingsfactoren en fibrinogeen. Citraat vangt Ca2+ en andere bivalente kationen weg. Door het toevoegen van een overmaat aan calcium is het effect omkeerbaar en kan de tijd gemeten worden tot wanneer er fibrine wordt gevormd. In het verleden werd altijd geadviseerd zo snel mogelijk na afname de stollingstijden te laten bepalen in de monsters. Het UVDL (Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium) heeft onderzoek gedaan waaruit is gebleken dat transport van niet-gekoelde monsters tot 48 uur na afname niet tot een andere klinische beslissing leidt m.b.t. tot de stollingstijden (PT en APTT) en de bepaling van het fibrinogeen en antithrombine gehalte. Ook bij het gebruik van citraat is het belangrijk om de bloedbuis voldoende te vullen

om zo de juiste concentratie citraat te garanderen. Bij een mindere vulling van de buis wordt het monster te veel verdund met vloeibaar citraat. Hierdoor kunnen de stollingstijden mogelijk verlengd zijn.

NaF - grijs

NatriumFluoride wordt gebruikt voor de bepaling van glucose en lactaat. Rode bloedcellen gebruiken glucose en zetten dit om in lactaat. Wanneer niet tijdig de glucose- en/of lactaatbepaling kan plaatsvinden, is het dan ook belangrijk om de enzymen van de glycolyse te remmen. NaF zorgt ervoor dat eiwitten denatureren en enzymen dus niet meer werkzaam zijn. Kleine hoeveelheden NaF zijn hierbij voldoende om de enzymen van de glycolyse te remmen. Om de stolling goed te kunnen remmen is naast NaF vaak nog een ander anticoagulans toegevoegd; meestal heparine. NaF is niet noodzakelijk wanneer het bloed ter bereiding van plasma of serum binnen een uur kan worden afgedraaid.

Serum - rood/bruin

Voor het bereiden van serum moet het afgenomen bloedmonster eerst 30 minuten met rust gelaten worden om te stollen (bij paard en rund vaak langer). Vaak is er materiaal aan de bloedbuis toegevoegd om de stolling te activeren. Andere buizen kunnen een gel bevatten die het scheiden van het serum en het stolsel makkelijker maakt. In serum kan heel goed het totale eiwitgehalte, albumine en het eiwitspectrum worden bepaald. Ook wordt serum vaak gebruikt in het onderzoek naar antistoffen. Na 30 minuten kan het monster worden gecentrifugeerd, waarna het serum afgepipetteerd kan worden. Wanneer het monster te vroeg wordt gecentrifugeerd kan er nastolling plaatsvinden en ontstaat er geleiachtig materiaal in het serum. Hieruit kan geen materiaal gepipetteerd worden voor een bepaling.

Bij bloedafname wordt veel gebruik gemaakt van een injectiesysteem en prefab buizen (venoject, vacutainer, etc.). Door de onderdruk in deze buizen lopen de buizen snel vol, wanneer het bloedvat op de juiste wijze is aangeprikt. Met name bij de grote dieren en bij het verzamelen van grotere bloedvolumes zijn deze prefab buizen handig in gebruik. Bij de gezelschapsdieren wordt echter vaak gebruik gemaakt van een standaard injectiespuit die de afnemer zelf vacuüm trekt tijdens afname. Het voordeel hiervan is dat met dezelfde hand zowel aangeprikt als aangezogen kan worden en er een hand vrij is om de kop of de poot extra te fixeren. Daarna moet het monster zo snel mogelijk, maar secuur overgebracht worden in de buis voor analyse of transport.

In de meeste prefab buizen zit een hoeveelheid antistollingsmiddel voor een aangegeven volume bloed (1, 2 of 5 ml). Zoals eerder aangegeven moet voor een goed te analyseren monster de op de buis aangegeven hoeveelheid bloed worden opgevangen. In de praktijk zie je nogal vaak dat de buizen maar voor een deel gevuld worden (gebeurt bijv. vaak bij katten vanwege problemen met de afname) zodat er relatief te veel antistollingsmiddel aanwezig is. Consulteer, vooral bij twijfel, het laboratorium waar de bloedmonsters worden geanalyseerd, over: noodzaak, aard en hoeveelheid van een antistollingsmiddel, het buistype, de bewaartemperatuur van de monsters, de bewaartijd van de monsters, de wijze van verzending etc..

Bloedanalyse apparatuur in de diergeneeskundige praktijk

De meeste bloedanalyse apparatuur in de diergeneeskundige praktijk is gebaseerd op droge chemie. Net als bij de chemische analyse van de urine, wordt er gebruik gemaakt van geïmpregneerde teststrips met reagentia. Deze reagentia kunnen enzymen zijn die bepaalde stoffen omzetten waardoor een kleuromslag plaatsvindt. Dit is de enzymatische substraatbepaling. Ook is het mogelijk dat een substraat is geïmpregneerd dat door de mogelijke aanwezigheid van enzym in het monster kan worden omgezet en een kleuromslag tot stand brengt. Op het moment dat het monster op de strip wordt gepipetteerd zullen de reagentia in het monster oplossen, waardoor een reactie en een kleuromslag kan plaatsvinden. Voor het verkrijgen van kwantitatieve gegevens wordt gebruik gemaakt van een fotometer, hetzij een spectrofotometer dan wel een reflectiefotometer.

Bloedanalyse apparatuur omvat moderne, geautomatiseerd systemen, waardoor vele handelingen en ook de berekeningen zijn komen te vervallen. In feite blijft alleen het verzamelen van het bloedmonster over, de rest tot en met het zichtbaar maken van de uitslag gebeurt door de reflectiefotometer. Bij de meeste moderne apparaten is het zelfs niet meer nodig om een hoeveelheid monster zelf op de teststrip te pipeteren. Met behulp van deze apparatuur is het mogelijk op zeer simpele wijze kwantitatieve bepalingen te verrichten van klinisch-chemisch relevante parameters.

Het is belangrijk om regelmatig aan kwaliteitscontrole te doen, waarbij ook materiaal gestuurd wordt naar een referentielaboratorium.

Enzymdiagnostiek

In de praktijk wordt veel gebruik gemaakt van bepaling van enzym-activiteiten. Deze testen zijn makkelijk uit te voeren met de substraat geïmpregneerde strips. Door op verschillende tijdstippen de kleuromslag te bepalen kan een maat gegeven worden voor de enzymactiviteit. Omdat niet de hoeveelheid van het enzym wordt bepaald, maar de activiteit, wordt de eenheid weergegeven in units/liter (U/l).

Van de talrijke enzymen, die in de cellen van een organisme voorkomen, wordt de hoeveelheid vrij constant gehouden door een evenwicht tussen synthese en afbraak. Door de fysiologische turnover van cellen komen voortdurend kleine hoeveelheden van deze intracellulaire enzymen in de extracellulaire ruimte terecht. Hun activiteiten kan men meten in het bloed. Deze activiteiten bewegen zich in "gezond bloed" binnen zeer nauwe grenzen.

Bij diverse ziekten treedt veel meer enzym uit de cellen van het aangetaste orgaan dan uit het gezonde orgaan. Bij een lichte beschadiging van de cel zullen alleen cytoplasmatische enzymen naar buiten treden. Mitochondriale en membraangebonden enzymen komen pas uit de cel bij ernstige beschadiging.

Er zijn bijna geen orgaan-(weefsel)-specifieke enzymen maar wel orgaan-typische enzympatronen, waaraan het orgaan (weefsel) kan worden herkend en van andere organen (weefsels) kan worden onderscheiden. Er zijn enzymen waarvan de gemeten enzymactiviteit

wordt veroorzaakt door verschillende isoenzymen. Isoenzymen katalyseren dezelfde reactie maar hebben verschillende fysisch-chemische eigenschappen waardoor ze van elkaar te scheiden (bijv. via electroforese) en te onderscheiden zijn. Voor de diagnostiek kan de bepaling van de isoenzymen belangrijk zijn omdat ook isoenzymen een eigen, specifieke verdeling hebben over weefsels. Een belangrijk voorbeeld in dit verband is het isoenzympatroon van lactaat dehydrogenase (LDH). In de eerstelijnspraktijk worden echter enkel activiteiten van enzymen bepaald en geen isoenzympatronen.

De stijgingen en evt. latere dalingen van intracellulaire enzymactiviteiten in bloed verlopen voor de verschillende enzymen niet parallel. De duur van de verhoging van een bepaalde enzymactiviteit in het bloed is afhankelijk van een verscheidenheid aan factoren die per enzym verschillen: molecuulmassa, intracellulaire lokalisatie, snelheid van klaring uit het bloed, concentratiegradiënt over het plasmamembraan en snelheid van enzyminactivering (halfwaardetijd) in het bloed. Vaak stijgt de activiteit van het ene enzym nog terwijl een andere enzymactiviteit al weer dalende is. Ook om deze reden kan men niet volstaan met het bepalen van de activiteit van één enzym. De kans bestaat dan dat een vrij normale waarde gevonden wordt, terwijl andere enzymen op dat tijdstip wel verhoogd kunnen zijn. Het verdient dus de voorkeur meer dan één enzym te bepalen op hetzelfde tijdstip.

Belangrijk is om na te gaan welke enzymen specifiek zijn voor het orgaan van de diersoort die onderzocht wordt. Het enzympatroon per diersoort kan nogal verschillen. Zo zijn de enzymen aspartaat aminotransferase (AST) en alanine aminotransferase (ALT), die een rol spelen in het eiwitmetabolisme, specifieker voor een leverprobleem bij carnivoren dan bij herbivoren.

Omdat de in het bloed vrijkomende enzymen niet tegelijkertijd hun maximale activiteit bereiken, kan door op opeenvolgende dagen enzymactiviteiten te meten een goed inzicht worden gekregen in de ernst van de beschadiging en eventueel wat de prognose is. Daarnaast kan regelmatige bepaling tijdens de behandeling van een patiënt een indruk geven of een therapie succesvol is.

Belangrijk is om te beseffen dat een orgaan dusdanig ernstig aangetast kan zijn dat de enzymsynthese sterk verlaagd is. Men zal dan in het bloed een normale of zelfs een verlaagde enzymactiviteit kunnen vinden.

Voorbeelden van analysemogelijkheden in de praktijk.

Metabolieten/produkten	*Enzymactiviteiten*	*Eiwitten*
Creatinine	ALT	Albumine
Glucose	Amylase	Fructosamines
Lactaat	AP	Globulines
Totaal bilirubine	AST	Totaal eiwit
Ureum	Creatine kinase	
Urinezuur	GGT	
	LDH	

Intermezzo: Glucosetolerantietest en glucosebepaling.

Obesitas komt bij steeds meer verschillende diersoorten voor. Het probleem van overgewicht is een verhoogd risico op een scala aan ziektebeelden. Zo zien we bij de kat o.a. een verhoogd risico op de ontwikkeling van diabetes mellitus type 2 (DM2) en bij het paard op het ontstaan van het equine metabool syndroom (EMS). Dit laatste vergroot de kans op het ontwikkelen van hoefbevangenheid.

Bij zowel DM2 als EMS is er sprake van een lagere gevoeligheid voor insuline (insuline resistentie). Normaal gesproken komt insuline vrij uit de β-cellen van de pancreas wanneer de bloedglucoseconcentratie is verhoogd. Glucose kan dan via GLUT-2 worden opgenomen in de β-cel en zal daar via glycolyse worden omgezet, waarbij ATP gevormd wordt. Dit ATP zorgt ervoor dat ATP-gevoelige-K^+-kanalen worden geblokkeerd. Hierdoor depolariseert het celmembraan van de β-cel en worden spanningsafhankelijke Ca^{2+}-kanalen geopend. Vervolgens stroomt Ca^{2+} de cel in en neemt de concentratie in het cytosol toe. Dit zorgt er vervolgens voor dat secretoire granulae met insuline fuseren met het plasmamembraam en dat insuline vrij komt in het bloedplasma. Op dit vrijkomen van insuline volgt synthese van nieuw pro-insuline in het ruw endoplasmatisch reticulum. Dit pro-insuline wordt in het Golgi verpakt en de ontstane granulae komen achter elkaar te liggen tussen de microtubuli en microfilamenten en worden vervolgens langzaam afgegeven. De afgifte van insuline is een bifasisch proces.

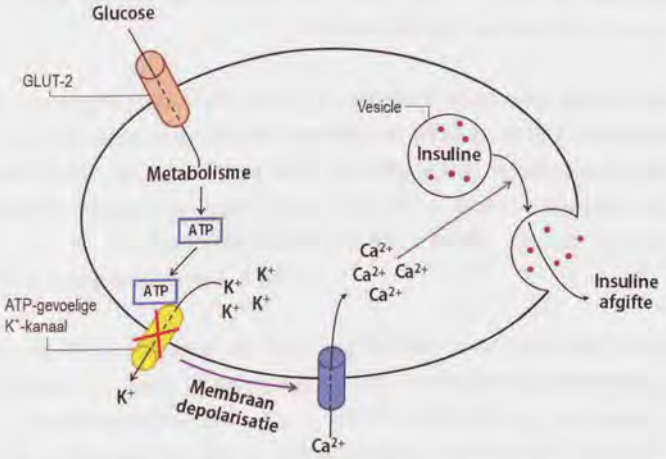


Fig. 1 *De afgifte van insuline, door de β-cellen van de pancreas, als reactie op een verhoogde bloedglucoseconcentratie.*

Vrijgekomen insuline zorgt voor de translocatie van GLUT 4 naar de celmembraan in spier- en vetweefsel. Daarnaast stimuleert insuline de afbraak van glucose in de lever en de synthese van glycogeen in lever en spieren. Wanneer er sprake is van insulineresistentie en insuline geen signaal door kan geven aan de weefsels, wordt glucose veel minder opgenomen en verwerkt door verschillende weefsels. Hierdoor duurt het veel langer voordat de glucosecontratie na een maaltijd weer op basaal niveau is.

Wanneer we bij een gezond paard oraal 1 gr/kg glucose toedienen, vinden we tussen 1 en 2 uur na toediening een glucosepiek. Iets later volgt de insulinepiek; tussen 1,5 en 2 uur na toediening van glucose. Na 4 uur zal de glucoseconcentratie weer terug zijn op het

basaalniveau.

Door middel van een orale glucose tolerantie test (GTT) kan bij paarden, naast de opname van glucose door de darm, de insulinegevoeligheid worden bepaald. Hiervoor moet een paard eerst 6 uur vasten, waarna bloed wordt afgenomen om glucose en eventueel het insuline-niveau te bepalen. Vervolgens wordt oraal 1 gr/kg glucose via een sonde in de maag van het dier gebracht. Daarna wordt op verschillende tijdstippen weer bloed afgenomen voor de bepaling van glucose en evt. insuline (t = 30, 60, 90, 120, 180, 240 en 300 minuten na toedienen glucose).

Om glucose in het bloed te bepalen kan gebruik gemaakt worden van kleine handmetertjes. Deze kleine metertjes geven binnen een paar seconde resultaat door een stripje met een minimale druppel bloed (ongeveer 0,5 µL) in het apparaat te plaatsen. Op de teststrip is het enzym glucose-oxidase geïmpregneerd. Tijdens de reactie met glucose worden elektronen overgedragen waardoor een zwakke elektrische stroom ontstaat. De sterkte van de stroom geeft aan hoeveel glucose het plasma bevat.

Deze handzame glucosemeters zijn ook prima door eigenaren van honden of katten met DM te gebruiken om de glucosespiegel bij hun dier te monitoren. Belangrijk om te weten is dat de verschillende glucosemeters vaak geijkt zijn voor hoge glucoseconcentraties. Hierdoor zijn ze onbetrouwbaar in het lage gebied.

Fig 2 *Kleine bloedglucosemeter*

Bij de kat wordt geen gebruik gemaakt van een orale GTT om de diagnose DM2 en daarmee verminderde gevoeligheid voor insuline vast te stellen. Wanneer er sprake is van DM2 is de nierdrempel al overschreden en is de glucoseconcentratie in het bloed ook tijdens vasten verhoogd. Een enkele glucosebepaling in gevaste toestand in combinatie met de bepaling van de fructosamines is dan voldoende.

HET HEMATOLOGISCH BLOEDONDERZOEK

Inleiding

Naast veranderingen in het plasma bij ziekte zijn veranderingen in de celfractie minstens zo belangrijk voor de diagnostiek. Met de bepaling van de hematocriet is heel makkelijk te bepalen in hoeverre de fractie rode bloedcellen is toe- of afgenomen. Door te kijken naar de morfologie van de rode bloedcellen en het aantal reticulocuten kunnen uitspraken worden gedaan over de status van regeneratie van rode bloedcellen. Ook de samenstelling van witte bloedcellen en de verhouding tussen de verschillende witte bloedcellen kan iets zeggen over de gezondheidstoestand van een dier. Onderscheid kan hiermee gemaakt worden tussen verschillende vormen van ontstekingsprocessen. Met eenvoudige kleuringsmethodes en een goede microscoop is het vrij eenvoudig om dit onderzoek zelf in de praktijk uit te voeren. Essentieel is daarbij wel dat het maken van een bloeduitstrijkje op een juiste manier wordt uitgevoerd en er gedegen kennis is van de vorming van de rode bloedcellen en de witte bloedcellen en hun reactie op ziekte.

In dit hoofdstuk zal in eerste instantie de theoretische achtergrond worden behandeld waar gebruik van wordt gemaakt in geavanceerde laboratoria. Daarnaast wordt uitgebreid stilgestaan bij de technieken die in de praktijk zelf kunnen worden uitgevoerd.

Onderzoek van de bloedsamenstelling (Hb en Ht)

Evaluatie van de erytrocytaire massa in de bloedbaan

De meest praktische methode om inzicht te krijgen in de massa erytrocyten in de bloedbaan is bepaling van de hematocriet (Ht) waarde of de hemoglobine (Hb) concentratie van een veneus bloedmonster.

De hemoglobinebepaling

Voor de bepaling van het Hb-gehalte onder praktijkomstandigheden is een aantal apparaten in de handel dat op verschillende manieren (colorimetrie, spectrofotometrie of reflectometrie) het Hb-gehalte bepaalt. Dergelijke apparatuur is ook vaak ingericht voor het bepalen van een groot aantal verschillende klinisch-chemische bepalingen zoals in het hoodstuk hemoanalyse te zien is.

De hematocrietbepaling

Onder de Ht verstaan we het volumepercentage rode cellen in een veneus bloedmonster. De Ht wordt bepaald door onstolbaar gemaakt veneus bloed af te centrifugeren onder gestandariseerde condities in een hematomicrocapillair en de lengte van de kolom van de rode bloedcelpellet te vergelijken met de lengte van de gehele bloedkolom.

De Ht wordt gebruikt om een oordeel te krijgen over de lichaamshematocriet. Een te lage Ht is diagnostisch voor anemie, een te hoge Ht diagnostisch voor dehydratie of polycythemie. Men dient zich altijd te realiseren dat een Ht slechts de volumeverhouding cellen/totaal bloed

aangeeft en niets zegt over absolute volumes. Een normale Ht is daarom geen bewijs voor een normaal erytrocytenvolume of normaal plasmavolume. Men dient zich altijd te realiseren dat het Ht slechts de volumeverhouding rode bloedcellen ten opzicht van het totaal bloedvolume in de circulatie aangeeft. De Ht bepaling direct na een ernstige bloeding hoeft bijvoorbeeld niet afwijkend te zijn, terwijl zowel het bloedvolume als het erytrocytenvolume drastisch gedaald is.

In de praktijk kan de Ht snel en betrouwbaar worden vastgesteld met behulp van onstolbaar gemaakt veneus bloed dat in duplo in een microcapillair van glas wordt afgedraaid in een microcentrifuge. De meeste microcapillairen hebben slechts een inhoud van 75 µl. Daarom is het belangrijk dat het bloedmonster kort van te voren goed gemengd wordt door middel van zwenken. Onvoldoende zwenken kan leiden tot een grotere fractie plasma of rode bloedcellen in het capillair. Het gemeten Ht is dan niet representatief voor het desbetreffende dier. De microcapillairen moeten in duplo worden gevuld en afgecentrifugeerd.

N.B. Door toename van het leukocytengehalte in een bloedmonster (b.v. patiënt met ontsteking) kan een wit laagje cellen boven op de kolom van rode cellen zichtbaar zijn. Deze zogehete "buffy coat" wordt niet meegerekend in de Ht-bepaling.

Fig. 1a *Hematocrietcentrifuge*

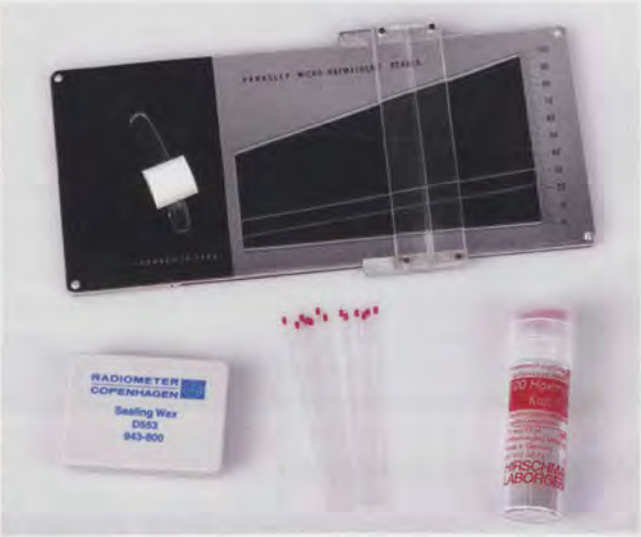


Fig 1b *Microcapillairen, kleien, afleesliniaal*

Uitvoering: Ht bepaling

- Zwenk het EDTA bloed.

Zwenken betekent het buisje een aantal maal onderste boven houden, zodat het bloed goed gemengd wordt. Rondcirkelen zonder het buisje ondersteboven te houden is niet goed.

- Houdt het capillair met één uiteinde in het EDTA bloed en vul de capillair tot ongeveer ¾.

Dit gaat het beste door de capillair zoveel mogelijk horizontaal te houden.

- Veeg de buitenkant van de capillair af voordat deze in de klei wordt gebracht.
- Sluit één uiteinde af met klei.

Het beste is om de capillair horizontaal te houden en de klei vertikaal.

- Vul een tweede capillair voor een duplo bepaling.
- Leg de capillairtjes met klei naar buiten in de centrifuge.
- Zorg ervoor dat de centrifuge in balans is door de capillairen tegenover elkaar te leggen.
- Onthoud de plaatsnummers van de capillairtjes wanneer er meerdere monsters tegelijkertijd worden afgedraaid.
- Plaats de deksel op de centrifuge!
- Zet de centrifuge aan.
- Lees na centrifugeren de hematocriet af:
  - Plaats de 0% lijn en de 100% lijn op de juiste overgangen.
  - Lees de hematocriet af door de meetlijn boven de rode cellen te leggen en niet boven de buffycoat.

Het tellen van leukocyten

Hematologische celtellingen worden regelmatig toegepast tijdens het diagnostisch proces. E zijn verschillende methoden en technieken om het aantal leukocyten en de verschillend subpopulaties, erytrocyten, reticulocyten en trombocyten te bepalen. Voor het bepalen van ee celconcentratie dient het volume waarin geteld wordt, bekend te zijn. Onder de microscoo kan in een bloeduitstrijkje hooguit een schatting van het aantal cellen gemaakt worden. I een veterinair diagnostisch laboratorium wordt naast een elektronische meting waarbij he celgetal gemeten wordt ook microscopisch onderzoek verricht door een ervaren veterina hematologisch analist. Door middel van microscopisch onderzoek is bij afwijkende morfologi van de cellen dit betrouwbaarder vast te stellen dan door een elektronisch instrument.

Voor de veterinaire praktijk zijn verschillende elektronische instrumenten beschikbaar. In dat geval is de dierenarts zelf verantwoordelijk voor de kwaliteit van de verkregen uitslagen. Het uitvoeren van hematologisch onderzoek in een humaan ziekenhuis wordt afgeraden, aangezien er grote diersoortverschillen bestaan.

Hieronder staan een aantal hematologie instrumenten en hun meetmethoden beschreven.

Telkamer/ hemocytometer

Voor een historisch besef wordt de telkamer als eerste genoemd als methode om cellen te tellen onder de microscoop. Een ruitpatroon geslepen in het glas van de telkamer draagt bij aan de systematiek en voorkomt dat cellen dubbel geteld worden. Celtellingen worden uitgedrukt als aantal cellen per volume eenheid, meestal # x 10^9/L voor trombocyten en leukocyten en # x 10^{12}/L voor erytrocyten. De verdunning van het monster en het volume van de telkamer zijn bekend zodat na de telling de celconcentraties berekend kunnen worden. Deze methode is arbeidsintensief en door de komst van elektronische instrumenten wordt deze methode nauwelijks nog in de praktijk toegepast. Echter voor bijzondere diersoorten zoals vogels en reptielen is dit de enige methode, aangezien elektronische instrumenten kernhoudende erytrocyten niet kunnen onderscheiden van leukocyten.

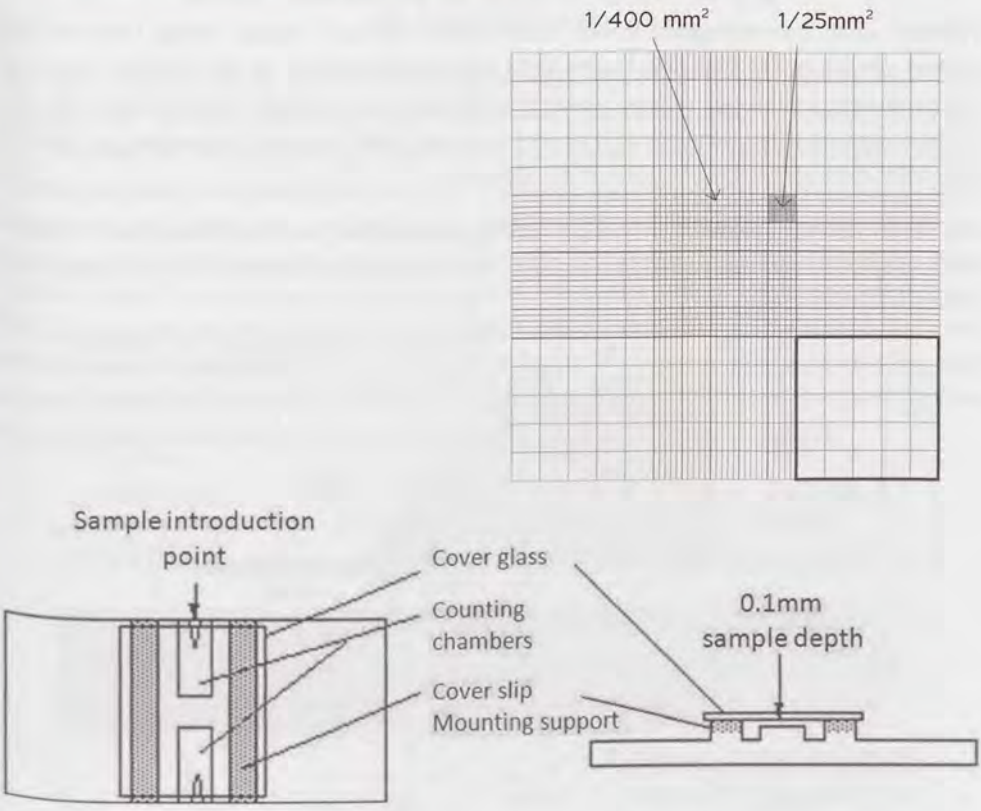


Fig. 2 *Hemocytometer met telkamer (boven)*

Microcapillair methode/ Quantitative Buffy Coat analysis QBC

Bij de microcapillair methode is het principe van de hematocriet meting uitgebreid om naast erytrocyten ook leukocyten en trombocyten te bepalen. Met deze methode wordt door verschil in (soortelijk) gewicht onderscheid gemaakt tussen verschillende typen leukocyten. Een klein kunststof staafje, toegevoegd aan een gecoate microcapillair, zorgt ervoor dat de verschillende bandjes in de buffycoat breder worden (zie fig. 3).

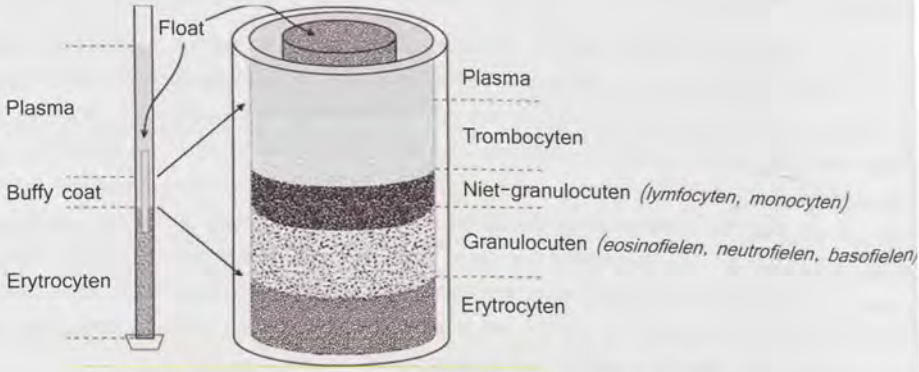


Fig. 3 *Differentiatie door middel van de microcapillair methode*

Volbloed wordt gecentrifugeerd in een microcapillair met een coating, welke DNA en RNA eiwitten aankleurt. De gemeten fluorescentie wordt weergegeven in een grafiek, waarin de overgang naar een ander celtype wordt weergegeven door hellings-veranderingen (fig. 4). Op basis van gemeten bandbreedtes wordt het aantal cellen berekend uitgaande van normale celgrootte zoals die zijn opgeslagen in de software.

Leukocyten worden verdeeld in twee groepen, granulocyten en niet-granulocyten. Daarom wordt gesproken van een 2-part differentiatie. Voor een verdere differentiatie is microscopisch onderzoek noodzakelijk.

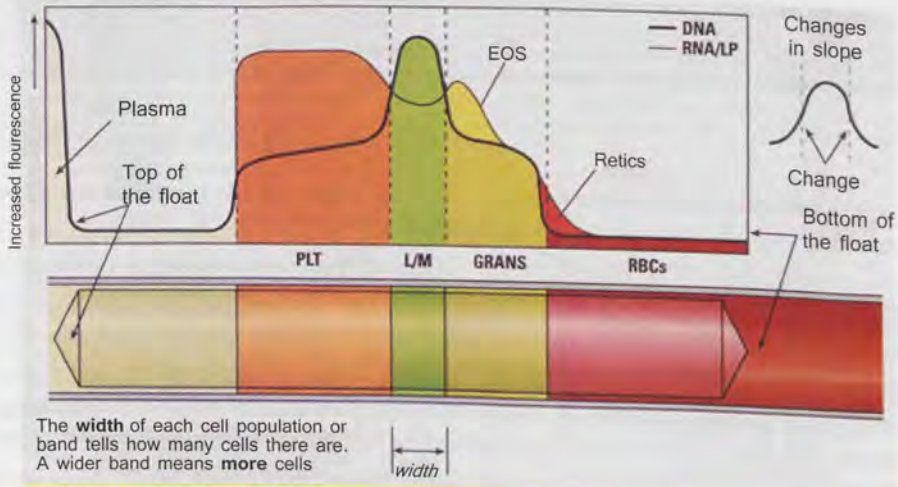


Fig. 4 *Kleuring van DNA en RNA en relatie tot celtype*

Impedantie-principe (histogrammen)

Bij het impedantie principe wordt gebruik gemaakt van het feit dat een cel een minder goede geleider is dan een elektrolytenoplossing. In instrumenten die meten volgens dit principe wordt spanning aangebracht over twee van elkaar gescheiden kamers, die in verbinding staan d.m.v. een nauwe opening. Het bloedmonster wordt verdund en cellen worden door de opening gepompt. Cellen, die door de opening gaan geven een verandering in de stroom door hun weerstand (impedantie, fig. 5). Elke verandering in het spanningsveld wordt geteld als een cel, en de mate van verandering geeft informatie over de grootte van de cel.

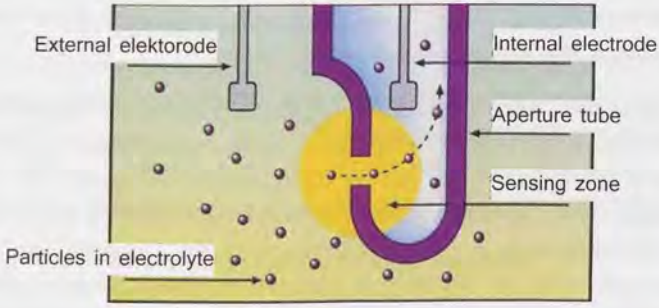


Fig. 5 *Impedantie principe*

Voor de leukocytentelling (WBC) worden erytrocyten in een deel van het monster eerst gelyseerd en hemoglobine (HGB) wordt vervolgens spectrofotometisch bepaald. Op basis van celgrootte worden aantallen per soort leukocyt gegeven in een volumehistogram (fig. 6). Bij deze methode wordt gesproken van een 3-part differentiatie, omdat er onderscheid wordt gemaakt tussen lymfocyten, monocyten en granulocyten. Kernhoudende erytrocyten lyseren echter niet en worden valselijk geteld als leukocyten. Een ander deel van het monster wordt isotoon verdund voor de bepaling van het aantal erytrocyten (RBC), het aantal trombocyten (PLT), het mean cellular volume (MCV) en het mean platelet volume (MPV). Hiervan wordt ook een volumehostogram gemaakt. Uit het RBC en het MCV wordt de hematocriet berekend volgens: MCVx[RBC]/10, uitgedrukt als L/L. Het HGB en het RBC wordt gecombineerd om de gemiddelde hemoglobine per erytrocyt (MCHC) te berekenen.

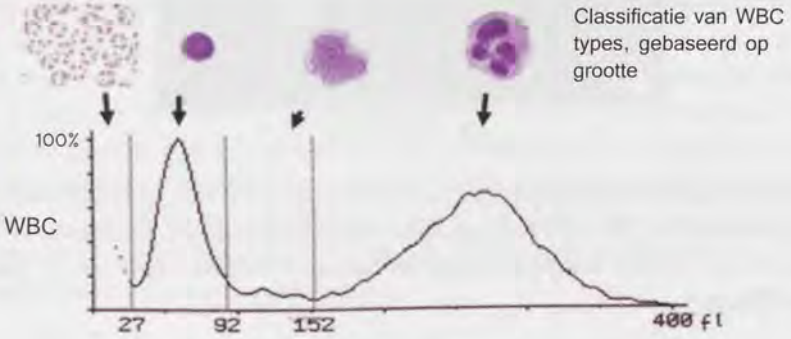


Fig. 6 *Impedantie histogram*

Laser cell counter (scatterplot)

In het Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium (UVDL) worden hematologische bepalingen zoals WBC, PLT, Ht, MCH, MCV, MCHC, Hb gehalte per erytrocyt (MCH) en reticulocyt (CHr) uitgevoerd met een laser cell counter. Er zijn ook een aantal instrumenten beschikbaar voor gebruik in de praktijk. Het principe van een dergelijke analyzer berust op de verstrooiing van licht door elke individuele cel die de laser passeert. Verstrooid licht wordt door, onder verschillende hoeken geplaatste, detectoren gemeten. Per cel wordt informatie verkregen over grootte, eigenschappen van het cytoplasma en de kern. In scatterplots (fig. 7) worden celeigenschappen tegen elkaar uitgezet en verschillende celtypen zijn als afzonderlijke populaties te herkennen. Er kan ook een kleurstof worden toegevoegd in het meetkanaal om subpopulaties van cellen specifiek aan te kleuren.

In onderstaande figuur ziet u het scatterplot van het kanaal waaraan de kleurstof peroxidase is toegevoegd. Op de y-as is het volume weergegeven op de x-as de absorptie van peroxidase. Elke leukocyt wordt weergegeven als stip in de scatterplot en omdat elk type leukocyt andere eigenschappen heeft, worden populaties zichtbaar van hetzelfde type cellen. De laser cell counter kan de leukocyten in 5 subpopulaties verdelen. Op basis van berekeningen die uitgevoerd worden door de bijgeleverde software worden scheidingslijnen tussen de verschillende celpopulaties getrokken. De locatie van de scheidingslijnen is diersoortspecifiek.

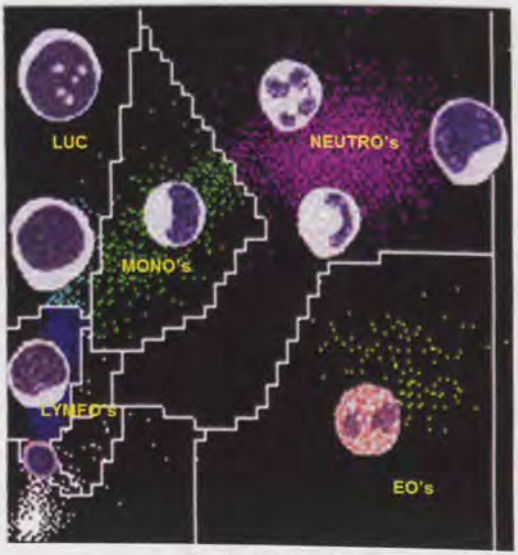


Fig. 7 Scatterplot

Deze gespecialiseerde instrumenten zijn zeer precies en accuraat. Toch blijft microscopisch onderzoek noodzakelijk, bijv. voor het detecteren van bloed parasieten, een linksverschuiving en kernhoudende erytrocyten. Daarnaast is het een belangrijk controle middel van de elektronisch verkregen uitslagen.

Morfologisch onderzoek van het bloed

Voor het morfologisch routineonderzoek van bloedcellen is het noodzakelijk een druppel bloed onder de microscoop te bekijken. In de praktijk zijn er drie methoden die vaak ingezet worden in de praktijk:

(i). bestudering van cellen in een druppel onstolbaar gemaakt bloed (natief preparaat).

(ii). bestudering van cellen die na fixeren met kleurstoffen zijn bewerkt (dus na afsterven).

(iii). bestudering van cellen in een druppel bloed waaraan z.g. vitaalkleurstoffen zijn toegevoegd.

(i) Het natieve preparaat

Het microscopisch bestuderen van de cellen in een druppel ongekleurd bloed wordt in de diergeneeskunde weinig toegepast. Het kan soms informatie geven over spontane agglutinatie (samenklonteren) van cellen. Ook kunnen beweeglijke bloedparasieten die vrij in het plasma voorkomen (b.v. trypanosomen en microfilaria), op deze wijze snel worden aangetoond. Het bloed dient *lege artis* in anticoagulans te worden opgevangen en uitgestreken.

(ii) Het gefixeerde en gekleurde bloeduitstrijkje

Voor gedetailleerde bestudering van het witte en rode bloedbeeld wordt bloed uitgestreken op een vetvrij voorwerpglaasje en wordt gefixeerd (dwz. voorkomen dat bederf optreedt) met methylalcohol en met een of meer kleurstoffen gekleurd.

De beste resultaten worden verkregen wanneer de juiste hoeveelheid bloed wordt opgevangen in een buisje met EDTA en binnen enkele uren wordt uitgestreken. Een te hoge EDTA concentratie doet de cellen schrompelen, te weinig veroorzaakt stolling. Andere anticoagulantia lenen zich minder goed voor dit doel, omdat ze een ongunstige invloed hebben op de celmorfologie.

De uitstrijkjes kleuren het fraaist kort na uitstrijken en fixeren maar kunnen zelfs in ongefixeerde staat meestal na weken nog met succes gefixeerd en gekleurd worden, mits in een droge, koele omgeving bewaard.

Het *lege artis* uitstrijken is van cruciaal belang voor een goede beoordeling. In te dikke bloedfilms zullen de cellen over elkaar heen liggen waardoor de morfologie niet goed te zien is. Bovendien zullen dikke preparaten te langzaam drogen. De zoutconcentratie in het plasma wordt dan langzaam hoger zodat het plasma hypertoon wordt t.o.v. de cellen. De cellen zullen daardoor water gaan verliezen en schrompelen (doornappelvorm van erytrocyten). Uitstrijkjes van onregelmatige dikte zullen ongelijkmatig kleuren en bovendien een onregelmatige verdeling van de witte bloedcellen vertonen. Een verstoord verdelingspatroon ontstaat ook wanneer het preparaat te dun is, of wanneer de bloedfilm niet in een korte brede staart eindigt doch in talrijke "tongetjes" uitloopt. Het blijkt dat in dergelijke preparaten de leukocyten aan de rand of aan het eind van het uitstrijkje samenklonteren.

Uitvoering: bloeduitstrijkje

- Gebruik liefst voorwerpglaasjes met een gematteerd uiteinde en beschrijf deze met potlood (naam of nummer patiënt, evt. datum).

N.B.: *Het op de juiste manier merken is essentieel om de preparaten niet te verwisselen. Verwisseling van preparaten is een van de ernstigste oorzaken van een "misdiagnose". Voorwerpglaasjes die niet gematteerd zijn, kunnen niet goed gemerkt worden. Normaal glas is niet te beschrijven, viltstift lost op en etiketjes laten los in de alcohol. Op het gematteerde glas moet met potlood worden geschreven. Inkt lost op in alcohol.*

- Leg van te voren een voorwerpglaasje klaar met het gemarkeerde uiteinde naar rechts (indien u rechts bent) op een wit vel papier, zodat u goed kunt zien wat u doet.
- Zwenk het EDTA bloed goed (minstens 15 sec.).

Zwenken betekent het buisje een aantal maal ondersteboven houden, zodat het bloed goed gemengd wordt.

- Werk netjes en schoon. Zorg dat er geen bloed op ander objecten komt te zitten dan op het glaasje.
- Breng met een capillair een druppel bloed van juiste grootte op een objectglas.
- Fixeer met één hand (links voor rechtshandigen) het objectglas; deze hand dient het uitstrijken niet te hinderen.
- Plaats met de andere hand een dekglaasje op het voorwerpglas met de druppel bloed en beweeg dit glaasje in de richting druppel (zie fig 8).
- Let daarbij dat de kleinste hoek, ongeveer 45 graden, zich bevindt aan kant van druppel bloed.
- Beweeg het glaasje tegen de druppel bloed aan en wacht tot dit glaasje in de breedte gevuld is met bloed.

De bloeddruppel dient met het glaasje te worden meegetrokken en NIET vooruitgeschoven.

- Strijk uit in een vloeiende/gelijkmatige beweging.
- Niet vloeiend uitstrijken van bloed leidt tot dwarse strepen en te hard drukken leidt tot lengtestrepen.
- Houdt met het dekglaasje/tweede voorwerpglaasje voortdurend contact met het onderste glaasje tijdens uitstrijken.

- Het bloed dient volledig te zijn uitgestreken vóór het einde van het objectglas en het bloed dient ten minste tot over de helft van het glaasje te zijn uitgestreken.
- Herhaal zo nodig de handeling tot het gewenste resultaat is bereikt.

N.B.: *Uiteindelijk moet er een bloeduitstrijkje gemaakt worden, dat de vorm heeft van een vlam. De vlam mag het uiteinde van de glasrand niet raken. Daarnaast is het belangrijk dat bij het maken van een bloeduitstrijkje de bloedcellen niet tussen het voorwerpglaasje en het dekglaasje vermalen worden!*

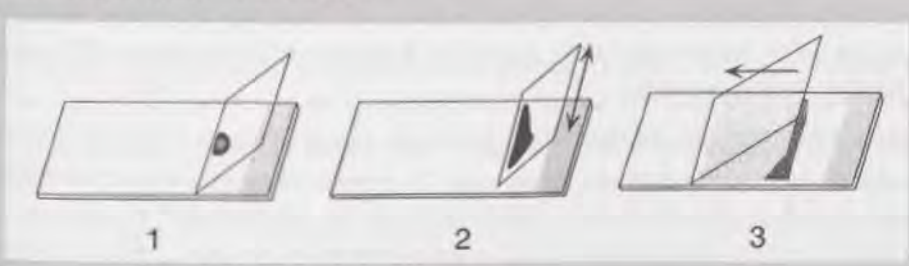


Fig. 8. *Het uitstrijken van bloed.*

De kleuring van bloeduitstrijkjes

Voor kleuring van het preparaat bestaan verschillende methodes. In Europa wordt vooral de kleuring vlgs. May-Grünwald Giemsa (MGG) gebruikt. Deze wordt in twee fasen uitgevoerd en geeft een mooi kleurenspectrum maar is relatief tijdrovend. In de praktijk worden daarom ook wel zogenaamde "snelkleuringen" toegepast. Deze geven over het algemeen wat minder details maar kunnen wel gebruikt worden mits men er vrij veel ervaring mee heeft. Om de verschillende morfologische kenmerken goed te leren kennen is het daarom raadzaam eerst ervaring op te doen met de MGG-methode.

Bij de MGG-kleuring wordt gebruik gemaakt van de eigenschap dat de eiwitten en andere celbestanddelen, zeer verschillende affiniteit vertonen ten opzichte van neutrale, basische en zure kleurstofcomponenten, die uit bepaalde kleurstofzouten (methyleen-eosinaat) kunnen ontstaan. Alles wat met de basische componenten blauw kleurt heet basofiel, alles wat met de zure componenten oranje-rose kleurt eosinofiel en wat met de neutrale componenten violet kleurt (tussenkleur) neutrofiel. Chromatofiel is datgene wat met een basische component (methyleen-azuur) rood kleurt (kernsubstanties, azuurgranula).

Het resultaat van de kleuringsprocedure hangt nauw samen met de kleuringstijden en vooral met de pH van de buffervloeistof. Een onjuiste pH is de belangrijkste oorzaak van "mis-kleuringen". Te blauwe kleur ontstaat bij hoge pH, rode bij lage. Te kort kleuren resulteert in bleke preparaten. Vage preparaten kunnen echter ook een gevolg zijn van onjuiste kleurstof-verdunning of van te lang naspoelen.

(iii) De vitaalkleuring (bijv. reticulocyten kleuring)

Wanneer een druppel onstolbaar bloed in contact komt met een kleurstof als brilliant cresyl blauw (BCB), dan zal deze kleurstof in de cellen doordringen en daar met eventueel aanwezig RNA een precipitaat vormen. Deze kleuring wordt in de eerste plaats toegepast om reticulocyten microscopisch zichtbaar te maken. Dit zijn jonge erytrocyten die nog een restant RNA bevatten. De telling van het aantal reticulocyten in een perifeer bloedmonster geeft een kwantitatieve indicatie van de erythropoëtische activiteit van het beenmerg. Onder normale omstandigheden is het aantal reticulocyten <2%. Na bloedafbraak of bloedverlies zal een gezond beenmerg reageren met verhoogde produktie van erytrocyten en uitstoot van jongere cellen. Het aantal reticulocyten neemt daarom na 4 dagen toe. Dit kan met de BCB-kleuring gemakkelijk vastgesteld worden.

Ook Heinz-bodies kleuren met BCB diep blauw. Heinz-bodies zijn kleine, ronde, soms hoekige insluitlichaampjes aan de rand van de erytrocyt. Ze bestaan uit gedegenereerd hemoglobine. In het vlgs. May-Grünwald Giemsa gekleurde preparaat (de standaard kleuring voor het beoordelen van het witte bloedbeeld) zijn ze niet of nauwelijks zichtbaar, omdat ze met deze kleuring niet aankleuren. Heinz-bodies worden bij onze huisdieren wel gezien onder bepaalde pathologische omstandigheden o.a. na intoxicaties en na toediening van fenothiazine. Bij de kat kunnen onder fysiologische omstandigheden in 5 à 10% van de erytrocyten Heinz-bodies aangetroffen worden. Na splenectomie kan het aantal cellen met Heinz-bodies bij deze dieren sterk toenemen.

Uitvoering: vitaalkleuring met brilliant cresyl blauw (1% BCB in 96% alcohol).

Een druppel BCB wordt op een voorwerpglaasje gebracht, waarna een tweede voorwerpglaasje in de lengterichting wordt geplaatst met de matrand aan de andere kant. Door aan de matranden de glaasjes in tegenovergestelde richting van elkaar af te trekken ontstaan er twee glaasjes met een dunne film BCB kleuring.

De alcohol is na 30 seconden verdampt zodat een dunne film kleurstof op het glaasje achterblijft. Hierop wordt vervolgens een minuscuul klein druppeltje bloed gebracht. Een te grote druppel leidt tot klontering van erytrocyten en slechte kleuring. Vervolgens wordt op het druppeltje een dekglaasje gelegd en dit wordt even aangedrukt (met de nagel om vastplakken aan de vinger te voorkomen). De cellen verspreiden zich hierdoor gelijkmatig onder het dekglaasje. Het preparaat kan vervolgens met het olie-immersie objectief onder het microscoop worden bekeken. Het aantal reticulocyten per 1000 erytrocyten wordt door telling vastgesteld.

Beoordeling van het witte bloedbeeld

Leukocytendifferentiatie

Bij het differentiëren van de verschillende witte bloedcellen worden als regel 100 cellen geclassificeerd. (Voor de morfologische kenmerken van de verschillende leukocyten zij verwezen naar de bijbehorende foto's). Men bekijkt dus hoeveel procent van de witte cellen lymfocyten, monocyten, metamyelocyten, staafkernige neutrofiele, segmentkernige neutrofiele, eosinofiele en basofiele granulocyten zijn. Ook blasten, plasmacellen en niet te determineren cellen worden apart genoteerd.

Soms kunnen sommige cellen niet meteen thuis gebracht worden, maar wel wanneer men eenmaal een indruk van het totale bloedbeeld heeft. Bij een linksverschuiving van het witte bloedbeeld kan men bijvoorbeeld ook de in het perifere bloed zeldzame metamyelocyten verwachten.

Monocyten hebben een "amoeboïde" (beweeglijke) kern. In een gefixeerd bloeduitstrijkje is de vorm van de kern van een monocyt afhankelijk van de vorm van de kern op het moment van fixatie en kan dus van cel tot cel sterk variëren. Karakteristieke kernvormen zijn halter- en klaverbladvorm en een ruwe boonvorm waarvan de randen, niet zoals bij de staafkernige granulocyt, precies evenwijdig lopen maar wat uitbochtingen vertonen.

Het criterium "staaf" of "segmentkernige" geeft nog wel eens problemen, vooral bij de hond, omdat de segmentkernigen van deze diersoort zeer onvolledige kerninsnoeringen vertonen. Jonge staafkernige en rijpe segmentkernige neutrofielen zijn echter duidelijk van elkaar te onderscheiden. De totale indruk van het bloedbeeld is dus belangrijker dan de determinatie van de individuele cel.

Bij ontstekingstoestanden kunnen cellen een atypisch uiterlijk krijgen door toxische degeneratie. Ook bij leukose kunnen we zeer grillige, aspecifieke cellen in het bloed zien. Toename van de herkenbare lymfocyten kan dan een aanduiding zijn dat we met aspecifieke lymfocyten of lymfoblasten te doen hebben.

Een zekere onregelmatige verdeling van de verschillende soorten witte bloedcellen in het preparaat is regel, zelfs in het meest perfecte uitstrijkje. De granulocyten en monocyten overheersen aan de randen en in de staart van het preparaat, lymfocyten blijven in het middelste deel van de film achter. Dit is waarschijnlijk een gevolg van verschil in kleverigheid, grootte en soortelijk gewicht van de cellen.

In een goed bloeduitstrijkje is de afwijking van een gelijkmatige verdeling echter gering. In verband met bovengenoemde onregelmatige verdeling, en om te voorkomen dat men bij het tellen onder het microscoop een aantal malen hetzelfde gezichtsveld passeert, wordt de zgn. "kanteel" telling als "scan" methode aanbevolen (zie fig. 9). Geen enkel telsysteem kan echter de grove verdelingsfout in een slecht uitstrijkje compenseren.

Behalve het differentiëren van de witte bloedcellen moet ook op eventuele afwijkingen van de individuele celmorfologie worden gelet (zie definities witte bloedbeeld).

Opmerkingen:

- Op een bloeduitstrijkje kan geen celtelling worden uitgevoerd, d.m.v. een leukocytendifferentiatie wordt de relatieve verdeling van de verschillende typen leukocyten bepaald.
- Het verdient aanbeveling in een gekleurd uitstrijkje eerst globaal wat leukocyten te bekijken voordat met het diffen (turven van de leukocyten naar soort) wordt begonnen. Bij het diffen is één "moeilijk te benoemen cel" veel minder belangrijk dan de 100 makkelijk te benoemen cellen, ofwel het gaat om het totaalbeeld.
- Het leukocytengehalte en de leukocytendifferentiatie zijn hematologische bepalingen die ter ondersteuning van de klinische diagnostiek kunnen dienen. Een toename aan staafkernige neutrofiele granulocyten noemt men een linksverschuiving en is een aanwijzing voor een ontstekingsproces.
- Leukocyten worden in het beenmerg (proliferatiepool en rijpingspool) geproduceerd, vorming van lymfocyten vindt voornamelijk in lymfoïde organen plaats. Het bloed transporteert de leukocyten naar de weefsels zodat ze daar hun afweerfunctie uit kunnen oefenen. In de bloedbaan zijn de leukocyten verdeeld over de circulerende pool en de marginale pool.

Uitvoering: leukocyten differentiatie

- Kijk of het voorwerpglaasje met het uitstrijkje met de goede kant boven ligt.
- Zoek met de 10x vergroting het deel van het preparaat juist naast de "vlag". De erytrocyten moeten het gezichtsveld dicht bezetten maar slechts incidenteel over elkaar liggen. Grote leemten tussen de erythrocyten betekent dat men in een te dun gedeelte van het preparaat kijkt, ergo dat de cellen misvormd kunnen zijn door het uitstrijken. Geldrollen of anderszins over elkaar liggende erytrocyten betekenen dat dat deel van het preparaat te dik is voor beoordeling.
- Breng nu immersieolie aan en bekijk het preparaat met het 100x objectief.
- Determineer de witte bloedcellen één voor één en "turf" de celtypes die u aantreft.
- Verplaats nu het gezichtsveld over de afstand van één gezichtsveld en tel de cellen in dit deel van het preparaat.
- Ga door met nieuwe gezichtsvelden tot er 100 cellen zijn gedetermineerd. (Niet goed te classificeren cellen worden als zodanig aangemerkt maar tellen niet mee.) Verplaats het preparaat steeds volgens de "kanteelmethode" (zie fig. 9) en vermijd de uiterste randen van het preparaat.

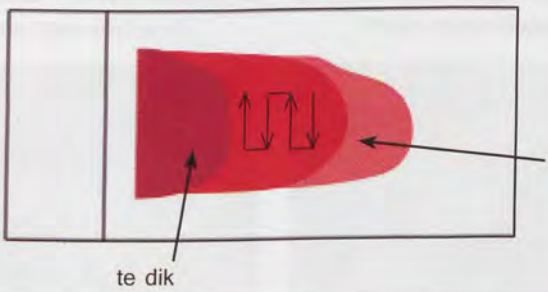
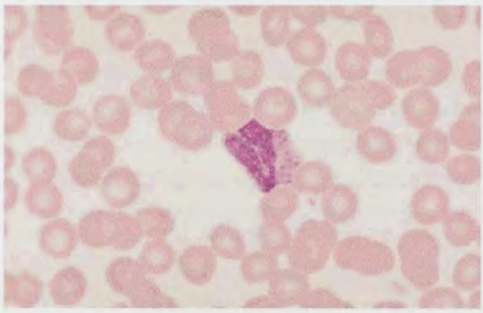
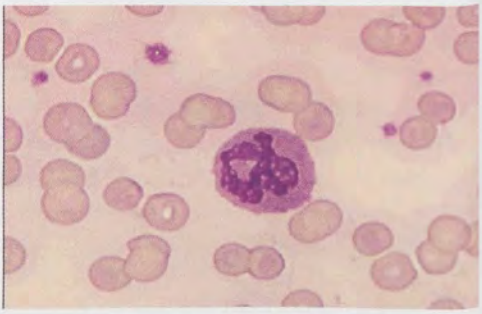


Fig. 9 *Schema van het "scannen" van een bloeduitstrijkje (zgn. kanteelmethode)*

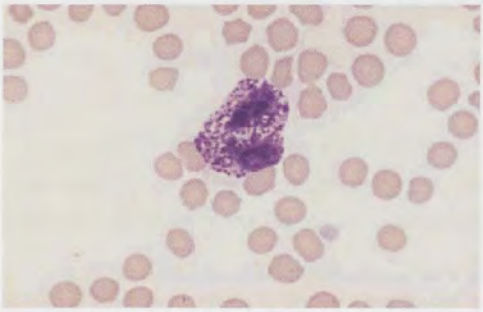
Witte bloedcellen



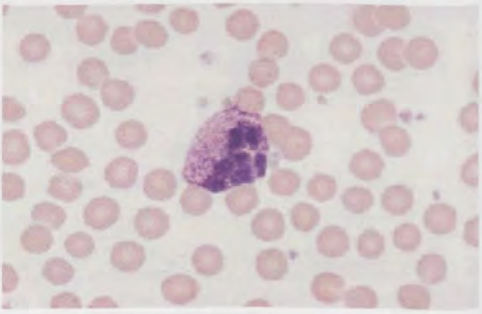
basofiele segmentkernige hond



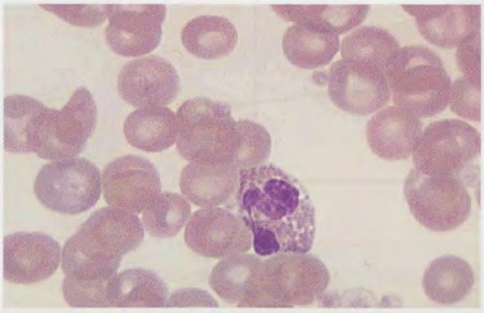
basofiele segmentkernige kat



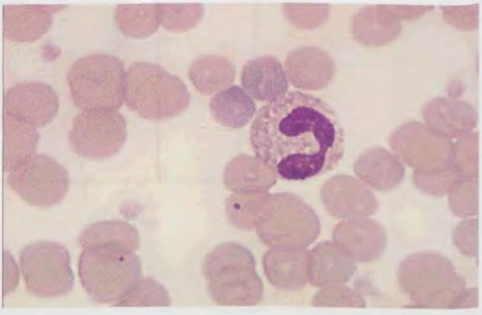
basofiele segmentkernige paard



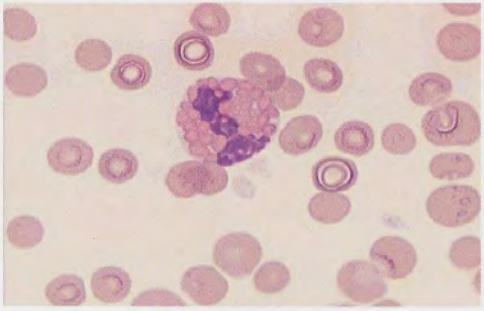
basofiele segmentkernige rund



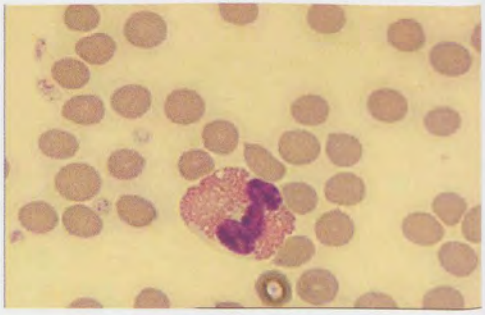
eosinofiele segmentkernige hond



eosinofiele segmentkernige kat

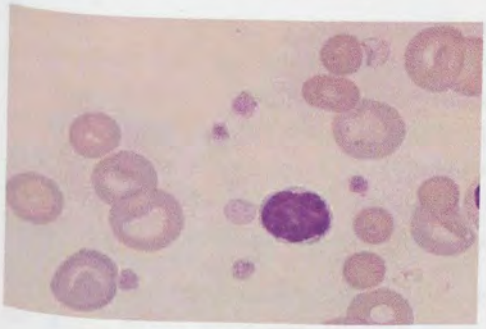


eosinofiele segmentkernige paard

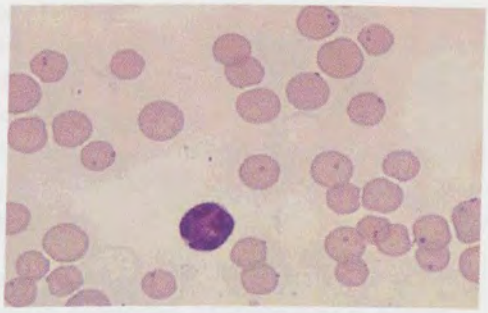


eosinofiele segmentkernige rund

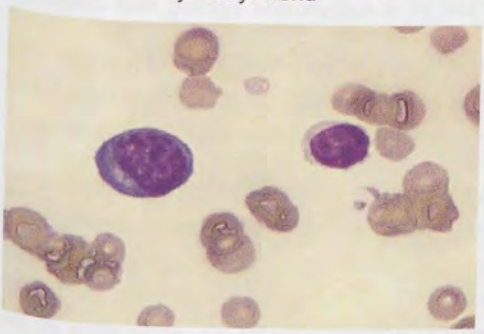
Witte bloedcellen (vervolg)



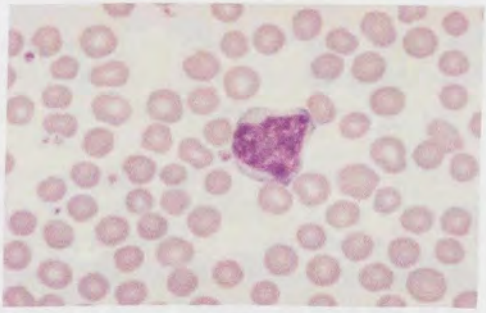
lymfocyt hond



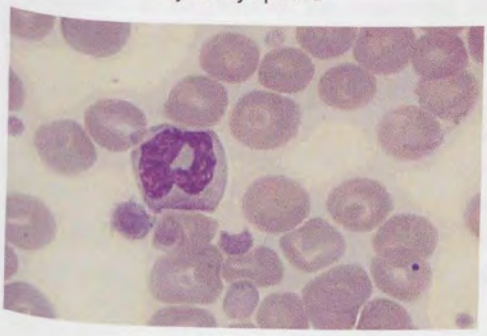
lymfocyt kat



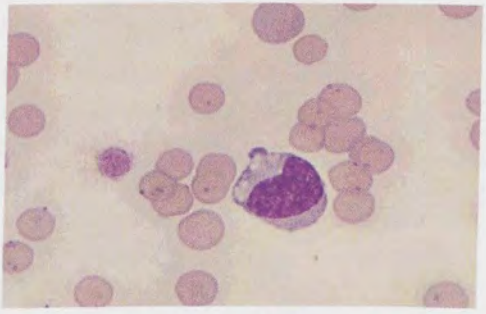
lymfocyt paard



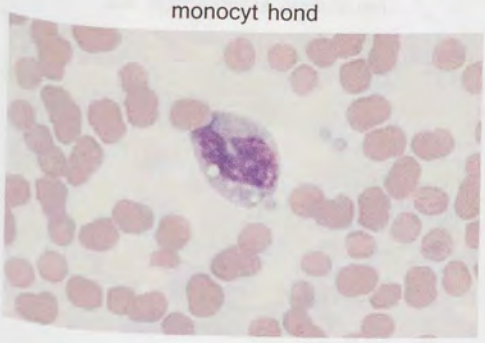
lymfocyt rund



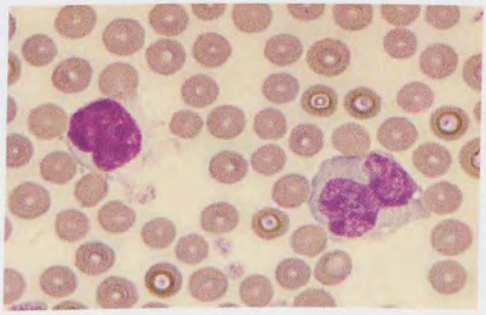
monocyt hond



monocyt kat

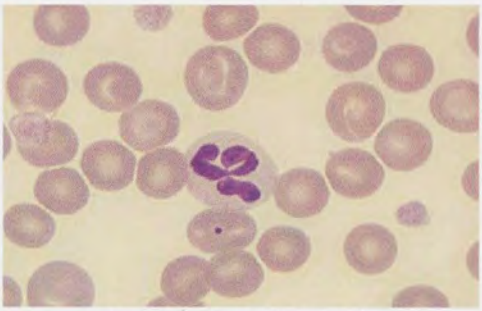


monocyt paard

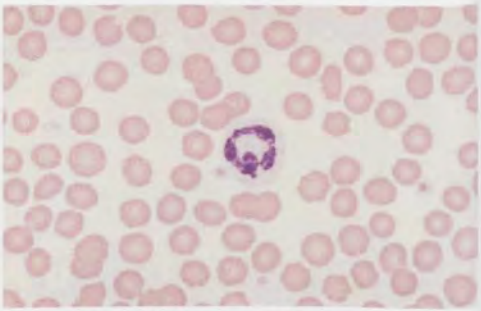


monocyt rund

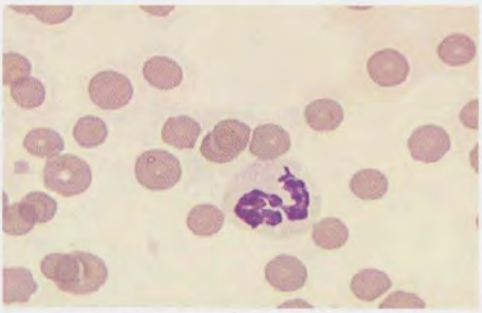
Witte bloedcellen (vervolg)



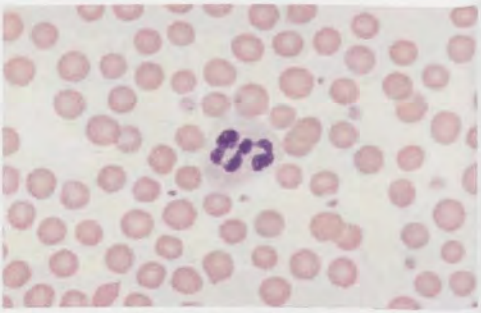
neutrofiele segmentkernige hond



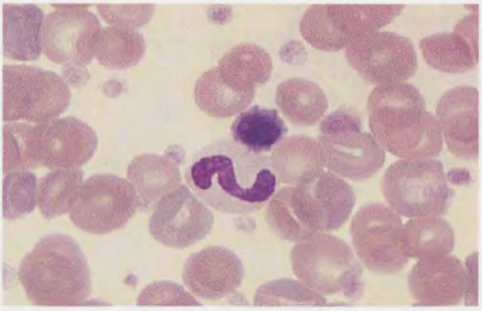
neutrofiele segmentkernige kat



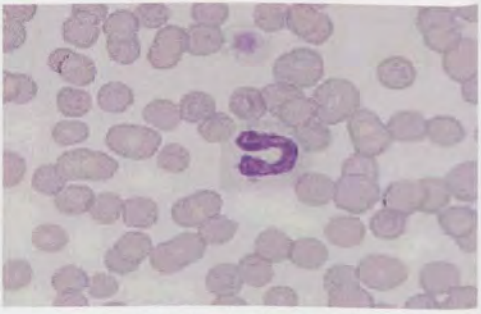
neutrofiele segmentkernige paard



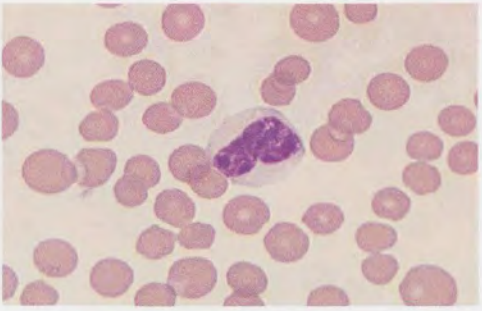
neutrofiele segmentkernige rund



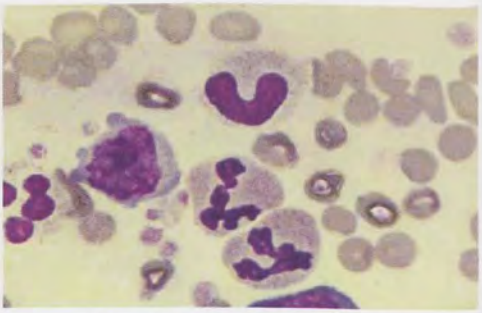
neutrofiele staafkernige hond



neutrofiele staafkernige kat



neutrofiele staafkernige paard



neutrofiele staafkernige rund

Beoordeling van het rode bloedbeeld

De vorm van de normale erytrocyt is nogal karakteristiek en kan het best omschreven worden als een platte schijf met ingedrukt centrum. Microscopisch manifesteert dit zich als een centrale bleekheid, welke het meest uitgesproken is bij de hond, het minst bij het varken en paard (bij de geit zijn de erytrocyten stomp driehoekig). Pathologische afwijkingen van deze vorm worden bij de huisdieren zelden gezien. Een enkele keer vinden we bolvormige erytrocyten (sferocyten) n.l. bij auto-immune hemolytische anemieën bij de hond. Sterk afgeplatte cellen (leptocyten) worden o.a. in combinatie met leverziekten gezien.

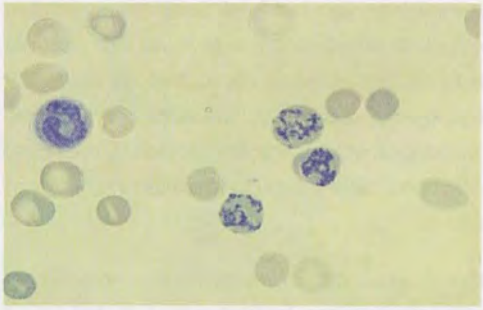
Wanneer de cellen niet allemaal even groot zijn spreekt men van anisocytose, een verschijnsel dat vooral gezien wordt wanneer zich jonge onrijpe erytrocyten (reticulocyten) in het bloed bevinden. Een geringe anisocytose is bij alle species fysiologisch; het duidelijkst bij het rund.

Wanneer de cellen sterk misvormd zijn spreekt men van poikilocytose; zeer kleine erytrocyten (microcytose) ziet men bij ijzergebreksanemieën. Macrocytose wijst meestal op reticulocytose. Fragmentocyten (fragmenten van erytrocyten) vindt men bij diffuse intravasale stolling (DIS).

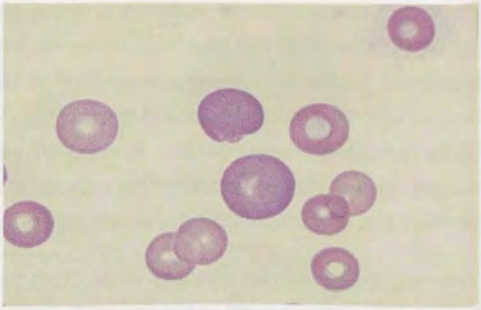
De normale erytrocyt bevat een bepaalde (maximale) concentratie hemoglobine (bovengrens van de referentiewaarde). Wanneer de concentratie hemoglobine in de cel lager is dan normaal of wanneer de cellen sterk afgeplat zijn (leptocyten) is de erytrocyt, die in het preparaat normaal oranje is, te bleek (hypochromasie). Te donker kleurende erytrocyten (hyperchromasie), zien we bij sferocytose. De Hb-concentratie van deze cellen is echter normaal; de dikte van de cel veroorzaakt de toegenomen kleurintensiteit. Wanneer tussen de normaal kleurende erytrocyten een aantal blauwgrijze (RNA-rijke) cellen wordt aangetroffen, spreekt men van polychromasie.

Als insluitlichaampjes kunnen we Howell-Jolly bodies en intracellulaire parasieten (*Babesia, Anaplasma,* etc.) tegenkomen. *Hemobartonella* en *Eperythrozoon* zijn daarentegen parasieten die niet in maar op de erytrocyt worden gevonden. Het voorkomen van normoblasten in het perifere bloed is ook van grote diagnostische betekenis (zie erythropoëse). In combinatie met anisocytose, polychromasie en eventueel basofiele stippeling is de aanwezigheid van normoblasten een indicatie voor een verhoogde erythropoëse.

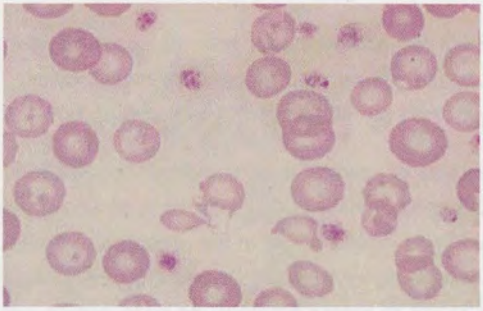
Rode bloedcellen



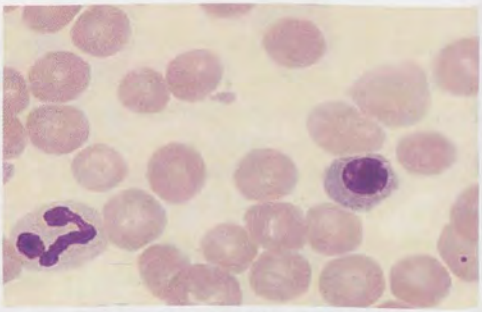
reticulocyten



polychromasie



poikilocytose



normoblast

Bijlage: Referentiewaarden hematologie

Tabellen met referentiewaarden verschillen van handboek tot handboek en van het ene laboratorium tot het andere. Dit hangt samen met verschillen in bepalingsmethoden maar ook met verschillen in onderzochte populaties "normale" dieren. Het is bijzonder moeilijk in de hematologie referentiewaarden aan te geven. Er blijkt een zeer sterke spreiding te bestaan. De grens tussen gezond en ziek is vaag en dat geldt ook voor de resultaten van het bloedonderzoek, daar normaal en abnormaal elkaar aanzienlijk kunnen overlappen. Factoren als ras, geslacht en leeftijd hebben invloed op het bloedbeeld. Vooral gedurende de eerste levensweken blijkt er een sterke verandering in bloedbeeld op te treden bij alle diersoorten. Direct na de geboorte is het hemoglobinegehalte van het bloed soms hoger dan gedurende enige andere periode van het leven. Het Hb daalt dan geleidelijk tot betrekkelijk lage waarden en stijgt vervolgens weer tot het in de "puberteit" ongeveer de volwassen waarde bereikt. Het is praktisch onmogelijk betrouwbare referentiewaarden voor jonge dieren te geven. Men moet zich in elk geval realiseren, dat ze aanzienlijk van de volwassen waarden kunnen afwijken. Bij hond en rund blijkt ook het witte bloedbeeld in de jeugd sterk van dat van het volwassen dier te verschillen. In de jeugd is het aantal lymfocyten bij deze species veel hoger dan op latere leeftijd. Het grote verschil in de referentiewaarden, opgegeven door verschillende auteurs, kan soms aan een verschil in bepalingstechniek toegeschreven worden en vaak aan het feit dat de onderzoekers gebruik gemaakt hebben van ongelijkwaardig materiaal qua leeftijd, ras en gezondheidstoestand. Ook factoren als transport, inspanning en getraindheid van het dier spelen hierbij waarschijnlijk een rol, terwijl voedingsdeficiënties ook niet altijd uitgesloten kunnen worden. Zo heeft men aangetoond dat het Hb van een gezonde getrainde politiehond duidelijk hoger lag dan het Hb van andere gezonde honden. Ook is er een negatieve correlatie tussen Hb en het aantal leukocyten in het bloed. Men dient daarom voor ieder dier, afhankelijk van de klinische toestand enz., te overwegen of een gevonden waarde als normaal voor dat dier beschouwd mag worden, ook indien de waarde binnen de opgegeven spreiding van de referentiewaarde valt (denk aan leeftijd, ras, getraindheid, klinische toestand van de patiënt enz.).

Bepaling	Paard	Rund	Kat	Hond	Eenheid
Ht	0,32 - 0,40	0,21 - 0,37	0,28 - 0,47	0,42 - 0,61	l/l
Trombo's	104 - 244	155 - 1022	156 -626	144 - 603	Giga/l
Leuko's	7,0 - 10,0	5,6 - 14,3	6,3 - 19, 6	4,5 - 14,6	Giga/l
Eo's	0 - 0,6	0 - 1,5	0,0 - 1,6	0 - 1,0	Giga/l
Baso's	0,5 - 1,9	0,2 - 2,1	0 - 0,1	0 - 0,1	Giga/l
Staafk	0 - 1,0	0 - 1,0	0-0,1	0 - 0,3	Giga/l
Segmentk	2,7-8,8	1,2-6,4	3,0 - 13,4	2,9 - 11,0	Giga/l
Mono's	0,2 - 1,0	0,2 - 0,9	0 - 1.0	0 - 0,9	Giga/l
Lymfo's	1,3 - 5,7	2,7 - 5,7	2,0 - 7,2	0,8 - 4,7	Giga/l

Tabel 1 *Referentiewaarden hematologie*

Bijlage: Definities van afwijkingen van het bloedbeeld

WITTE BLOEDBEELD

Adrenaline-geinduceerd bloedbeeld: Stijging van Ht en toename van alle soorten (rijpe) leukocyten

Corticosteroïd-geïnduceerd bloedbeeld: Toename van monocyten en rijpe granulocyten, in combinatie met lymfopenie en eosinopenie. (De hitte stabiele alkalische fosfatase in het bloed kan ook verhoogd zijn, zie chemisch bloedonderzoek)

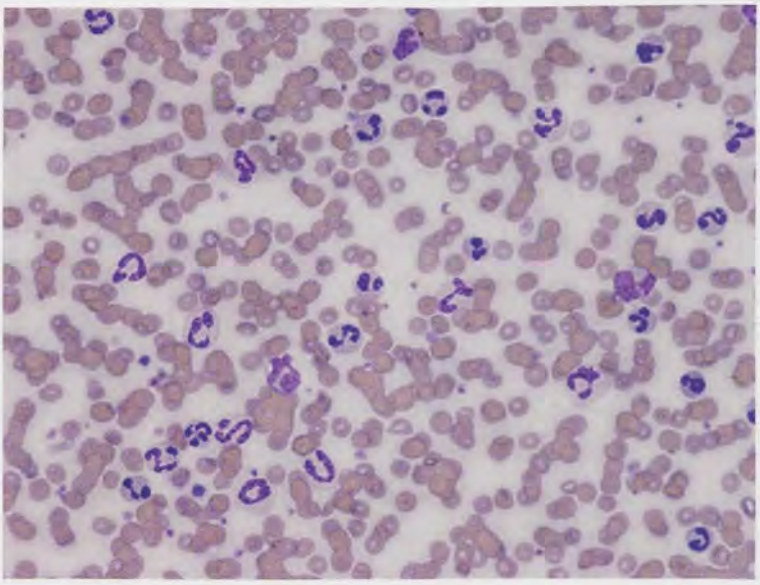
Degeneratieve veranderingen van de leukocyten: Deze veranderingen kunnen bestaan uit:
a. sterke blauwkleuring van het cytoplasma
b. vacuolevorming in plasma en celkern (toxische vacuolisatie)
c. ontwikkeling van blauwe granula in het cytoplasma (toxische korreling)
d. vorming van onregelmatige, grijs-blauwe vormsels in het cytoplasma (lichaampjes van Döhle). Bij de kat worden lichaampjes van Döhle ook onder niet pathologische omstandigheden in de granulocyten aangetroffen.

Degeneratieve linksverschuiving: (1) Linksverschuiving gepaard met leukopenie of (2) het aantal staafkernigen is groter dan het aantal segmentkernigen

Eosinofilie: Toename van het aantal eosinofiele cellen in het bloed

Eosinopenie: Een laag aantal eosinofiele cellen. Dit kan normaal zijn.

Leukocytose: Het aantal leukocyten in het bloed is te hoog, dwz hoger dan voor die diersoort (of voor dat dier) fysiologisch geacht mag worden



Leukocytose

Leukopenie: Het aantal leukocyten is te laag (als boven)

Linksverschuiving: Toename van het aantal staafkernige neutrofiele leukocyten (eventueel ook jongere vormen)

Lymfocytose: Verhoogd aantal lymfocyten

Lymfopenie: Een te laag aantal lymfocyten in het bloed

Monocytose: Verhoging van bet aantal monocyten in het perifere bloed

Ontstekingsbloedbeeld: Meestal gekenmerkt door een regeneratieve of degeneratieve linksverschuiving. Kan gepaard gaan met toxische veranderingen van de leukocyten. Zeer chronische ontstekingen hoeven niet met een linksverschuiving gepaard te gaan, wel vaak met lymfocytose en/of monocytose

Rechtsverschuiving: Toename van het aantal segmentkernige leukocyten zonder linksverschuiving maar in combinatie met hypersegmentatie

Regeneratieve linksverschuiving: Linksverschuiving gepaard met leukocytose

RODE BLOEDBEELD

Anisocytose: Ongelijke grootte van de erytrocyten

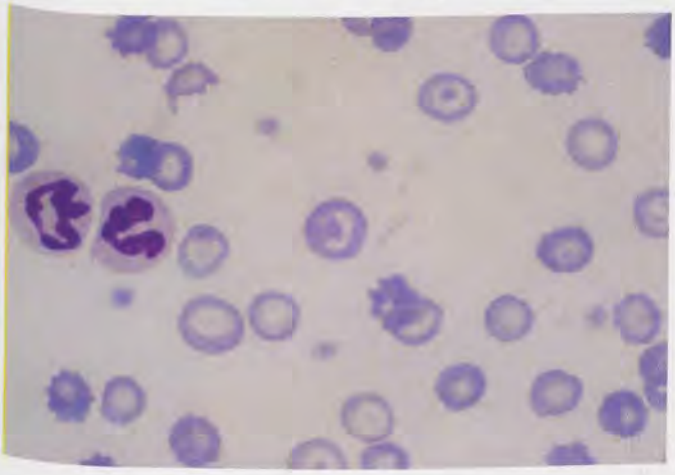
Fragmentocyt: Een stukje erytrocyt (bij microangiopathiën, bijv.DIS)

Heinz-body: Donkerblauw insluitlichaampje van gedenatureerd Hb in erytrocyt

Howell-Jolly body: Roodviolet insluitlichaampje (DNA-rest) in erytrocyt

Hyperchromasie: Veel erytrocyten hebben een te diep rode kleur (MCHC normaal!)

Hypochromasie: Vaag kleurende erytrocyten (lage MCHC)



Hypochromasie

Microcytaire hypochrome cel: Kleine vaagkleurende erytrocyt (lage MCHC en lage MCV)

Microsferocyt: Kleine bolvormige (hyperchrome) erytrocyt

Normoblast: Laatste stadium van de erythroblast kort voor uitstoten van de kern

Pancytopenie: Tegelijkertijd aanwezig zijn van een non-regeneratieve anemie, thrombo(cyto)-penie en leukopenie. Wijst in het algemeen op een ernstige beenmergbeschadiging

Poikilocytose: Erytrocyten met verschillende vormen

Polychromasie: Meer dan normaal polychromatische cellen in het bloed

Polychromatische erytrocyt: Een erytrocyt die enigszins blauw kleurt (RNA) in MGG preparaat

Regeneratief rood bloedbeeld: Anisocytose, polychromasie, normoblasten in het bloed

Reticulocytose: Toename aantal reticulocyten

FECESONDERZOEK

Verteringsonderzoek en parasitologisch fecesonderzoek

VERTERINGSONDERZOEK

Inleiding

Verteringsonderzoek wordt alleen uitgevoerd bij patiënten met chronische diarree. Omdat diarree veel oorzaken kan hebben, bestaan er evenveel of nog meer verschillende onderzoeksmethoden. Vele daarvan hebben betrekking op parasieten, bacteriën en virusinfecties.

Het verteringsonderzoek is vooral gericht op het zichtbaar maken van de voedingsbestanddelen vet, zetmeel en spiervezels. Het betreft hier dus het microscopisch aantonen van onverteerde voedingsbestanddelen. Daarnaast wordt gezocht naar niet door de darm opgenomen vetzuren. Dit gebeurt eveneens met de microscoop. Wanneer er sprake is van onverteerde voedingsbestanddelen in de feces, moet een monster worden opgestuurd naar een gespecialiseerd laboratorium om de activiteit van één of twee verteringsenzymen in de feces te bepalen. Samen wordt dit geheel het verteringsonderzoek genoemd. Het verteringsonderzoek d.m.v. het zichtbaar maken van voedingsbestanddelen, wordt alleen uitgevoerd bij hond en kat.

Bij een goed functionerende vertering worden al deze componenten vrijwel volledig afgebroken en als deelproducten opgenomen door de darm. Een goede uitslag is dus negatief voor alle onderdelen. Een spoor vet, zetmeel of spiervezels wordt echter regelmatig gevonden en niet als afwijkend gezien.

Bij afwezigheid van trypsine bevat de feces niet-verteerde spiervezels. Zonder lipase is er neutraal lipid aanwezig. Geen amylase betekent dat er zetmeel met de ontlasting verloren gaat. Als alle componenten in verhoogde mate aanwezig zijn, wijst dit in de eerste plaats op het ontbreken van de pancreas enzymen. Dergelijke deficiënties kunnen ook opgespoord worden door in feces verteringsenzymen te bepalen.

Dergelijke patiënten vertonen een Exocriene Pancreas Insufficiëntie, kortweg aangeduid als EPI. Een EPI heeft altijd betrekking op alle enzymen. Partiële defecten, dus het ontbreken van één enzym, zijn niet bekend. Patiënten met EPI eten alles en vermageren toch sterk. Ze vertonen een zgn. "bulky fecesproductie"; d.w.z. er worden grote hoeveelheden feces gevormd. De consistentie van deze feces is matig, papperig, maar zeker niet waterig dun. Door het soms hoge vetgehalte zijn ze vaak wat grijsachtig van kleur (leemkleurig).

De betrouwbaarheid van het microscopisch onderzoek is matig tot zelfs slecht. Oorzaak daarvan is het grote aantal variabelen: variatie in samenstelling van de feces, de manier van monsternemen, de tijdsduur tussen analyse en productie, de subjectieve manier van waarneming van de resultaten. Alleen de uitkomsten negatief of spoor en zeer sterk positief zijn voldoende betrouwbaar. Alle tussenliggende waarden (+ en ++, positief en sterk positief) zijn dat niet. Verbetering van de resultaten kan worden bereikt door monsters van meerdere dagen te onderzoeken.

Monster

Feces moet zo vers mogelijk op vertering worden onderzocht. Dit betekent dat het binnen een dag onderzocht moet worden. Met name als het gaat om onderzoek naar de activiteit van de verteringsenzymen zijn de uitslagen van monsters ouder dan een dag niet betrouwbaar. Het is dan ook belangrijk om na te gaan dat een monster bij aankomst in het laboratorium niet ouder is dan een dag. Over de bewaartijd en betrouwbaarheid van het onderzoek naar voedingsbestanddelen is echter weinig bekend.

Macroscopisch onderzoek en pH

Het verteringsonderzoek bestaat allereerst uit een macroscopisch onderzoek en de beoordeling van de pH.

Hoeveelheid en defecatiefrequentie (navragen bij de eigenaar)
Bij de meeste diersoorten wordt de hoeveelheid feces sterk bepaald door de hoeveelheid onverteerbare bestanddelen in het dieet, m.n. de hoeveelheid ruwe celstof. De frequentie van defecatie is sterk diersoortafhankelijk, maar varieert ook per individu. Voor de hond is nauwelijks een richtlijn te geven door de uitzonderlijke variatie in lichaamsgewicht. Bij een afwijking in de vertering zal de hoeveelheid feces in het algemeen sterk toenemen.

Vorm en consistentie
Beide aspecten zijn weer sterk diersoortafhankelijk. Denk aan het verschil tussen b.v. rund en paard. Bij veel diersoorten is een onderscheid te maken tussen gevormde en ongevormde feces. Dit aspect wordt ook weer sterk bepaald door het dieet. Bij gezelschapsdieren levert een droogvoer veel vastere feces op dan een dieet dat bestaat uit natvoer of een dieet wat door de eigenaar zelf is samengesteld. Bij grazend rundvee zien we veel slappere ontlasting in vergelijking met een stalvoeding die bestaat uit hooi en krachtvoer.

De grens tussen diarree en normale ontlasting is niet altijd gemakkelijk aan te geven. Veel eigenaren spreken pas van diarree als de ontlasting waterdun is geworden. In feite moeten we al spreken van diarree als het vochtgehalte abnormaal hoog is en dit in relatie tot een aantal externe factoren; m.n. het dieet. Voor een juiste beoordeling van de situatie is een zorgvuldige anamnese op dit punt dus een absolute voorwaarde.

Kleur
De meestal donkere kleur van ontlasting wordt sterk bepaald door de aanwezigheid van diverse galkleurstoffen, zoals urobiline en stercobiline. Bij vertraagde passage van het voedsel worden feces donkerder door een toenemende oxidatie van deze kleurstoffen. Afsluiting van de ductus choledochus leidt tot zgn. acholische feces. Meestal is de vetvertering hierbij gestoord en dat heeft op zich weer invloed op de consistentie. De feces zijn geelwit tot crèmekleurig. Veel vet in feces (vnl. te vinden bij hond en kat) geeft grijze, *leemkleurige* feces die weinig of niet gevormd zijn. Deze afwijking noemen we **steatorrhoea**.

Vleesvoeding geeft donkerder ontlasting dan een overwegend plantaardige voeding. Bloedbijmenging vanuit de maag of de dunne darm is aanleiding tot zeer donkere, zelfs bijna zwarte

ontlasting. Het bloed is dan namelijk verteerd. Vers bloed en slijm bij de ontlasting is afkomstig uit de dikke darm en/of het rectum. Medicijnen of bijzondere toevoegingen aan het dieet kunnen evenzo invloed hebben op de kleur van de feces. Bekend is de rode kleur die soms aan droogvoeders wordt toegevoegd om het product toch een "vleselijke" indruk te geven.

Geur

De karakteristieke geur van sommige typen feces (soms zelfs stank genoemd) ontstaat door bacteriële omzetting van aromatische aminozuren uit eiwit; m.n. van tryptofaan. Hierbij ontstaan producten als indol en skatol. Feces van vleeseters heeft als regel een meer penetrante geur dan die van planteneters.

Bij een overmaat aan zetmeel in het dieet of bij de aanwezigheid van niet voldoende toegankelijk zetmeel (hele graankorrels in hondenvoer) ontstaat een vergisting in het meest distale deel van de darmtractus. Er wordt daarbij veel lactaat (melkzuur) gevormd dat ter plaatse niet meer kan worden opgenomen. De feces is dan breiachtig van consistentie, vertoont een te lage pH en ruikt zuur. We noemen deze afwijking een **gistingsdiarree.**

Bij een onvoldoende vertering van het eiwit (voeren van brokken rauw vlees aan honden) ontstaat distaal een bacteriële vertering van het overgebleven eiwit. Eiwitafbraak door bacteriën noemen we rotting. Deze afwijking noemen we inderdaad **rottingsdiarree**. De bijbehorende ontlasting heeft een zeer penetrante geur.

Abnormale bestanddelen

Slijm

Bij een ontsteking van het colon kan slijm voorkomen in de feces.
Bij het paard is de feces overtrokken met een dun laagje slijm, waardoor deze aanvankelijk een zekere glans vertonen. De dikte van dit laagje is afhankelijk van de verblijfsduur van de feces in de darm.

Zand

Zandopname kan ontstaan door grazen in een kaal weiland of door het niet goed schoonmaken van voeding zoals voederbieten, wortelen en dergelijke. Bij het paard kan zand vrij snel aanleiding zijn tot darmklachten.

Pus

Pusbijmenging komt voor bij abcessen in het meest distale deel van de darmtractus. Het is een zeldzaam verschijnsel.

Pseudo-membranen

Het zijn fibrinestolsels die er uitzien als afgietsels van het darmkanaal. Ze komen voor bij ontstekingen in het meer proximaal deel van de darm. Ze worden echter zelden waargenomen.

Corpera aliena

Dit kunnen de meest uiteenlopende dingen zijn; steentjes, knikkers, plastic voorwerpen, etc. Vaak treedt verontreiniging op bij het opscheppen van ontlasting (zand, grind, gras, etc.)

Parasieten

Zie het hoofdstuk parasitologisch fecesonderzoek.

pH

Planteneters vertonen als regel licht alkalische feces; bij het paard echter licht zuur. Bij carnivoren zien we als regel licht zure ontlasting. Feces kunnen duidelijk zuur ruiken en een lage pH vertonen bij gistingsdiarree (zie hiervoor) en bij rottingsdiarree (zie hiervoor) vinden we een opvallend hoge pH.

Uitvoering: pH bepaling en microscopisch verteringsonderzoek

- Breng een kleine hoeveelheid feces (ca 1 g) over in een mortier. Zorg voor een zo representatief mogelijk monster.
- Maak m.b.v. een stamper een "fecespap" dat de consistentie heeft van b.v. dikke karnemelk. Bereik dit door er steeds enkele druppels gedestilleerd water aan toe te voegen en te roeren tot de juiste dikte wordt bereikt.
- Bepaal de pH in deze suspensie m.b.v. pH-papier. Dit kan universeel pH-papier zijn, mits dit goed is af te lezen. Dual-tint pH-papier is over het algemeen beter af te lezen.
- Breng een kleine druppel van deze dikke suspensie links en rechts op een vetvrij voorwerpglas.
- Voeg nu m.b.v. een pipetje een druppel Sudan III-oplossing* bij één van de druppels fecessuspensie.
- Neem een dekglas tussen duim en wijsvinger (zonder het oppervlak aan te raken) en meng met dit dekglas de beide druppels door elkaar op een oppervlak van ca. 1 cm^2 en leg hierop het voorwerpglas.
- Voeg aan de andere druppel een druppel Lugol-oplossing** toe.
- Herhaal hier de procedure met het dekglas.
- Verwarm nu de Sudankant zeer voorzichtig, al bewegend, boven een kleine gasvlam, totdat de eerste dampbellen ontstaan. Stop nu de verwarming onmiddellijk en laat afkoelen.
- Bekijk nu de beide preparaten met een vergroting van ca. 10x40. Het diaframa moet bijna helemaal open worden gezet (tot net buiten de 10x vergroting) en de condensor moet helemaal omhoog.

Vet is nu zichtbaar als kleine, roodgekleurde bolletjes.
Zetmeel is zichtbaar als paars-donkerblauw of zwart materiaal.
Spiervezels zijn herkenbaar aan een zeer fijne, karakteristieke dwarsstreping .
Vetzuren zijn zichtbaar in de vorm van naaldvormige kristallen van uiteenlopende vorm en grootte. Ze zijn ongekleurd en kunnen het best worden gezien in de meer open stukken van het preparaat.

Het resultaat wordt kwalitatief vastgelegd als - , sp(oor), +, ++ of +++. Voor een goede inschatting van een resultaat is wel enige ervaring nodig.

* Sudan III	10 mg Sudan III oplossen in 10 ml alcohol 96% aanvullen tot 100 ml met ijsazijn.
** Lugol	0,5 g jodium en 1 g kaliumjodide (KJ) oplossen in enkele ml aqua dest en vervolgens aanvullen tot 150 ml.

Het voorkomen van slechts één voedingscomponent, b.v. alleen maar erg veel zetmeel of alleen veel spiervezels terwijl de rest normaal is, geeft in het algemeen aan dat er iets mis is met het dieet of met de voeropname. Zie ook hiervoor bij het aspect geur.

Een aparte plaats nemen de **vetzuren** in. Veel vetzuren wijzen op een goede afbraak van het vet (er is dus lipase aanwezig). De gevormde vetzuren worden echter niet op de juiste manier of in het juiste tempo opgenomen door de darm. Er is een afwijking van het darmepitheel en wel op uitgebreide schaal, want bij een beperkte, locale aandoening is er nog steeds een voldoende opnamecapaciteit.

Als er veel vet aanwezig is, worden regelmatig ook wat vetzuren gevonden. De aanwezigheid hiervan kan worden verklaard door het splitsen van vet door bacteriën in het distale deel van de darm. De daar ontstane vetzuren kunnen echter niet meer worden opgenomen. Ze hebben in deze context dus geen enkele klinische betekenis.

PARASITOLOGISCH FECESONDERZOEK

Wormeieren, larven en (oö)cysten

Inleiding

De meeste parasieten verraden hun aanwezigheid in de gastheer doordat ze eieren/larven/(oö)cysten produceren die met de feces worden uitgescheiden. Door het aantonen van deze stadia in fecesmonsters kunnen we vaststellen of een dier een patente infectie doormaakt en kunnen we meestal ook nog vaststellen met welke parasiet of parasieten het dier geïnfecteerd is. Fecesonderzoek is nog steeds één van de meest gebruikte methodes voor het vaststellen van parasitaire infecties. Enkele parasitaire infecties kunnen ook serologisch worden aangetoond.

Monstername

Een correcte interpretatie van het fecesonderzoek is alleen mogelijk als aan het te onderzoeken monster een aantal voorwaarden wordt gesteld.

Het monster moet indien mogelijk rectaal zijn genomen. Monsters die opgeraapt zijn van de bodem zijn bijna altijd verontreinigd met vrijlevende nematoden, dus ook met eieren en larven van vrijlevende soorten. Eieren van bodemnematoden lijken erg veel op strongylus-type of *Strongyloides* eieren waarmee ze dan ook gemakkelijk verward kunnen worden.

Ook het onderzoek op longwormlarven met de Baermann techniek geeft problemen als het monster verontreinigd is met vrijlevende nematoden. Bij de Baermann techniek wordt gebruik gemaakt van de beweeglijkheid van de larven om deze te scheiden van overige fecesbestanddelen. Vrijlevende nematoden zijn ook beweeglijk en zijn weliswaar goed te onderscheiden van longwormlarven, maar het zoeken van de longwormlarven tussen grote aantallen vrijlevende nematoden kost veel tijd.

> *N.B.: Het rectaal nemen van een fecesmonster is belangrijker voor de Baermann techniek dan voor het fecesonderzoek op wormeieren en/of (oö)cysten. Indien van vers gevallen feces direct van de bovenkant van de hoop wordt bemonsterd, is de kans op verontreiniging met eieren van vrijlevende nematoden minimaal.*

De monsters moeten vers zijn. Strongylus-type eieren ontwikkelen zich erg snel. Onder gunstige omstandigheden kunnen de L1 larven al na 24 uur uit de eieren gekomen zijn en Strongyloides eieren komen nog sneller uit. In een niet vers monster worden met de gebruikelijke technieken dus geen of minder strongylus-type en *Strongyloides* eieren aangetroffen. De ontwikkeling van eieren kan worden beperkt door de monsters **gekoeld en zo goed mogelijk luchtarm** te bewaren tot ze onderzocht worden. Min of meer anaërobe omstandigheden worden bereikt door plastic zakjes direct om het monster te sluiten en potjes volledig te vullen.

> *N.B.: In volledig met feces gevulde potjes vindt regelmatig gasvorming plaats. Dat kan bij opening resulteren in wegspatten van de inhoud. Als compromis tussen theorie en praktijk verdient het daarom de voorkeur om potjes voor 2/3 te vullen en zo snel mogelijk in te sturen.*

Het zal duidelijk zijn dat als de monsters opgestuurd worden er van koeling geen sprake is. Deze eisen gelden niet voor elk onderzoek. Eieren van bijvoorbeeld *Ascaroidea* en *Trichuroidea*, kunnen, ook al worden de monsters niet koel en anaëroob bewaard, nog na lange tijd worden gevonden en herkend met de gebruikelijke methoden.

N.B.: Van sommige diersoorten is de feces vaak goed luchtarm te verpakken in een plastic zakje, bijvoorbeeld de wat meer pasteuze mest van schapen en de mest van runderen. De mest van paarden is vaak structuurrijk en daardoor erg luchtig. Voor zulke feces is het koelen dan ook belangrijker dan voor feces die wel goed luchtarm kan worden bewaard.

Monsters die met de **Baermann techniek** onderzocht worden op *Dictyocaulus* larven moeten bij voorkeur **binnen een dag worden ingezet.** Deze larven beginnen na één dag te vervellen naar het L2-stadium. Gedurende deze vervelling zijn de larven minder beweeglijk of liggen stil zodat de kans erg groot is dat ze met de Baermann niet worden gevonden.

Het opsturen van zo'n monster naar een (commercieel) laboratorium is dan ook niet aan te raden, tenzij het dezelfde dag kan worden gebracht (koerier) en ingezet. Indien het monster direct goed luchtarm verpakt en gekoeld wordt, kan het ook een dag tot enkele dagen later worden onderzocht of (gekoeld) ingestuurd, maar dat heeft niet de voorkeur.

Voor **koppeldiagnoses** moet het aantal genomen **monsters representatief** zijn. In het algemeen varieert de ei- en larvenuitscheiding van de individuele dieren sterk. Het aantal monsters moet daarom relatief groot zijn. In de meeste gevallen wordt aangeraden om van ongeveer 10 dieren een fecesmonster te onderzoeken. Dit geldt met name voor grotere koppels grazers, dieren die gezamenlijk weiden en van eenzelfde leeftijdsgroep zijn.

N.B.: Om het aantal fecesonderzoeken te beperken en kosten te besparen, worden ook wel mengmonsters onderzocht. Daartoe wordt van elk genomen individueel monster eenzelfde hoeveelheid gemengd tot één monster en onderzocht. Dit kan alleen bij dieren die onder dezelfde condities worden gehouden en meestal tot dezelfde leeftijdsgroep behoren.

De vraagstelling en de anamnese moeten duidelijk zijn. Een vraag als "Graag onderzoek op wormeieren" is onvoldoende, omdat voor verschillende soorten verschillende technieken worden gebruikt.

Natief preparaat

De eenvoudigste manier om een fecesmonster te onderzoeken op de aanwezigheid van wormeieren en (oö)cysten is het maken en bekijken van een natief preparaat. Een natief preparaat wordt gemaakt door de feces te suspenderen in water. Een druppel van deze suspensie wordt op een voorwerpglas gedaan, er wordt een dekglas opgelegd en microscopisch onderzocht op eieren. De aanwezigheid van kleurstoffen en veel fecesbestanddelen maakt het vinden van eieren niet gemakkelijk.

Een natief preparaat kan ook worden gemaakt voor het aantonen van levende stadia van enkele protozoa (bewegende trofozoïeten) in geval van diarree. Hiertoe wordt een druppeltje feces op een voorwerpglas vermengd met een druppel lauwwarm water of fysiologisch zout.

De gevoeligheid van deze techniek is, zeker voor wormeieren en (oö)cysten, niet hoog. De afwezigheid van eieren in een dergelijk preparaat zegt dan ook weinig. Om die redenen wordt voor wormeieren en (oö)cysten meestal direct een verzameltechniek gebruikt. Deze verzameltechnieken berusten op een scheiding van de eieren van de andere fecesbestanddelen op basis van verschillen in **grootte** en **dichtheid.**

Zeven

Wormeieren en protozoaire (oö)cysten hebben een bepaalde **grootte**. Zo zijn de maten van het *Ascaris suum* ei 50-70 µm bij 40-60 µm. Als we een fecessuspensie met daarin deze eieren zeven over een zeef met een maaswijdte van meer dan 70 µm zullen delen die groter zijn op de zeef achter blijven. De eieren en de fijnere fecesbestanddelen zullen de zeef passeren. Dit gezeefde materiaal kan microscopisch onderzocht worden op eieren van *Ascaris suum* en eventuele andere wormeieren en (oö)cysten die kleiner zijn dan 70 µm, of verder worden bewerkt. Als onder deze zeef een tweede zeef geplaatst wordt met een maaswijdte die kleiner is dan 40 µm raken we ook kleurstoffen en fecesbestanddelen die kleiner zijn dan de eieren kwijt. Het materiaal dat achterblijft op deze zeef kan microscopisch onderzocht worden op *Ascaris suum* eieren en eventuele andere wormeieren of cysten die ongeveer even groot zijn, of kan verder worden bewerkt.

Het materiaal dat achterblijft op de bovenste zeef dient altijd **macroscopisch** te worden gecontroleerd op de aanwezigheid van parasieten en met name op lintwormproglottiden. Bij lintworminfecties komt het merendeel van de eieren verpakt in de proglottiden in de buitenwereld. De kans bestaat dus dat je een lintworminfectie niet diagnostiseert als je deze proglottiden mist.

Sedimenteren

De **dichtheid** van wormeieren en protozoaire (oö)cysten is groter dan de dichtheid van water, wat 1 g/cm^3 is. Ze zinken dus in water. Als we een fecesmonster suspenderen in water en dit enige tijd in een cilinderglas laten staan zullen de eieren en (oö)cysten naar de bodem zinken. Ook andere fecesbestanddelen zullen zinken, maar drijvende en zwevende bestanddelen en ook kleurstoffen raak je op deze manier kwijt. De bovenstaande vloeistof wordt na verloop van tijd afgegoten of afgezogen en het sediment kan microscopisch onderzocht worden op eieren en (oö)cysten of verder worden bewerkt.

Floteren

Het fecesmonster wordt hierbij gesuspendeerd in een vloeistof met een dichtheid die groter is dan die van de eieren en (oö)cysten. Hiervoor worden diverse oplossingen van suikers en zouten in water gebruikt. Een veel gebruikt flotatiemedium is een verzadigde NaCl-oplossing. Deze oplossing is goedkoop en gemakkelijk te maken en bovendien niet belastend voor het milieu. Een verzadigde NaCl-oplossing heeft een dichtheid van 1,17-1,20 g/cm^3. In deze oplossing gaan wormeieren en protozoaire (oö)cysten dus drijven. Als we zo'n suspensie enige tijd laten staan zullen de eieren en (oö)cysten zich aan het oppervlak van de vloeistof verzamelen. Met een pipet kan wat materiaal boven uit de vloeistof worden genomen en microscopisch worden onderzocht.

De eieren van *Trichuris, Capillaria* en alle trematodeneieren hebben een dichtheid die hoger is dan 1,20 g/cm^3. Deze eieren zullen dus ook in een verzadigde NaCl-oplossing zinken. Voor de flotatie van trematodeneieren moet dus een vloeistof met hogere dichtheid worden toegepast. Hiervoor kan een suikeroplossing met een dichtheid van 1,30 g/cm^3 gebruikt worden. Het lijkt logisch om altijd een suikeroplossing te gebruiken omdat immers alle eieren en (oö)cysten hierin gaan drijven. De suikeroplossing heeft als nadeel dat het iets duurder is, je laboratorium plakkerig wordt en vooral dat de hogere viscositeit leidt tot een tragere flotatie en de hogere osmotische activiteit leidt tot het sneller inklappen van sommige wormeieren en (oö)cysten. De NaCl-oplossing is gemakkelijker te maken omdat de juiste dichtheid wordt bereikt als de vloeistof verzadigd is. Voor sommige spoelwormeieren, zoals bijvoorbeeld die van *Parascaris equorum*, is een zoutoplossing met een dichtheid van 1,17 g/cm^3 ook niet voldoende, Een zoutoplossing van 1,20 g/cm^3 of de genoemde suikeroplossing voldoen dan wel.

De eieren en (oö)cysten moeten niet te lang in een flotatiemedium blijven staan, omdat door de hoge osmotische waarde de eieren kunnen vervormen waardoor hun dichtheid verandert en ze mogelijk gaan zinken. Hoe lang eieren en (oö)cysten onvervormd in een flotatiemedium blijven, hangt ook af van het type wormei of (oö)cyst. De ene soort vervormt makkelijker dan een andere soort.

Uitvoering: het maken van flotatievloeistoffen

Verzadigde zoutoplossing:
Los minimaal 333 gram keukenzout op in 1 liter zeer warm water. Wat meer zout mag ook. Dit heeft een dichtheid van minimaal 1,17 g/cm3. Om de dichtheid iets te vergroten kan aan deze oplossing 200 gram suiker worden toegevoegd. Daarmee wordt de dichtheid ca. 1,22 g/cm^3.

Sucroseoplossing:
Los 1280 gram witte kristalsuiker op in 1 liter zeer warm water. Dit heeft een dichtheid van 1,3 g/cm^3.

De centrifuge-sedimentatie-flotatie techniek (CSF)

In de praktijk wordt meestal een combinatie van zeven, sedimenteren en floteren gebruikt om de eieren en (oö)cysten zo schoon mogelijk te isoleren uit een fecesmonster. Een veel gebruikte combinatie is de centrifuge-sedimentatie-flotatie techniek (CSF). Hierbij wordt een fecesmonster eerst gesuspendeerd in water en vervolgens over een grove zeef (theezeef) gezeefd. Dit zeven is vooral van belang bij onderzoek van feces van planteneters om de relatief grote fecesbestanddelen kwijt te raken.

N.B.: Controleer de zeef op de aanwezigheid van lintwormproglottiden of wormen/larven.

De gezeefde suspensie wordt overgegoten in centrifugebuizen en gecentrifugeerd. Het sediment wordt daarna gesuspendeerd in een flotatiemedium en opnieuw gecentrifugeerd. Het centrifugeren heeft tot doel het sedimenteren en floteren te versnellen. In plaats van centrifugeren kan men de buizen ook enige tijd laten staan. Deze techniek kan ook kwantitatief worden uitgevoerd, maar wordt meestal als een gevoelige kwalitatieve techniek ingezet om te zien of er wel/niet een infectie is met een bepaalde parasiet.

Uitvoering: centrifuge-sedimentatie-flotatie techniek

1. Maak van het te onderzoeken fecesmonster een suspensie in water. Bij harde keutels hierbij een vijzel en mortier gebruiken.

N.B.: Zorg voor een suspensie waarin voldoende fecesmateriaal zit voor een geschikt preparaat om te doorzoeken. Ruwweg kan een verhouding van 1 gram feces op 10 ml water worden aangehouden. Mocht dit een iets te dikke fecessuspensie geven, kan men het daarna verdunnen met wat meer water.

2. Giet de suspensie over een grove zeef (theezeef).

3. Roer de gezeefde suspensie om want de eieren liggen op de bodem. Met de gezeefde suspensie wordt een centrifugebuis gevuld. Plaats de buis in de centrifuge. Zorg ervoor dat er altijd twee buizen met gelijk gewicht tegenover elkaar staan.

N.B.: Centrifugebuis moet bij voorkeur van geslepen glas zijn, zodat er een dekglas op gelegd kan worden (zie stap 8).

4. Laat de centrifuge gedurende 1-2 min draaien met 3000 toeren per min.
5. Giet het supernatant af door de buis met een langzaam draaiende beweging op z'n kop te zetten. De pellet (het sediment) moet in de buis achterblijven.
6. Vul de buis voor de helft bij met een flotatievloeistof. Suspendeer het sediment met een spatel.

N.B.: Meestal wordt een suikeroplossing gebruikt met een hoge dichtheid (1,30 g/cm^3), omdat deze techniek vaak kwalitatief gebruikt wordt om elk denkbaar ei-type te kunnen vinden.

7. Zet de buis weer in de centrifuge en vul de buis bij met de gekozen flotatievloeistof (zie stap 6), zodat er een kleine bolle meniscus ontstaat.

8. Leg een dekglas op de meniscus zodanig dat dit dekglas tijdens het centrifugeren de klauw van de centrifuge niet kan raken. Druk het dekglas met de nagel iets aan.

N.B.: Het is niet bij alle centrifuges mogelijk om een dekglas tijdens het centrifugeren op de centrifugebuis te laten zitten. Dan kan de buis zonder dekglas worden gecentrifugeerd. Leg daarna een dekglaasje erop en laat de buis vervolgens staan.

9. Centrifugeer opnieuw op dezelfde manier (zie stap 4). Wanneer sucrose als flotatievloeistof wordt gebruikt moet minimaal 2 minuten worden gecentrifugeerd.

10. Haal het dekglas met een rechtstandige beweging van de buis en leg het op een voorwerpglas.

11. Zoek het preparaat systematisch af op wormeieren en (oö)cysten. Gebruik daartoe een vergroting van 10x4 of 10x10. Voor kleine cysten is een vergroting van 10x40 beter.

De McMaster techniek

De McMastertechniek wordt gebruikt voor het **tellen** van het aantal wormeieren of soms het aantal oöcysten in een fecesmonster. Hierbij wordt een hoeveelheid feces afgewogen en gesuspendeerd in een vaste hoeveelheid flotatiemedium. Na zeven over een grove zeef (theezeef) en zorgvuldige menging van de suspensie, wordt een vaste hoeveelheid overgebracht in een telkamer voor de telling. Hij wordt met name toegepast voor het tellen van strongylustype eieren in fecesmonsters van herkauwers en paarden. De uitslag wordt uitgedrukt in het aantal **eieren per gram feces (EPG)** of, vaak bij pluimvee, in aantal **oöcysten per gram feces (OPG).** Redenen om kwantitatief mestonderzoek te doen zijn:

- er is een sterk verband tussen EPG of OPG en de ernst van de ziekte;
- er worden altijd wel in enige mate eieren of oöcysten uitgescheiden, ook zonder klinische verschijnselen;
- ten behoeve van regelmatige monitoring bij paarden en herkauwers waar het EPG mede bepalend is voor eventuele preventieve maatregelen/behandelingen;
- ten behoeve van controle op anthelminticumresistentie (landbouwhuisdieren en paarden).

Uitvoering: McMaster techniek

1. Weeg 3 gram feces af en suspendeer dit in 42 ml flotatievloeistof.

N.B.: Evenals bij de sedimentait-flotatie-techniek is het belangrijk om na te gaan of voor de eieren en/of oöcysten enkel een verzadigde zoutoplossing voldoende is of dat deze aangevuld moet worden met suiker.

2. Zeef de suspensie over een grove zeef (theezeef).

3. Roer de suspensie om want de eieren drijven aan het oppervlak van de suspensie.

N.B.: Een goede menging van eieren in de suspensie is belangrijk. Dit is tenslotte een kwantitatieve methode.

4. Vul met een pipet één compartiment van een McMastertelkamer.

5. Herhaal stappen 3 en 4 om het tweede compartiment van de McMastertelkamer te vullen.

N.B.: Meestal worden beide compartimenten gevuld (1) om een hogere gevoeligheid te bereiken, en (2) om een interne controle te verkrijgen op de gemaakte telling. De tellingen tussen beide compartimenten mogen niet veel van elkaar afwijken.

6. Laat de telkamer 1-2 minuten staan en tel het aantal eieren binnen het raster van beide compartimenten van de telkamer bij een vergroting van 10x10 (indien heel ervaren kan het ook bij 10x4). Het totale volume onder beide rasters is 0,3 ml (2x 0,15 ml).

N.B.: Het raster bestaat meestal uit 6 baantjes of laantjes. Eieren op de rasterlijnen of die de lijnen vanaf de binnenkant raken mogen worden meegeteld.

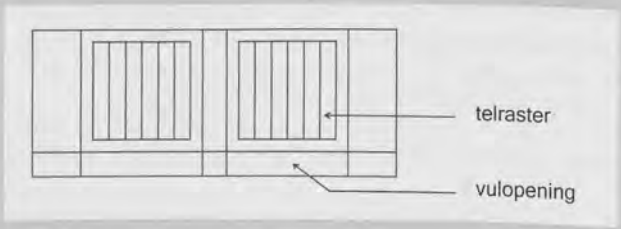


Fig. 1 *McMastertelkamer, waarbij het volume onder elk raster van 6 laantjes 0,15ml is.*

Het EPG of OPG (eieren of oöcysten per gram) is het totaal aantal getelde eieren in beide compartimenten vermenigvuldigd met 50. Immers: Het volume onder het raster in een compartiment is 0,15 ml. Er is 3 gram gesuspendeerd in 42 ml, wat samen 45 ml maakt. Dat is gelijk aan 1 gram in 15 ml. In één compartiment dus 1/100 deel van 1 gram. Er worden twee compartimenten geteld, dus gezamenlijk 1/50 deel van 1 gram.

De plakband techniek

Sommige Oxyuroidea (aarsmaden) leggen hun eieren niet in het darmlumen maar de vrouwtjes migreren naar de anus, kruipen naar buiten en zetten hun eieren met een kitsubstantie rond de anus af. Het is daarom minder zinvol om bij dieren verdacht van een infectie met zulke *Oxyuroidea* een fecesmonster te onderzoeken. Bij deze dieren kan de plakbandtechniek worden gebruikt. Een stukje doorzichtig plakband wordt met de plakkende kant tegen de anus gedrukt, op een voorwerpglaasje geplakt en microscopisch onderzocht op eieren. Het is een techniek die vooral bij de mens wordt toegepast voor het vaststellen van een infectie met aarsmaden. In de diergeneeskunde wordt deze techniek eigenlijk alleen gebruikt voor het aantonen van infecties met aarsmaden bij muizen, ratten en konijnen. Bij het paard komen ook aarsmaden voor. Hierbij hoeft de plakband methode vaak niet gebruikt te worden omdat vaak de afgezette clusters eieren al macroscopisch zijn te herkennen.

N.B.: Niet alle Oxyuroidea zetten hun eieren af rond de anus of cloaca. Dit is het geval bij Oxyuroidea voorkomend bij reptielen en o.a. lemuren. In zulke gevallen is het maken van een fecespreparaat wel zinvol.

De Baermann techniek

Bij longworminfecties, en bij sommige andere wormsoorten, treffen we meestal geen eieren maar larven in de feces aan. Longwormlarven onderscheiden zich van de andere fecesbestanddelen doordat ze **beweeglijk zijn**. Bij deze techniek wordt gebruik gemaakt van bezinkingsglazen. Dit is glaswerk wat onder in een punt toe loopt. Dit glas wordt gevuld met leidingwater en in het water wordt een fijnmazige zeef geplaatst. De te onderzoeken feces wordt in het water in de zeef gedaan. De Baermann techniek wordt uitgevoerd bij kamertemperatuur. De aanwezige larven kruipen uit de feces, door de zeef, zinken naar beneden en verzamelen zich onder in de punt. De niet beweeglijke fecesbestanddelen blijven op de zeef achter. Na 18-24 uur wordt het materiaal met een pipet uit de punt verzameld en vervolgens microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van larven.

Deze techniek kan ook kwantitatief worden uitgevoerd door het fecesmonster te wegen. Het resultaat wordt dan uitgedrukt in het aantal **larven per gram feces (LPG).**

De Baermann moet 18-24 uur na inzet worden uitgehaald. Dit mag niet veel eerder gebeuren omdat de larven de gelegenheid moeten hebben om de feces te verlaten en te bezinken. De Baermann mag niet langer dan 24 uur staan omdat er in het monster ook eieren van strongyliden en/of trichostrongyliden aanwezig kunnen zijn. In deze eieren ontwikkelt zich in 24 uur een larve die het ei na 24 uur verlaat. Deze larven worden ook met de Baermann techniek verzameld. Hiervoor geldt dat ze wel van longwormlarven te onderscheiden zijn maar het onderzoek vergt daardoor veel meer tijd.

Als de Baermann techniek correct is uitgevoerd en er larven worden gevonden, is sprake van een longworminfectie. Hierop is echter één uitzondering, namelijk bij een infectie met *Strongyloides. Strongyloides* eieren bevatten een larve die al binnen 24 uur het ei kan

verlaten en dus ook met de Baermann techniek wordt verzameld. Deze larven zijn echter gemakkelijk te herkennen omdat ze stil en gestrekt liggen. Longwormlarven zijn meestal beweeglijk en als ze stil liggen, liggen ze niet volledig gestrekt maar als een banaan of verder opgerold.

Voor verdere beoordeling van gevonden larven, kunnen enkele worden opgezogen en op een voorwerpglaasje geplaatst. Larven kunnen eventueel worden gedood/stilgelegd met een jodiumoplossing (klein druppeltje toevoegen zodat er een lichte geelbruine kleuring optreedt). Leg er een dekglas op en bekijk het preparaat onder de microscoop. Identificeer de larven aan de hand van lengte, staartvorm en eventueel kopvorm.

Uitvoering: Baermann techniek

1. Plaats een zeef in een Baermannglas.

N.B.: Dit is een glas steil aflopend in een puntbodem. De zeef kan worden vervangen door een dubbel gevouwen verbandgaas. Zie stap 3.

2. Vul het glas met leidingwater tot halverwege de zeef.

3. Doe de te onderzoeken feces in het water in de zeef.

N.B.: In geval van een gaas, doe de feces eerst op het gaas, vouw het gaas met de feces aan de hoekpunten op en steek hier een stokje of paperclip doorheen van voldoende lengte. Hang dit vervolgens in het water met het stokje uitstekend over de glasrand. Zorg ervoor dat er geen stukjes gaas over de glasrand gaan hangen zodat geen water wordt aangezogen en weglekt.

4. Laat de Baermann 18-24 uur bij kamertemperatuur staan.

N.B.: Voor Dictyocaulus larven is het minimum van 18 uur meestal wel nodig om larven te kunnen vinden. Voor de Franse hartworm bij hond of andere longwormen bij honden en katten kan, bij een sterk vermoeden, vaak al na enige uren worden gekeken of er larven zijn of niet. Indien niet, kan het glas vervolgens met rust worden gelaten tot de volgende ochtend. Een Baermann niet langer staan laten dan 24 uur in verband met het mogelijk uitkomen van strongylus-type eieren of Strongyloides eieren.

5. Haal de zeef enige centimeters omhoog en steek een pasteurse pipet met ingeknepen fiep (ballonnetje) tot onder in de punt van het glas. Laat de fiep los zodat de pipet zich volzuigt.

6. Haal de pipet uit het glas en knijp hem met de fiep leeg in een embryoblokje, horlogeglas of ander klein bakje. De inhoud van de zeef kan worden weggegooid en het glas en de zeef kunnen worden schoongespoeld.

7. Beoordeel de inhoud van het embryoblokje onder een prepareermicroscoop bij een vergroting van 20x tot 30x, of met een gewone microscoop bij 10x4.

De determinatie van wormeieren

Bij de determinatie van wormeieren en (oö)cysten wordt op de volgende kenmerken gelet.

1. **Grootte**
   Wormeieren en protozoaire (oö)cysten hebben een bepaalde grootte. Die grootte kan gemeten worden met een oculair micrometer. Wanneer een microscoop geen oculair micrometer heeft, kan de grootte aangeduid worden met groot (bijv. *Fasciola* ei), middelgroot (bijv. *Toxocara* ei) of klein (bijv. *Taenia* ei). Dit kan het best beoordeeld worden door de grootte te vergelijken met de dikte van de aanwijsnaald in het oculair.

Objectief	Dikte aanwijsnaald (µm)	Lengte aanwijsnaald (µm)
4x	50	2250
10x	20	900
40x	5	225
100x	2	90

De dikte en lengte van de aanwijswijsnaald bij verschillende vergrotingen voor de Nikon YS100 (onderwijsmicroscoop op de Faculteit Diergeneeskunde).

2. **Vorm**
   Wormeieren en (oö)cysten zijn meestal ovaal of rond. Andere vormen komen echter ook voor.

3. **Dikte wand**
   De wanddikte wordt aangegeven als dun of dik.

4. **Structuur van de wand**
   De wand kan aan de buitenkant glad zijn, maar ook voor het ei een typische structuur vertonen. Sommige eieren hebben één of twee poolproppen. Trematodeneieren hebben een operculum (deksel).

5. **Inhoud**
   De inhoud van nematodeneieren bestaat uit één cel (zygote), een morula (meerdere cellen of blastomeren en ziet eruit als een moerbei) of een larve. Cestodeneieren bevatten een hexacanth (=zes hakig) embryo. Eieren van de meeste trematoden bevatten een dooiermassa. De inhoud kan ook iets zeggen over het stadium van ontwikkeling van het ei.

6. **Kleur**
   Eieren kunnen een eigen specifieke kleur hebben. Soms zijn ze gekleurd door feces kleurstoffen.

Er bestaan tabellen voor de determinatie van wormeieren en (oö)cysten. Hoewel een makkelijk hulpmiddel, leert de ervaring dat het gebruik daarvan niet altijd leidt tot een juiste identificatie. Bovendien zijn de meeste wormeieren en (oö)cysten met enige oefening makkelijk te herkennen zonder determinatietabel. We zullen hier dan ook geen determinatietabellen geven.

Nematoda

Ascaroidea

De hieronder genoemde spoelwormeieren zijn **middelgroot**, hebben een **dikke wand** en bevatten **één grote cel** (zygote).

Ascaris	varken, mens	Ovaal, geknobbelde wand, bruin.
Parascaris	paardachtigen	Rond, gekorrelde wand, bruin. De eiwitlaag kan loslaten waardoor het ei gladwandig en kleurloos wordt.
Toxocara	hond, kat	Rond, "geschubde" wand (putjes zoals bij een golfbal), grote donkere zygote.
Toxascaris	hond, kat	Iets ovaal, gladde wand. Binnenste laag van de wand lamellair opgebouwd. Zygote meestal lichter dan bij *Toxocara.*
Ascaridia	vogels	Ovaal, gladde wand die vaak beplakt is met "vuil", donkere zygote maar lichter dan bij *Toxocara.*
Heterakis	vogels	Iets kleiner dan *Ascaridia* en met minder bolle wanden.

Oxyuroidea

Typisch voor deze groep is de vaak **asymmetrisch ovale vorm** en de aanwezigheid (niet bij alle soorten) van **één poolprop**. Verder zijn ze middelgroot, hebben meestal een dunne wand, bevatten een zygote, morula of larve en zijn licht van kleur.

Oxyuris	paardachtigen	Iets asymmetrisch, één poolprop.
Syphacia	muis, rat	Sterk asymmetrisch ('sinaasappelpartje'-vormig), geen poolprop, bevat larve.
Aspiculuris	muis, rat	Symmetrisch, ellipsoid, 'scherpe' polen, gladde wand, bevat morula.
Passalurus	konijn	Als Syphacia, maar met een onduidelijke morula, aan één pool operculum-achtige structuur.

Trichuroidea

De eieren van de Trichuroidea zijn middelgroot, ovaal, dikwandig, geel/bruin, en bezitten **twee poolproppen**.

Trichuris	herkauwers, varken hond, mens	Citroenvormig, symmetrisch, opvallende poolproppen, gladde wand.
Capillaria	herkauwers, vleeseters, vogels	Tonvormig, meestal asymmetrisch, minder opvallende poolproppen (wat afgeplat), ruwe wand.

Stongyloidea

Strongylus-type	alle diersoorten	Middelgroot, ovaal, dunwandig, bevat morula.
Nematodirus	herkauwers	Als strongylus-type maar groot, een wat dikkere wand en donkere morula met 8 grote blastomeren, ovaal of ruitvormig, rondom morula kleurloos.
N. battus	herkauwers	Als andere *Nematodirus* maar (licht)bruin, langwerpig.
Syngamus	vogels	Als strongylus-type maar met twee kleine poolpropjes.

Rhabditoidea

Strongyloides	alle diersoorten	Klein, rond of ovaal, dunne wand, bevat U-vormig larfje, lichtgrijs van kleur (lichter dan strongylus-type).

Trematoda

De eieren van de trematoden bezitten een **operculum,** zijn ovaal, meestal dunwandig en bevatten vaak een dooiermassa.

Fasciola	planteneters	Groot, dunwandig, egale dooiermassa, geel.
Paramphistomum	herkauwers	Groot, dunwandig, wolkige dooiermassa, zilvergrijs.
Dicrocoelium	herkauwers	Klein, donker bruinrood gekleurd, asymmetrisch, met moeilijk te onderscheiden miracidium, onduidelijk operculum.

Cestoda

De eieren van de cestoden bevatten een hexacanth (= zeshakig) embryo.

Dipylidium	hond, kat	Een aantal kleine min of meer ronde eieren in een ovaal pakketje ('poffertjespan').
Taenia	vleeseters, mens	Klein, rond, dikke roodbruine radiair gestreepte wand.
Echinococcus	hond	Als *Taenia*.
Moniezia	herkauwers	Middelgroot, rond, ovaal, vierkant of driehoekig, embryo peervormig omhulsel, meestal dikke wand.
Anoplocephala	paardachtigen	Als *Moniezia*, soms ook 'hoefijzer'-vormig.
Diverse soorten	vogels, kleine knaagdieren	Rond tot ellipsoïd, dikke gladde schaal, haken van embryo vaak duidelijk te zien.

Protozoaire (oö)cysten

Protozoaire (oö)cysten zijn in het algemeen kleiner dan wormeieren, maar er zijn ook enkele soorten die grote (oö)cysten vormen.

Eimeria	planteneters, omnivoren	Op een enkele uitzondering na kleiner dan wormeieren, ovaal of rond, bevatten sporoblast. Na sporulatie vier sporocysten met daarin elk 2 sporozieten. Ruimte tussen wand en sporoblast meestal licht roze tot licht blauw/paars. Al of niet met micropyle (structuur aan 1 pool in de wand, eventueel met dekseltje).
Eimeria intricata	schaap	Afwijkend van de andere *Eimeria*, even groot als *Strongyloides*, dikke wand, met micropyle, geelbruin.
(Cysto)Isospora	hond, kat, varken	Als Eimeria, maar geen micropyle en na sporulatie twee grote duidelijke sporocysten met daarin elk 4 sporozieten.

De cysten van Eimeria en (Cysto)Isospora worden **oöcysten** genoemd.

Balantidium	varken	Groot, rond, dunwandig, grijsbruin, met gefagocyteerde deeltjes.
Buxtonella	rund	Als *Balantidium*.
Giardia	alle diersoorten	Kleine lichte cyste, ovaalrond, kenmerkend ingeklapt in flotatiemedium met hoge dichtheid.

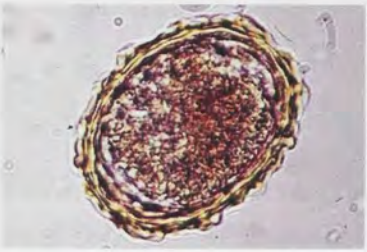
L1-larven van longwormen

Alle *Dictyocaulus* spp. bezitten **donkere voedselgranula.** Deze zijn niet aanwezig bij de andere longwormlarven.

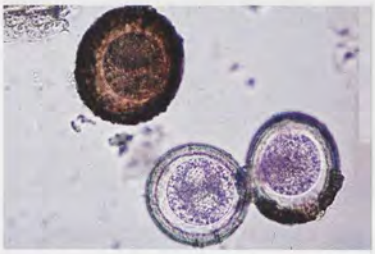
Dictyocaulus viviparus	rund	Spitse staart.
D. filaria	kl. herkauwers	Stompe staart, knobbeltje op de kop.
D. arnfieldi	paardachtigen	Stompe staart met stekel in het verlengde.
Muellerius	kl. herkauwers	Kleiner dan *Dictyocaulus*, geen darmgranula, knik in de staartpunt, bij begin knik stekeltje.
Protostrongylus	kl. herkauwers	Als *Muellerius* maar zonder stekel.
Aelurostrongylus	kat	Als *Muellerius* en enige darmgranulatie, knik in staart punt is S-vormig met 2 knobbeltjes.
Angiostrongylus	hond, vos	'Franse' hartworm, als *Aelurostrongylus* met dunnere knik en zonder knobbeltjes.
Crenosoma	hond, vos	Klein afplatting bij begin staartpunt maar verder recht, zonder knik en zonder stekeltje.

Nematoda

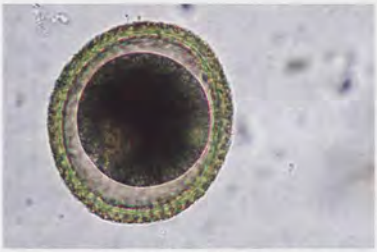
Ascaroidea



Ei *Ascaris* (varken, mens): ± 50 x 60 µm

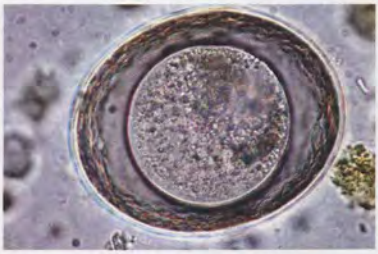


Eieren *Parascaris equorum* (paardachtigen): ± 90 x 100 µm (twee eieren zonder eiwitmantel)

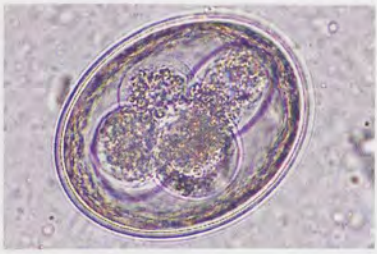


Ei *Toxocara* (hond,kat): ± 70 x 85 µm

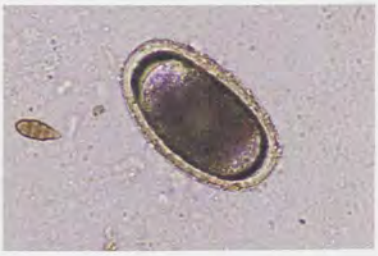
Ei *Toxocara* met larve (hond, kat)



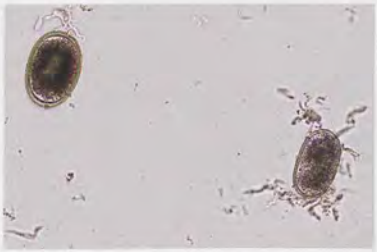
Ei *Toxascaris leonina* (hond, kat): ± 75 x 85 µm



Ei *Toxascaris* 4-cellig stadium



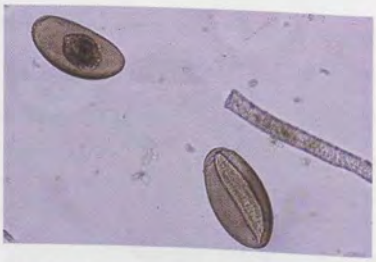
Ei spoelworm (vogels): ± 45 x 75 µm



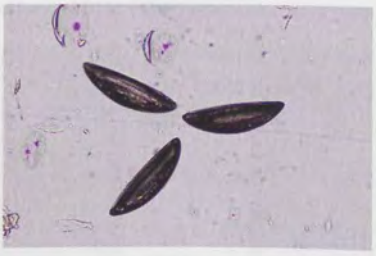
Ei *Ascaridia* en *Heterakis* (pluimvee): ± 50 x 75 µm en ± 40 x 65 µm

Oxyuroidea

Ei *Oxyuris equi* (paardachtigen): ± 45 x 85 µm



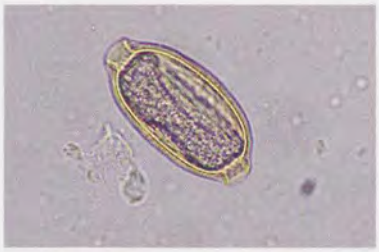
Ei *Oxyuride* (leguaan): ± 45 x 85 µm



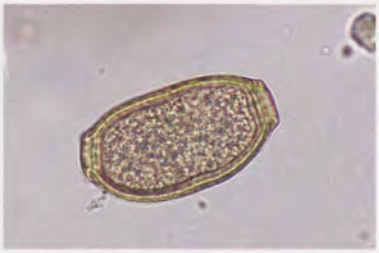
Ei *Syphacia* (knaagdieren): ± 35 x 120 µm

Trichuroidea

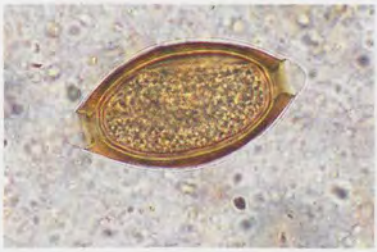
Ei *Capillaria* (uit hond):
± 30 x 60 µm



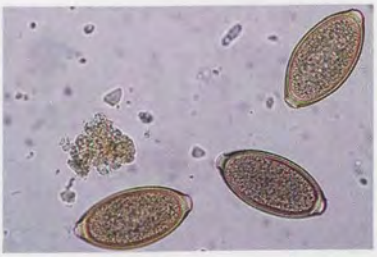
Ei *Capillaria* (uit hond):
± 25 x 55 µm



Ei *Capillaria* (vogels): ± 25 x 55 µm

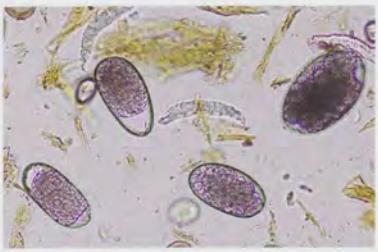


Ei *Trichuris ovis* (herkauwers):
± 40 x 75 µm



Eieren *Trichuris vulpis* (hondachtigen): ± 35 x 80 µm
(poolproppen naar binnen gedrukt door flotatiemedium)

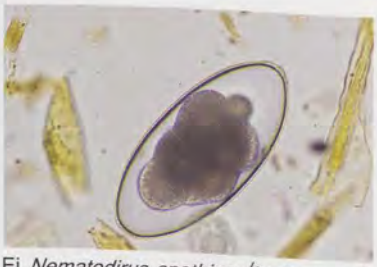
Stronglyloidea



Eieren strongylus-type (alle diersoorten): ± 40 x 80 µm met aanzienlijke verschillen in grootte

Ei *Nematodirus filicollis* (herkauwers): ± 80 x 150 µm

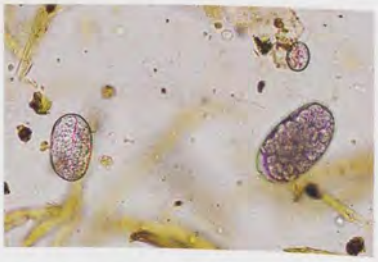
Ei *Nematodirus battus* (herkauwers): ± 70 x 150 µm



Ei *Nematodirus spathiger* (herkauwers): ± 100 x 190 µm

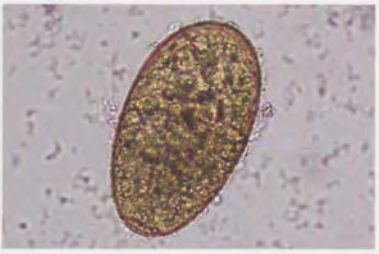
Ei *Syngamus* (vogels): ± 45 x 90 µm

Rhabditoidea

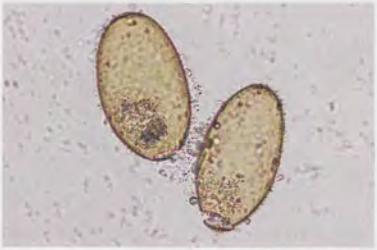


Ei *Strongyloides* (alle diersoorten): ± 35 x 45 µm (rechts een strongylus-type ei)

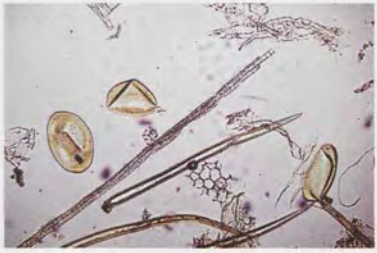
Trematoda



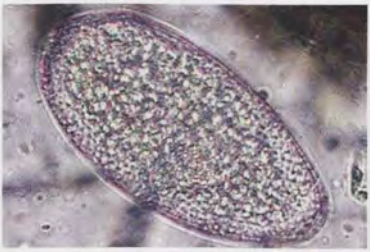
Ei *Fasciola hepatica* (schaap, planteneters):
± 80 x 140 µm



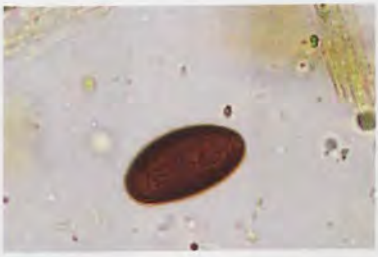
Eieren *Fasciola* met duidelijk
zichtbaar operculum



Eieren *Fasciola* ingeklapt in flotatiemedium

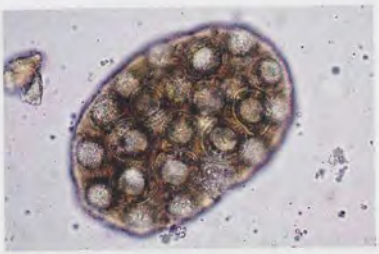


Ei *Paramphistomum* (herkauwers):
± 80 x 140 µm



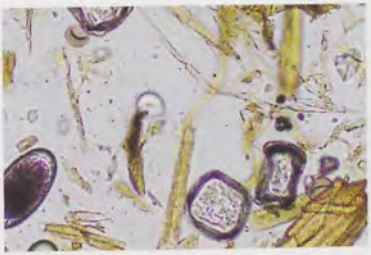
Ei *Dicrocoelium* (herkauwers):
± 25 x 40 µm

Cestoda

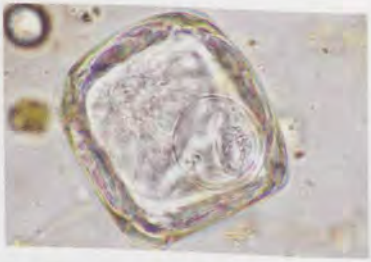


Eipakket *Dipylidium* (hond, kat): ± 45 µm

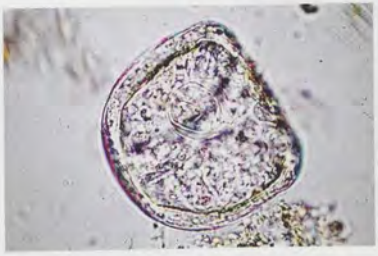
Ei *Taenia* (vleeseters, mens): ± 30 µm



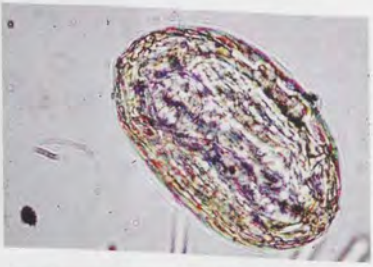
Eieren *Moniezia* (herkauwers): ± 70 µm



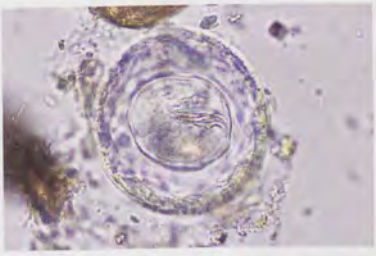
Ei *Moniezia* met goed zichtbaar pyriform hexacanth embryo



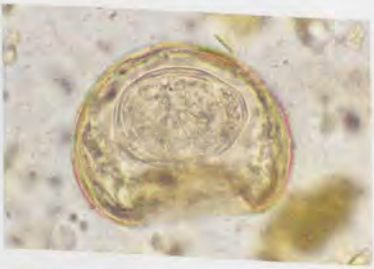
Ei *Anoplocephala* (paardachtigen): ± 70 µm



Ei *Paranoplocephala* (paardachtigen): ± 55 µm

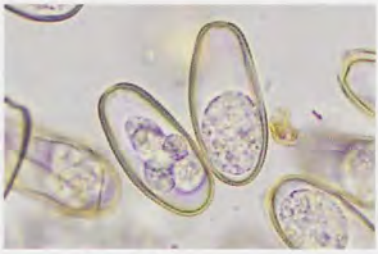


Ei *Raillietina* (vogels, hier uit kip): ± 40 µm

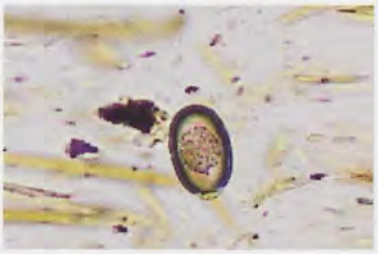


Ei lintworm (vogels, hier gevonden in feces hond): ± 50 µm (licht opgevouwen wand door flotatiemedium)

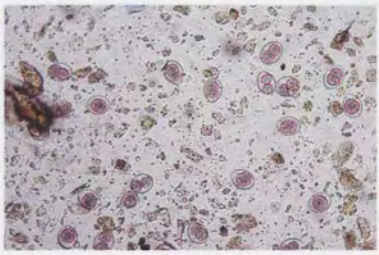
Protozoa



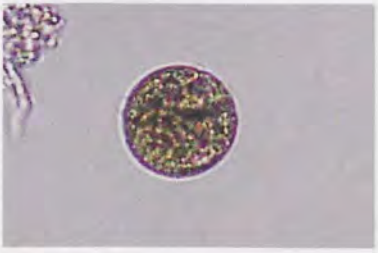
Oöcysten *Eimeria* (planteneters, omnivoren): ± 12-45 µm afhankelijk van soort, ongesporuleerd (rechts) en gesporuleerd (links)



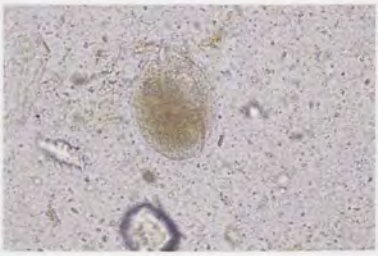
Oöcyst *Eimeria intricata* (schaap): ± 35 x 45 µm



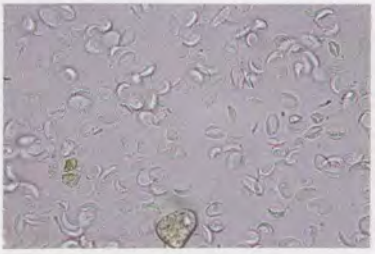
Oöcysten *(Cysto)isospora* (hond, kat, varken): ± 30 x 40 µm of ± 20-25 µm (ongesporuleerd en gesporuleerd)



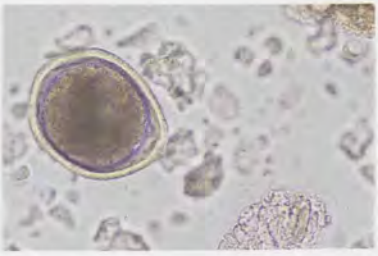
Cyste *Balantidium* (varken): ± 40-60 µm



Trophozoiet *Buxtonella* (rund): ± 50-150 µm



Cysten *Giardia* (alle diersoorten): ± 10 x 20 µm (ingeklapt door flotatiemedium)



Cysten *Giardia* en een *Toxocara* ei

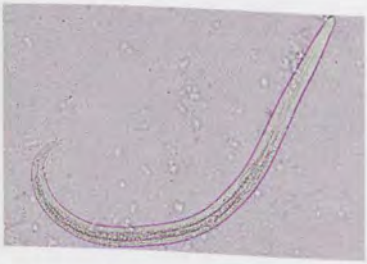
Cyste *Giardia* en een gesporuleerde *Eimeria* oöcyst

L1 Larven (long)wormen

L1 *Dictyocaulus viviparus* (rund):
300-360 µm

L1 *Dictyocaulus filaria* (kleine herkauwers):
490-520 µm

L1 *Dictyocaulus arnfieldi* (paardachtigen):
420-480 µm



L1 *Aelurostrongylus abstrusus* (kat):
360-400 µm

L1 *Angiostrongylus vasorum* (hond, vos):
310-400 µm

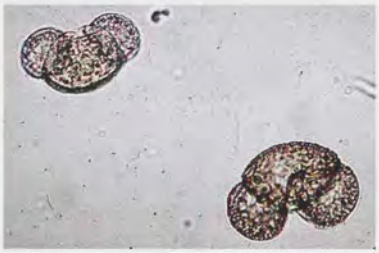
Staart van *Angiostrongylus vasorum*

L1 *Crenosoma* (hond, vos):
250-310 µm

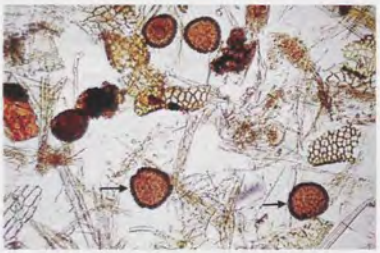
Staart van *Crenosoma*

Andere structuren in fecespreparaten

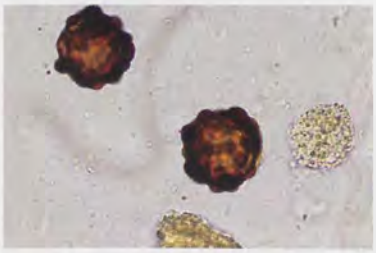
Ciliaten in feces paard



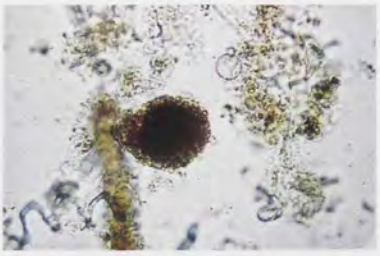
Pollenkorrels van dennen



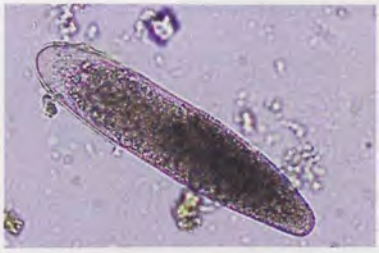
Pollenkorrels



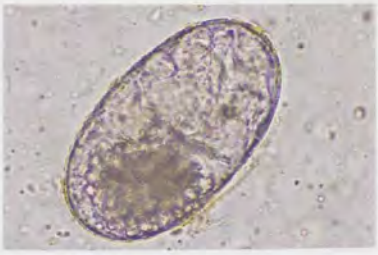
Op *Ascaris* lijkende stuifmeelkorrels



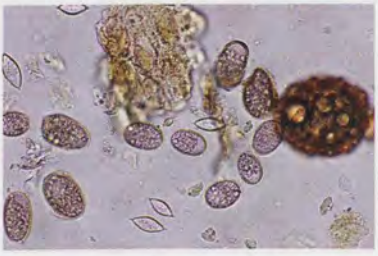
Iets plantaardigs, geen spoelwormei



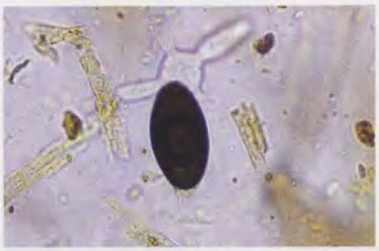
Mijtenei in feces python



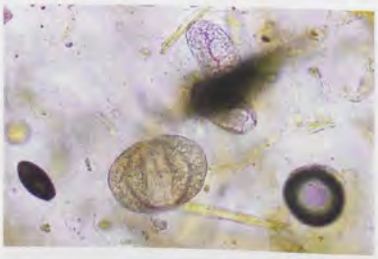
Mijtenei in feces hond



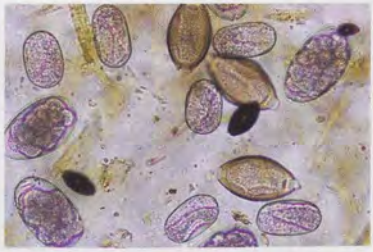
Monocystis cysten (protozo van regenwormen) in feces hond (ook *Isospora* oöcysten en pollenkorrel)



Schimmelspore lijkend op *Dicrocoelium* ei



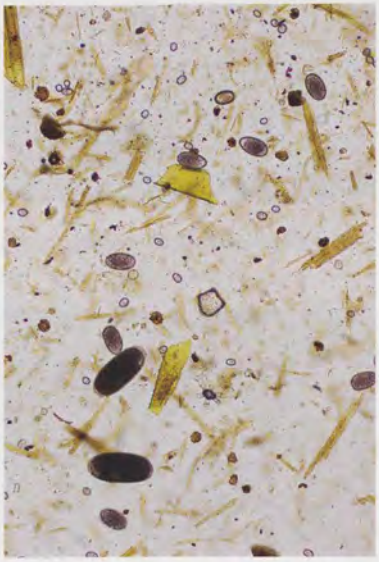
Schimmelspore, pollenkorrel van een den, luchtbel en *Strongyloides* eieren



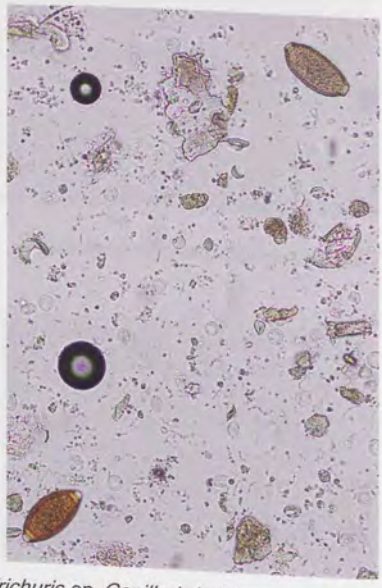
Schimmelsporen en eieren van *Trichuris*, *Strongyloides* en strongylus-type

Planten- of grashaar, geen larve

Menginfecties



Vijf typen eieren en oöcysten in feces van een schaap



Trichuris en *Capillaria* in feces van een aap

HUIDONDERZOEK

Het onderzoek naar ectoparasieten en dermatofyten

PARASITOLOGISCH ONDERZOEK VAN DE HUID

Inleiding

De Arthropoda (geleedpotigen) vormen qua aantal soorten het phylum met het grootste biologische succes binnen het dierenrijk. Een deel van de arthropoda heeft zich in meer of mindere mate gespecialiseerd in een parasitaire levenswijze. In dit gedeelte beperken we ons tot enkele groepen of soorten die voor de eerstelijns diergeneeskunde in ons land van belang zijn.

Monstername

Diagnostiek ter bevestiging van een parasitaire arthropoden infectie van een dier begint bij de juiste monstername. Hiervoor bestaat een aantal technieken:

- Inspectie van vacht en huid
- Plukmonster van haren
- Oppervlakkig huidafkrabsel
- Diep huidafkrabsel
- Plakbandmonster
- Stofzuigmonster

Inspectie van de huid

Bij inspectie van de huid kunnen door middel van een systematisch onderzoek van haren en huid, gebruik makend van een ellenboogpincet, eventueel aanwezige macroscopische parasieten of producten hiervan en eventuele huidafwijkingen gevonden worden. Macroscopisch zichtbaar zijn onder andere: luizen, neten, vliegenlarven, vlooien, teken, grote mijten (bijv. *Dermanyssus gallinae*), het gebruik van een vergrootglas is aan te bevelen. Bij het aantreffen van ectoparasieten kunnen deze voor microscopische determinatie worden verzameld.

Plukmonster van de huid

Wanneer er neten aanwezig zijn, of ook wanneer er geen ectoparasieten macroscopisch worden waargenomen, kunnen aan de rand van de aangetaste gebieden haren en eventueel schilfermateriaal worden geplukt en verzameld in bijvoorbeeld een petrischaaltje om deze onder een prepareermicroscoop (figuur 1) te onderzoeken. Op deze manier zijn eitjes van vliegen of sommige soorten mijten, neten en langpotige schurftmijten te identificeren. Door deze uit het monster te vangen en ze onder een gewone microscoop verder te determineren kan het genus van de gevonden soort bepaald worden.

Fig. 1 *Prepareermicroscoop*

Oppervlakkig huidafkrabsel

Een alternatief voor de plukmonsters met een grotere trefkans op het vinden van oppervlakkig levende mijten (langpotige schurftmijten) is het nemen van een oppervlakkig huidafkrabsel met een scherpe lepel. Hierbij wordt van een oppervlakte van een paar cm^2 met lichte druk

de bovenste laag van de huid inclusief aanwezige schilfers en haren geschraapt. Om het geschraapte product bij elkaar te houden kan de scherpe lepel eerst worden bevochtigd met een minerale olie zodat het product hieraan plakt. Dit kan, afhankelijk van de hoeveelheid, in bijvoorbeeld een petrischaaltje onder een prepareermicroscoop worden bekeken of eerst worden opgewerkt door het te verwarmen met een KOH oplossing (10%) of direct onder een lichtmicroscoop worden bekeken. Het resultaat is een kale hyperemische plek van de huid, maar het gaat niet "tot bloedens toe".

Diep huidafkrabsel

Bij een diep huidafkrabsel wordt er met een scherpe lepel wel een huidafkrabsel tot bloedens toe genomen. Dit kan worden toegepast wanneer gravende mijten (kortpotige schurftmijten) worden verwacht die in de diepere lagen van de huid aanwezig zijn. Sommige van deze mijten kunnen zeer lastig te vinden zijn en er dient in het geval van een verdenking van een infectie met *Sarcoptes scabiei* bij de hond ook een groot aantal monsters genomen te worden om met enige mate van zekerheid een negatieve uitslag af te kunnen geven. Het product van een diep afkrabsel kan eerst verder worden opgewerkt door het te verwarmen in een KOH oplossing (10%) of direct onder een lichtmicroscoop worden bekeken.

Plakbandmonster

Bij ectoparasitaire infecties waarbij een gering aantal oppervlakkig levende mijten wordt verwacht kan men gebruik maken van een plakbandmonster of (afhankelijk van de grootte van het dier) een stofzuigmonster. Infecties met *Cheyletiella* spp. zijn hier een goed voorbeeld van waarna in het product microscopisch gekeken wordt naar aanwezige mijten of eieren aan de haren. De plakbandmethode is gebaseerd op het aanbrengen van goed doorzichtig plakband op een zone van de huid (niet in de buurt van kwetsbare plekken zoals, ogen, okselhuid, etc.). De plakbandstrip wordt licht aangedrukt en vervolgens verwijderd en op één of enkele voorwerpglaasje(s) geplakt. Hiermee worden schilfers en losse haren meegenomen en mogelijk ook de beoogde mijten.

Stofzuigermonster

Voor het stofzuigmonster is het raadzaam om een chirurgisch mondkapje tussen het mond-stuk en de slang van de stofzuiger te plaatsen. Indien een dier angst heeft voor het geluid van de stofzuiger is een extra lange stofzuigerslang, een centraal afzuigsysteem of het plaatsen van een stofzuiger in een kast met gat voor de slang aan te raden. Het dier kan over een groot oppervlakte bemonsterd worden waarbij de kop van het dier moet worden vermeden. Na het stofzuigen van het dier, dient het mondkapje voorzichtig tussen slang en mondstuk te worden verwijderd en kan het product in een KOH oplossing (10%) worden verwerkt of direct onder een prepareermicroscoop worden onderzocht. Figuur 2 geeft het product weer van een succesvol genomen stofzuigmonster.

Fig. 2. *Product van een stofzuigmonster met gebruik van een chirurgisch mondkapje.*

Bij elke vorm van monstername is het, om de trefkans op het vinden van aanwezige ectoparasieten bij dieren zonder duidelijke laesies te vergroten, van belang de voorkeurslocaties van de verschillende parasieten mee te nemen in de bemonstering. Verder is het als regel van belang om niet te ernstig aangetaste en nog niet behandelde delen van de huid te bemonsteren, maar dit kan per agens verschillen.

Wanneer in een afgenomen monster een ectoparasiet wordt aangetroffen kan deze met een fijne pincet (voor de grotere soorten) of met behulp van een in de minerale olie gedipt prepareernaaldje worden overgebracht op een voorwerpglaasje met daarop een druppel minerale olie of 10% KOH oplossing (in dit laatste geval dient het te worden verwarmd, maar niet droog laten dampen). Hierna een dekglaasje er op aanbrengen en bekijken onder een lichtmicroscoop.

Determinatie

Arthropoda of **geleedpotige dieren** zijn in principe opgebouwd uit segmenten met gepaarde gelede lichaamsaanhangsels en hebben een stevig chitineus exoskelet. De segmenten zijn bij de embryonale ontwikkeling nog zichtbaar, maar kunnen daarna in meer of mindere mate samensmelten. De gelede lichaamsaanhangsels hebben bijvoorbeeld een sensorische functie (antennes en tasters), een functie bij de voeding (monddelen: cheliceren en palpen bij mijten en teken of kaken en mondtasters bij de insecten) of bij de voortbeweging (poten). De parasitaire arthropoda van mens en dier zijn te onderscheiden in twee groepen, die verschillen in de graad van samensmelting van de segmenten. Het zijn de klasse van de **Insecta (= Hexapoda)** en de orde van de **Acarina** (de mijten en de teken).

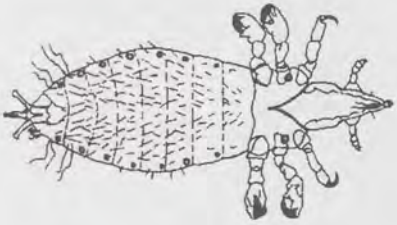
De adulte insecten hebben een duidelijke onderverdeling in **kop**, een **thorax** met **3 paar poten** en een **geleed abdomen**. Een dergelijke indeling wordt niet gevonden bij de Acarina, waar de versmelting van de segmenten veel verder is doorgevoerd (figuur 3 a-h). Het **capitulum** (hoofdje) of **gnathosoma** bij de Acarina is meestal niet veel meer dan de aanhechtingsplaats voor de monddelen en is niet of nauwelijks afgescheiden van de rest van het lichaam. In de rest van het lichaam is bij de Acarina de segmentatie verdwenen, afgezien van de gelede lichaamsaanhangsels. Adulte Acarina hebben **4 paar poten**, maar het **larvale** stadium vaak maar 3 paar.

Voor het determineren tot op het niveau van "genus" kan gebruik worden gemaakt van de in dit hoofdstuk weergegeven determinatietabel. De in de tekst vermelde afbeeldingen zijn te vinden na de determinatietabel. Sommige geleedpotigen zijn zeer gastheerspecifiek. Een goed voorbeeld hiervan zijn de luizen. Het is van belang om hier later in de praktijk rekening mee te houden voor wat betreft de interpretatie van een positieve diagnose.

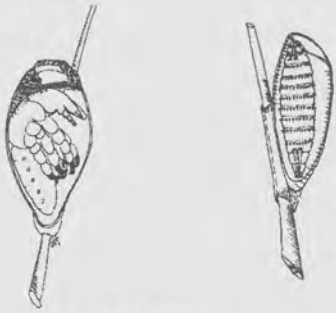
Fig. 3 a-d *Insecta*

a. vlieg

b. vlo



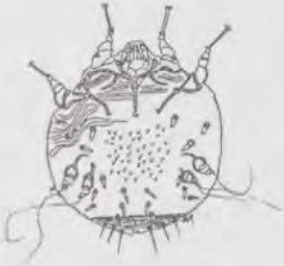
c. luis



d. neet en horzelei

Fig. 3 e-h *Acarina*

e. langpotige schurftmijt



f. kortpotige schurftmijt

g. larve van een teek

h. mijt

Determinatietabel parasitaire arthropoden van veterinair belang:

1. -Volwassen vormen met indeling in kop - thorax - abdomen. Aan de thorax zitten 3 paar poten (figuur 3)
   .....klasse **Hexapoda**, ga verder met → 2

   -Volwassen vormen zonder indeling in kop-thorax-abdomen. 4 paar poten (larven 3 paar poten) (figuur 3)
   .....klasse **Acarina**, ga verder met → 9

2. -Lichaam zijdelings samengedrukt. Krachtige springpoten. In een lateraal aanzicht steken alle poten uit aan de ventrale zijde
   .....orde **Vlooien**, ga verder met → 3

   -Lichaam dorsoventraal samengedrukt. In een dorsaal aanzicht steken de poten links en rechts uit
   .....orde Luizen, ga verder met → 4

3. -Ctenidiën langs de onderrand van de kop, rond de monddelen; ctenidiën ook langs de achterrand van het eerste thoracale segment, de prothorax (figuur 4); op o.a. hond, kat
   ..... ***Ctenocephalides***

   -Ctenidiën alleen langs de achterrand van de prothorax (figuur 5); op o.a. kippen
   ..... ***Ceratophyllus***

4. -Kop smaller dan thorax, stekende monddelen (zuigbuis), antennes 5-ledig, aan pooteinde één klauw (figuur 6-8)
   .....suborde **Anoplura**, ga verder met → 5

   -Kop breder dan de thorax, bijtende monddelen (kaken), antennes zijn 3-, 4- of 5-ledig, aan pooteinde één of twee klauwtjes (figuur 9 -14)
   .....suborde **Mallophaga**, ga verder met → 6

5. - Alle poten even lang, met ongeveer even grote haken. Grote luizen (figuur 6); op o.a. varken, rund
   ..... ***Haematopinus***

   - Voorste paar poten wat kleiner dan de andere paren, klauwen van de voorste poten niet zo fors, stigmata op de segmenten van abdomen weinig opvallend, ze steken niet buiten de lichaamsrand uit (figuur 7); op o.a. rund, geit, hond
   ..... ***Linognathus***

-Voorste paar poten wat kleiner dan de andere paren, klauwen van de voorste poten niet zo fors, stigmata op de segmenten van abdomen vallen op, doordat ze op een verhevenheid liggen en daardoor buiten de lichaamsrand uitsteken (figuur 8); op rund

..... ***Solenopotes***

6. -3-ledige antennes, één klauwtje per poot (figuur 9, 10, 11, 12)

..... **zoogdiermallophagen**, ga verder met → 7

-4- of 5-ledige antennes, twee symmetrisch geplaatste klauwtjes per poot (figuur 13, 14) ..... . **vogelmallophagen**, ga verder met → 8

7. - Kop ongeveer even breed als lang, van voren vrij rond, abdomen behaard (figuur 9 a-b) op o.a. rund, geit, paard

..... ***Damalinia (syn. Bovicola)***

- Kop ongeveer 1½ maal zo breed als lang, van voren afgeplat, abdomen behaard (figuur 10, 11) op honden

..... ***Trichodectes***

- Kop aan de voorzijde driehoekig en spits uitlopend, abdomen spaarzaam behaard (figuur 12); op katten

..... ***Felicola***

8. - Kop, thorax en abdomen langgerekt en slank, antennes 5-ledig (figuur 13); op duiven

..... ***Columbicola***

- Kop driehoekig, plomp lichaam, antennes 4-ledig (figuur 14); op kippen

..... ***Menacanthus***

---

9. - Acarina zonder hypostoom (figuur 15 a)

..... **Mijten**, ga verder met → 10

- Acarina met een hypostoom (figuur 15 b)

..... **Teken**, ga verder met → 18

10. - Duidelijke stigmata zichtbaar tussen 3e en 4e potenpaar, relatief grote ovale mijten; poten op de voorste lichaamshelft, geplaatst in twee groepen van 4 (figuur 16); op vogels..... ***Dermanyssus***

- Niet aldus....., ga verder met → 11

11. -Kleine wormvormige mijten (figuur 17), poten geplaatst in twee groepen van vier; elke poot heeft 3 moeilijk zichtbare geledingen; op o.a. hond
..... ***Demodex***

- Min of meer ronde niet wormvormige mijten, poten geplaatst in vier groepen van twee, meer dan 3 geledingen per poot (figuur 18-25)
....., ga verder met → 12

12. -Palpen eindigend in een naar binnen gebogen geribde forse klauw. Gnathosoma ("kop") duidelijk te onderscheiden van de rest van het lichaam. Poten eindigen in een stevig haar (figuur 18); op o.a. hond, kat en konijn
..... ***Cheyletiella***

-Niet aldus (figuur 19 a-b)..... **Schurftmijten,** ga verder met → 13

13. -**Langpotige mijten,** zuignapstelen (figuur 20) aan de poten zijn kort of lang (figuur 21, 22), 3e en/of 4e poten steekt duidelijk buiten het achterlijf uit.
....., ga verder met → 14

-**Kortpotige mijten** (3e en 4e paar poten steken niet of nauwelijks uit buiten de lichaamsomtrek). Zuignapstelen aan de poten zijn lang (figuur 23-25); ♀ van *Knemidokoptes* zonder zuignapstelen
....., ga verder met → 16

14. -Zuignapstelen lang, geleed, ♂♂ met driehoekige abdominaallobben (figuur 15 a, 20 a), op o.a. konijn, herkauwers
..... ***Psoroptes***

-Zuignapstelen kort, ongeleed (figuur 20 b, 21-22)
....., ga verder met → 15

15. -Abdominaallobben van ♂♂ rechthoekig, 4e paar poten van het ♀ normaal (figuur 21); op o.a. herkauwers, paard
..... ***Chorioptes***

-Abdominaallobben van het ♂ afgerond en weinig opvallend, 4e paar poten van het ♀ rudimentair (figuur 22 a-b); in oren van hond, kat, fret
..... ***Otodectes***

16. -Dorsaal in voorste lichaamshelft een u-vormig chitineus steunapparaat (figuur 23), poten van het mannetje relatief lang; op vogels
..... ***Knemidokoptes***

-Geen chitineus steunapparaat; op zoogdieren
....., ga verder met → 17

17. - Anus achter aan het lichaam, op de voorste lichaamshelft links en rechts 3 stekels geplaatst in een driehoek, ♀♀ met scherpe driehoekige schubjes op de rug (figuur 24 a-b); op o.a. hond, rund, varken
..... ***Sarcoptes***

- Anale opening dorsaal, geen stevige stekels op voorste lichaamshelft, schubjes op rug van ♀♀ afgerond, soms ontbrekend, schubjes steeds afwezig bij ♂♂ (figuur 25); op o.a. kat, muis
..... ***Notoedres***

18. - Teken met een rugschild (figuur 15 b), **harde teken**
..... **Ixodidae**, ga verder met → 19

- Teken zonder rugschild, **zachte teken**, capitulum alleen van ventraal gezien zichtbaar (figuur 26); op vogels
..... ***Argas***

19. - Lange monddelen, anaalgroeve vóór om de anus heenlopend, géén ogen
..... ***Ixodes***

- Korte monddelen, anaalgroeve achter om de anus heen lopend (figuur 27), ogen al of niet aanwezig
....., ga verder met → 20

20. - Schild met netwerk van witte strepen en vlekken, ogen aanwezig (figuur 27, ventraal-aanzicht, dus schild niet zichtbaar op figuur)
..... ***Dermacentor***

- Schild egaal van kleur
....., ga verder met → 21

21. - Géén ogen, zijkanten van de palpen uitstekend buiten de basis van het capitulum
..... ***Haemaphysalis***

- Ogen aanwezig (figuur 15 b), basis van het capitulum breder dan beide palpen samen
..... ***Rhipicephalus***

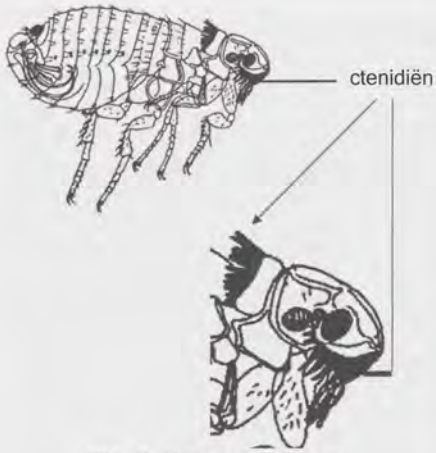


Fig. 4. *Ctenocephalides*

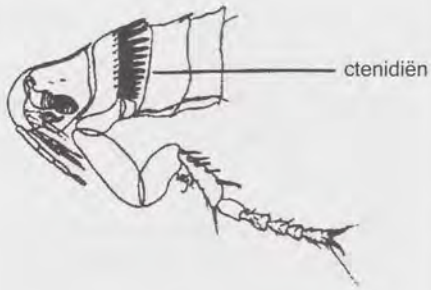


Fig. 5. *Kop en thoracale segmenten van Ceratophyllus*

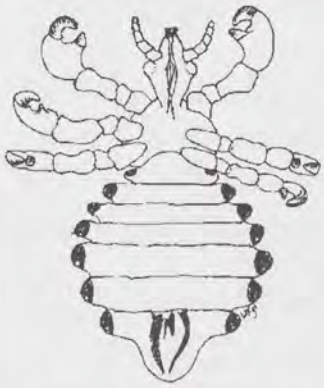
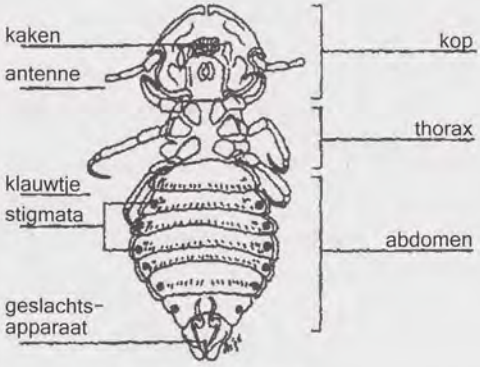


Fig. 6. *Haematopinus*

Fig. 7. *Linognathus*

Fig. 8. *Solenopotes*



a. ♂ *Damalinia*

b. ♀ *Damalinia*

Fig. 9. *Morfologische kenmerken van luizen*

Fig. 10 kop ♂ Trichodectes

Fig. 11 ♀ Trichodectes

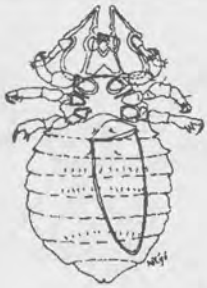


Fig. 12 ♀ Felicola

Fig. 13 ♀ Columbicola

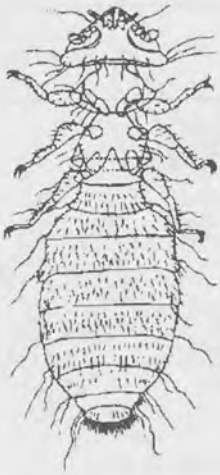


Fig. 14 ♀ Menacanthus

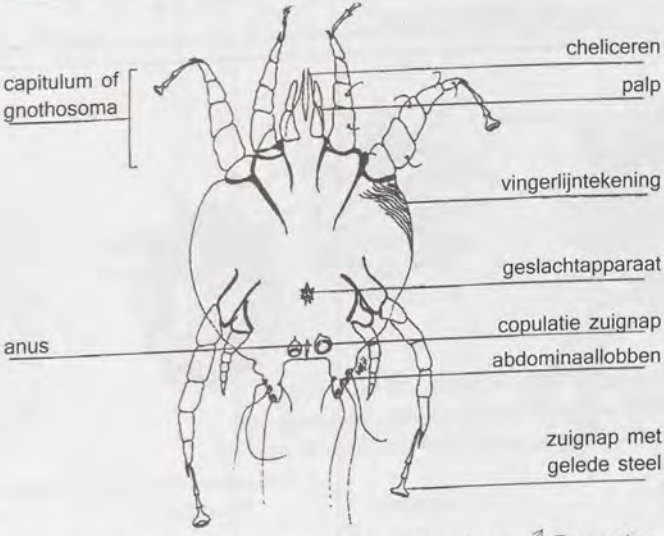


Fig. 15 a Morfologische kenmerken van mijten; ♂ Psoroptes

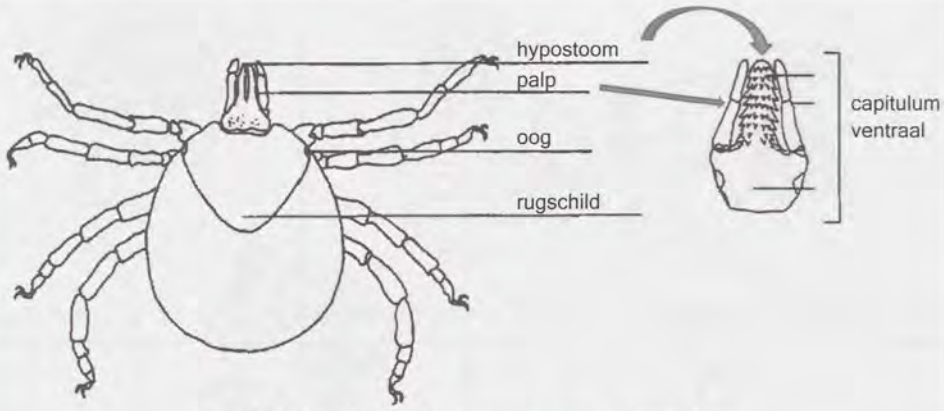
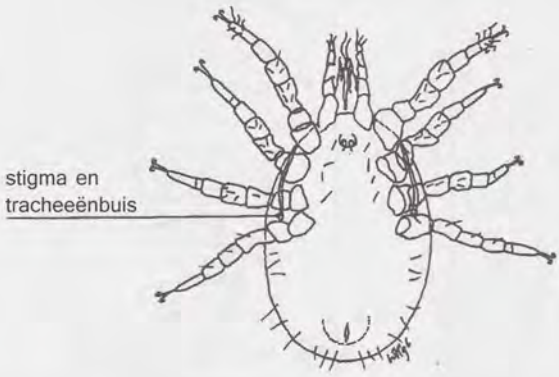


Fig. 15 b *Morfologische kenmerken van harde teken*



Fig, 16. *Dermanyssus*

Fig. 17. *Demodex*

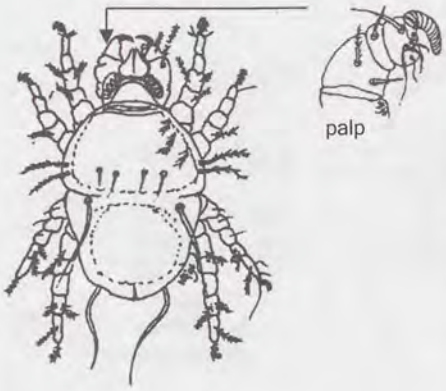
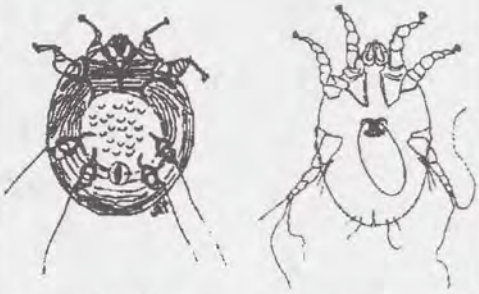


Fig. 18. *Cheyletiella*



a kortpotige schurftmijt *Notoedres*

b langpotige schurftmijt *Otodectes*

Fig. 19. *a + b Schurftmijten*

a lang geleed

b kort ongeleed

c lang ongeleed

Fig. 20. *a, b, c Zuignappen aan de pooteinden van schurftmijten*

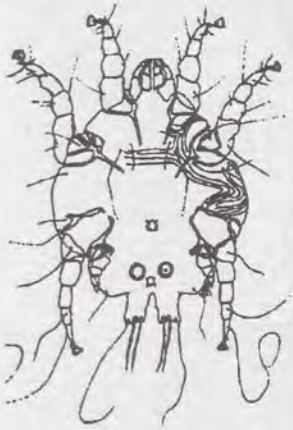
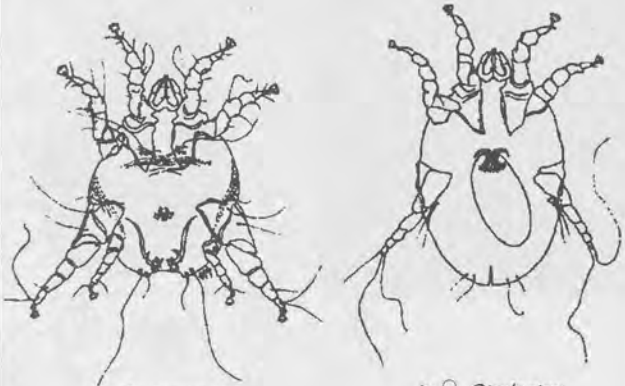


Fig. 21. *♂ Chorioptes*



a ♂ *Otodectes*

b ♀ *Otodectes*

Fig. 22. *a, b Otodectes*

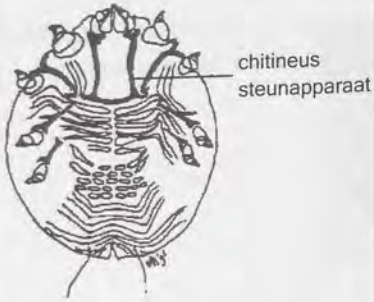
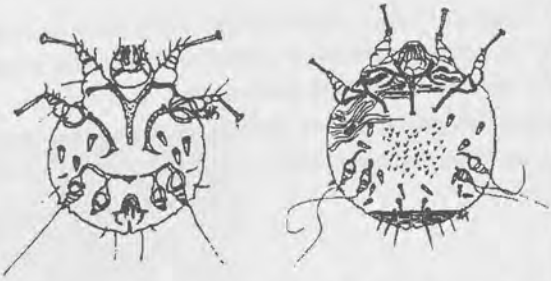


Fig. 23. *Knemidokoptes*



Het ventrale en dorsale aanzicht zijn in beide tekeningen gecombineerd, dus de dorsale structuren (stekels op de rug) zijn in deze tekeningen even goed zichtbaar als de anus.

a ♂ *Sarcoptes*

b ♀ *Sarcoptes*

Fig. 24. *a, b Sarcoptes*

Fig. 25. *♀ Notoedres dorsaal aanzicht*

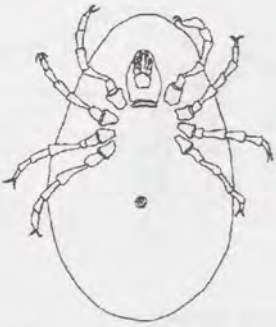


Fig. 26. *Argas, zachte teek ventraal aanzicht*

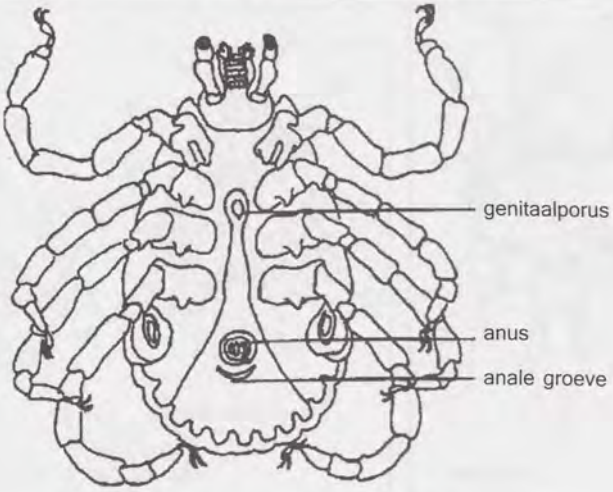
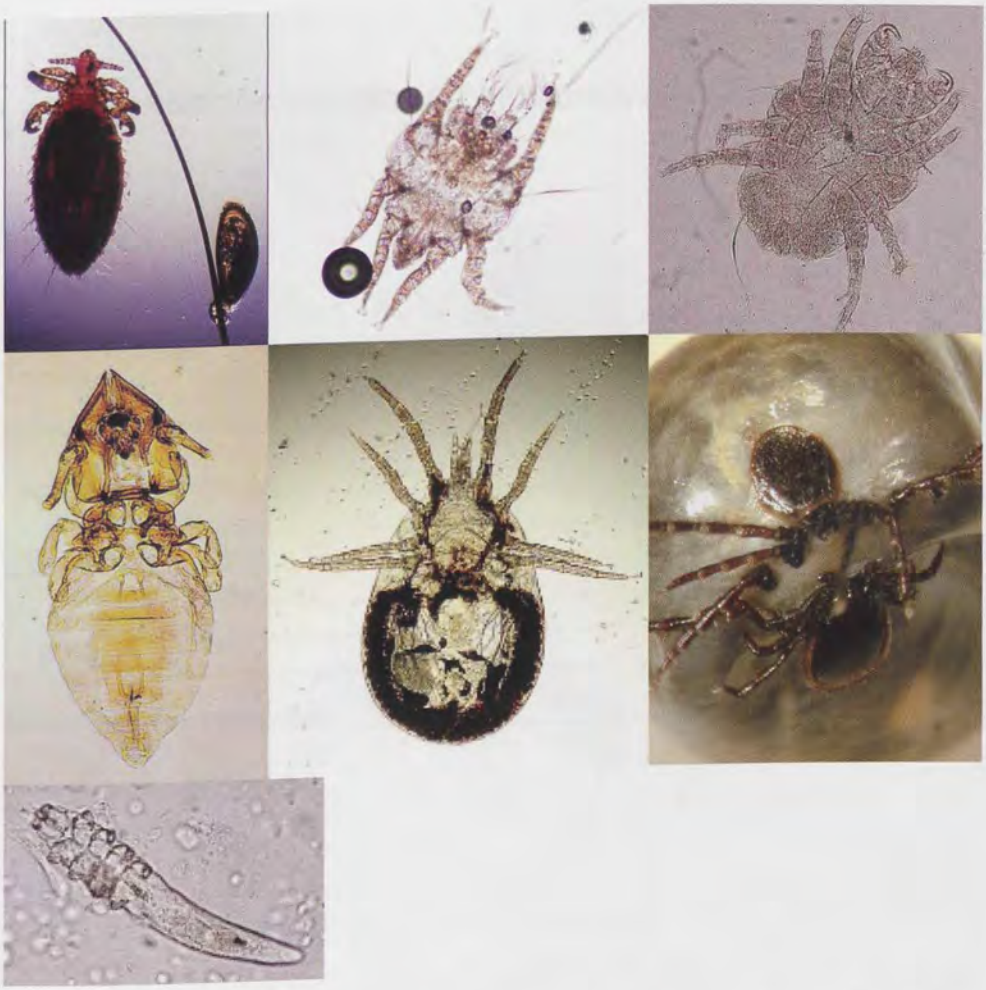


Fig. 27. *Dermacentor ventraal aanzicht*

Op de volgende pagina zijn foto's te vinden van ectoparasieten om mee te oefenen. Bedenk wel dat het makkelijker determineren is onder een echte microscoop, waar details in een grotere vergroting kunnen worden bekeken. De afbeeldingen zijn bij verschillende vergrotingen gemaakt en staan dus niet in een reële verhouding tot elkaar voor wat betreft de grootte.



Als laatste afbeelding hieronder de schapenluisvlieg (Melophagus ovinus), een vleugelloos insect dat nog wel eens verward wordt met een teek:

Met dank aan Dr. Wim Hendrikx voor de gebruikte tekeningen.

DIAGNOSTIEK VAN DERMATOFYTOSEN (HUIDSCHIMMELS)

Inleiding

Dermatofyten zijn keratinofiele schimmels die de huid, haarfollikels en haren kunnen infecteren. Bij dieren worden met name infecties gezien met de zoönotische schimmels *Microsporum* spp. en *Trichophyton* spp. In het algemeen kan gesteld worden dat bij katten en honden vooral *M. canis* wordt geïsoleerd, bij knaagdieren en konijnen *T. mentagrophytes*, bij paarden *M. equinum* (syn. *M. canis*), *M. gypseum* en *T. equinum* en bij runderen *T. verrucosum*. Bij katten, knaagdieren en konijnen kan dragerschap voorkomen. Deze dieren tonen (nog) geen verschijnselen van een dermatofytose, maar de huid en haren zijn wel reeds geïnfecteerd. Deze dieren zijn infectieus voor hun omgeving.

Infectie treedt op door contact met sporen. Deze kunnen zich op het dier bevinden, maar overleven ook zeer lang in de omgeving en op materialen (bijv. borstels).

Monstername en verzending

Goede aanvullende diagnostiek begint met een goede monstername. De infectie is gelokaliseerd aan de rand van de laesie, in de epidermis, de haarfollikels en aan de haarbasis. Voor een goede bemonstering worden haren uit dit gebied geëpileerd. Aanwezige schilfers en korsten kunnen mee worden bemonsterd. De Woodse lamp kan in sommige gevallen helpen om een monster gerichter te nemen. Dit wordt in de betreffende paragraaf verder beschreven. Indien het monster wordt afgenomen voor een schimmelkweek moet contaminatie van het monster met bacteriën en saprofyten (omgevingsschimmels) worden voorkomen. Dit geldt vooral bij het bemonsteren van paarden, landbouwhuisdieren en gezelschapsdieren met lange vachten die vervuild kunnen zijn. De te bemonsteren plek wordt eerst met 70% alcohol (spiritus) gedesinfecteerd en pas na verdamping bemonsterd of het materiaal wordt na monstername in de alcohol gedrenkt. Sporen van dermatofyten worden niet geïnactiveerd door spiritus.

Bij de controle op dragerschap (katten, konijnen en knaagdieren) wordt het dier gedurende minimaal 1 minuut over het gehele lichaam geborsteld met een schone tandenborstel (MacKenzie methode). Voor verzending dient de steel van de tandenborstel afgeknipt te worden. Dit voorkomt dat deze de envelop perforeert tijdens transport en mensen blootstelt aan zoönotisch materiaal. Daarnaast is het monster zo beter hanteerbaar bij het inzetten.

Indien monsters worden ingestuurd naar het laboratorium dient het materiaal te worden verpakt in papier. Verpakken in plastic leidt door de statische werking tot verlies van materiaal. Vervolgens kan het papieren envelopje volgens de regels voor verzending van biologisch materiaal verpakt worden in een seal bag en enveloppe.

Diagnostische technieken

Woodse lamp

Deze methode kan gebruikt worden om een dier te screenen door de lamp in een goed verduisterde ruimte over het lichaam te laten schijnen. Gebruik bij voorkeur een Woodse lamp

op netspanning, omdat in de kleinere lampen, die op batterijen werken, spanningsverlies een verandering in de uitgezonden golflengte kan veroorzaken. De Woodse lamp geeft na voldoende opgewarmd te zijn UV-licht, waarbij bepaalde metabolieten van *M. canis* bij infectie van de haren geel/groen fluoresceren. Indien deze fluorescentie wordt waargenomen heeft dit een hoge voorspellende waarde. De fluorescerende haren kunnen vervolgens gericht worden bemonsterd en ingezet voor een trichogram, kweek of PCR. De negatief voorspellende waarde van de Woodse lamp is laag, aangezien bij slechts ongeveer de helft van de *M. canis*-infecties fluorescentie optreedt.

Trichogram

Bij deze methode worden haren microscopisch onderzocht op de aanwezigheid van sporen. Een aantal haren wordt op een voorwerpglaasje gebracht en hier wordt een druppel minerale olie, KOH (10-30%) of lactofenol aan toegevoegd, waarbij de laatste twee een ophelderend effect hebben. Vervolgens wordt een dekglaasje aangebracht en worden de haren onder de microscoop bekeken. Men start met een screening bij lage vergroting (40x), waarbij nader te beoordelen plekken worden bekeken met een hogere vergroting (vanaf 100x). Geïnfecteerde haren zijn niet glad, maar hebben een ruwe, onregelmatige structuur door de aanwezigheid van arthroconidiën (sporen). De arthroconidiën kunnen zich binnen (endothrix) of buiten (ectothrix) de haarschacht bevinden. In theorie is het mogelijk om op basis van de grootte, plaats en rangschikking van de arthroconidiën te differentiëren tussen verschillende dermatofyten species. Hiervoor is echter veel ervaring vereist. Daarom wordt het trichogram in de praktijk weinig gebruikt.

Laboratorium kweek

De gouden standaard is een kweek onder laboratorium omstandigheden gevolgd door macro- en microscopische determinatie van de dermatofyt. Het laboratorium zal hiertoe verschillende kweekplaten inzetten waarbij saprofyten en bacteriën worden geremd in hun groei. Deze platen zullen bij één of meerdere temperaturen geïncubeerd worden en regelmatig worden gecontroleerd op groei van verdachte kolonies. Monsters van geïnfecteerde, niet behandelde dieren worden binnen 2 weken positief. Indien het dier al behandeld is, dan kan een negatieve uitslag pas na 3 weken worden gegeven. Sommige dermatofyten, zoals *T. verrucosum*, zijn moeilijk kweekbaar, doordat zij specifieke eisen stellen aan de voedingsbodem.

Macroscopische determinatie is gebaseerd op basis van de kleur en het aspect van de boven- en onderkant van de gekweekte kolonie. In het algemeen kan gesteld worden dat de bovenkant van kolonies van dermatofyten in kweek een plat, wit tot geel/beige en poederachtig aspect heeft. De microscopische determinatie is gebaseerd op het bekijken van de in kweek geproduceerde specifieke voortplantingsstructuren van de schimmel (micro- en macroconidiën). Hiertoe wordt een monster van een kolonie overgebracht op een voorwerpglaasje en na toevoeging van lactofenol cotton blue onder de microscoop bekeken. Het maken van een preparaat voor microscopische determinatie dient te geschieden in een flowkast om contaminatie van de omgeving te voorkomen en is daarom niet geschikt als techniek voor de praktijk.

In-huis kweek

De commercieel verkrijgbare dermatofyten kweekmedia voor diagnostiek zijn in de praktijk goed bruikbaar, mits men de beperkingen kent en de bijsluiter nauwkeurig volgt. De haren, korsten en schilfers moeten licht worden aangedrukt op het oppervlak van het medium en de dop mag niet helemaal dicht worden gedraaid, aangezien dermatofyten strikt aëroob groeien. Ook dient men zich goed te houden aan de geadviseerde kweektemperatuur. Bij het beoordelen van de in-huis media is het belangrijk om dagelijks te kijken naar eventuele groei en kleuromslag van het kweekmedium. Een handreiking voor het macroscopische aspect van dermatofyten kolonies is in de vorige paragraaf gegeven. De kleuromslag wordt veroorzaakt doordat de schimmel tijdens de groei een chemische omzetting in het medium geeft waardoor een pH-verandering in de voedingsbodem ontstaat. De kleuromslag dient te geschieden binnen de door de fabrikant aangegeven termijn, vóór waarneembare groei van dermatofyten en heeft als functie het aanduiden van verdachte kolonies.

Fout-negatieve resultaten zijn mogelijk door bijvoorbeeld het verkeerd beënten van het kweekmedium of overgroei door saprofyten. Fout-positieve resultaten kunnen worden veroorzaakt door saprofyten of bacteriën en treden regelmatig op. Het is voor bevestiging van de diagnose dan ook sterk aan te raden het kweekmedium op te sturen naar een laboratorium voor determinatie van de verdachte kolonie. Een bijkomend voordeel is dat deze determinatie van de dermatofyt belangrijke informatie kan opleveren over de bron van de infectie.

Voor de diagnosticering van dermatofytose-uitbraken bij bedrijfsmatig gehouden gezelschapsdieren (zoals in dierenopvangcentra, in pensions, bij dierhandelaren of bij fokkers) wordt een schimmelkweek in een diagnostisch laboratorium geadviseerd. Voor een dergelijk bedrijf kan een positieve kweekuitslag ernstige consequenties hebben, zoals tijdelijke bedrijfssluiting met een opname- of verkoopstop, behandeling van grote aantallen dieren, etc. De kans op een fout-negatieve of fout-positieve uitslag dient daarom zo laag mogelijk te zijn.

PCR

Met deze methode wordt direct in het monster DNA aangetoond van *M. canis* of *T. mentagrophytes*. Als materiaal zijn haren, schilfers, korsten en monsters afgenomen met een tandenborstel geschikt. De test heeft een hoge specificiteit en sensitiviteit. Het grootste voordeel van de PCR is dat deze snel een uitslag geeft, wat bij een (potentiële) uitbraak van groot belang kan zijn en de totale behandelduur sterk kan verkorten.

Monitoring van de behandeling

Om het genezingsproces tijdens de behandeling te monitoren zijn de laboratoriumkweek en de PCR geschikt. Het gebruik van in-huis kweken is af te raden, omdat dermatofyten van dieren die met anti-mycotica behandeld worden te traag groeien. Hierdoor vervalt de termijn voor het betrouwbaar aflezen van de kleuromslag van het medium reeds voordat er groei is opgetreden. Voor monitoring tijdens de behandeling wordt geadviseerd om iedere 2 weken een monster te

laten onderzoeken. De therapie kan pas gestopt worden wanneer 2 opeenvolgende monsters negatief zijn bevonden. Waar een negatieve kweekuitslag 3 weken op zich laat wachten, zal de PCR-uitslag al binnen enkele dagen bekend zijn, wat de behandelduur sterk verkort.*

**De PCR is recent op de markt gekomen, wat betekent dat er in de praktijk nog weinig ervaring is met deze verkorte behandelduur.*

SPERMA-ONDERZOEK

Inleiding

Voor een goede vruchtbaarheid van een mannelijk dier is het essentieel dat een voldoende aantal spermacellen wordt geëjaculeerd waarbij ook de kwaliteit van de spermacellen goed dient te zijn. In het laboratorium kan een inschatting worden gemaakt van de kwaliteit van het ejaculaat waarbij dit zowel macroscopisch als microscopisch wordt beoordeeld. De kwaliteitsbepaling blijft echter een inschatting. Met de in dit hoofdstuk vermelde analysemethoden kunnen lang niet alle afwijkingen worden gediagnosticeerd. Uiteindelijk zal de fertiliteit van een ejaculaat moeten blijken na inseminatie ervan in vrouwelijke dieren.

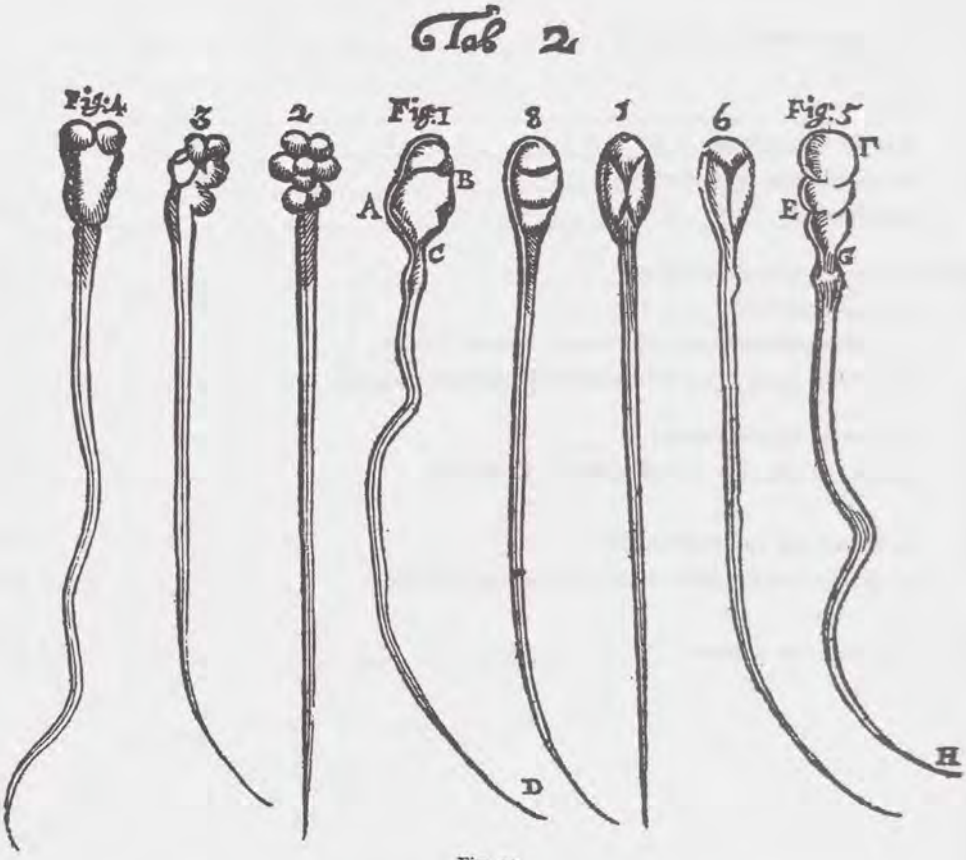


Fig. 50.

Spermatozoïden, 1–4 van de mens, 5–8 van de hond.
Uit Phil. Trans. XII, 1678, no. 142. Naar: Alle de Brieven, deel 2.

Fig. 1 *Zoogdier spermacellen zoals geobserveerd door de ontdekker van deze cellen, Antonie van Leeuwenhoek.*

Macroscopisch sperma-onderzoek

Volume

We behandelen hier de macroscopische kenmerken van stierensperma, maar tabel 1 laat zien dat er tussen de verschillende diersoorten grote variatie bestaat in macroscopische en microscopische kenmerken van een ejaculaat. Het volume van het ejaculaat bij de stier varieert in de regel van 2-6 milliliter (ml). Meestal produceren volwassen stieren een groter ejaculaat dan jonge stieren.

Diersoort	Volume ejaculaat (ml)	Concentratie (10^6 spermacellen/ml)	Aantal inseminaties (doses)
Stier	4-6	800-1000	± 1000
Ram	1-3	3000-6000	± 150
Hengst	30-80	100-250	± 8
Beer	200-500	150-250	± 25
Reu	2-5	200-500	± 1-2

Tabel 1: *Macroscopische en microscopische kengegevens voor ejaculaten van diverse zoogdieren*

Reuk

Normaal sperma is bijna reukloos. Abnormale geur is aanwezig bij verontreiniging met urine of ontstekings-producten.

Kleur en consistentie

Van goed stierensperma is de kleur wit tot room-geel en soms zelfs duidelijk geel. Hoe intenser de kleur, hoe viskeuzer het ejaculaat, hoe meer spermacellen per ml aanwezig zijn. Zo bevat een waterig, doorzichtig ejaculaat zeer weinig tot geen spermacellen (azoöspermie). Een rode kleur wijst op bijmenging van vers bloed, een bruine kleur op bijmenging van oud bloed en een gele kleur op bijmenging van urine.

Macroscopische wolkvorming

Een goed ejaculaat van een herkauwer kenmerkt zich door:

1. een hoge concentratie van spermacellen
2. een goede individuele beweging van de spermacellen.

In een goed ejaculaat is de massale beweeglijkheid met het blote oog, kleine wolkjes, waar te nemen. Deze wolkjes verdwijnen en ontstaan opnieuw en de snelheid van dit proces is eveneens van belang.

Homogeniteit

In het sperma mogen geen verontreinigingen (bloed, vaseline uit de kunstschede, zand, enz.) voorkomen.

Microscopisch sperma-onderzoek

De beweeglijkheid

Niet alleen voor de waardering van het individuele dier als spermaproducent, maar ook van elk ejaculaat apart, is het nodig om de beweeglijkheid van spermacellen te beoordelen.

De massale beweeglijkheid.
De massale beweeglijkheid (of de wolkvorming) van vers onverdund sperma van herkauwers wordt in een druppel bekeken. Deze druppel wordt op een voorwerpglaasje gebracht, dit wordt geplaatst op een verwarmde objecttafel (38°C) en met een 100-200 x vergroting bekeken. Niet alleen wordt gelet op de verdichtingen en verdunningen van dit onverdunde sperma, maar ook op de snelheid van de wervelingen. Zodoende kan een indruk worden verkregen van de beweeglijkheid en de concentratie van de spermacellen. In een weinig geconcentreerd ejaculaat (afkomstig van de reu, hengst of beer) zal in de regel geen of slechts een geringe wolkvorming aanwezig zijn.

De individuele beweeglijkheid.
De individuele beweeglijkheid wordt in een 100-200 maal verdund preparaat onder een dekglaasje bekeken bij een 100-200 x vergroting, hierbij wordt gebruik gemaakt van een fasecontrast microscoop. Bij de beoordeling van het monster wordt een schatting gemaakt van het percentage bewegende cellen. Omdat het bij deze methode moeilijk is om tot een objectieve analyse te komen wordt tegenwoordig vaker gebruik gemaakt van CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer).

Computer geassisteerde spermacel-analyse (CASA)

In een speciaal ontwikkeld preparaatkamertje wordt verdund sperma gepipetteerd (50-75 miljoen spermacellen per ml) en onder een fasecontrast microscoop bekeken. Op het oculair van de microscoop is een digitale camera bevestigd die gekoppeld is aan een computer. Met behulp van specifieke software kunnen op verschillende velden van het preparaatkamertje de bewegingstrajecten van individuele spermacellen gevolgd worden. Met een frequentie van 60 Hz wordt de positie van de spermakop gevolgd gedurende een halve seconde. Het traject dat de spermacel heeft afgelegd geeft details over de bewegingssnelheid maar ook over de zweepslag-frequentie van de spermastaart en de daarbij gekoppelde laterale beweging van de spermakop (zie fig.2B). Naast deze parameters kan de lineariteit van het bewegingstraject worden bepaald. Er worden 12 willekeurige velden geanalyseerd en van alle door de computer herkende spermakoppen (maximaal 5000) wordt de beweeglijkheid gescoord. Meestal wordt uit deze data het totaal percentage motiele spermacellen en het percentage progressief motiele spermacellen bepaald.

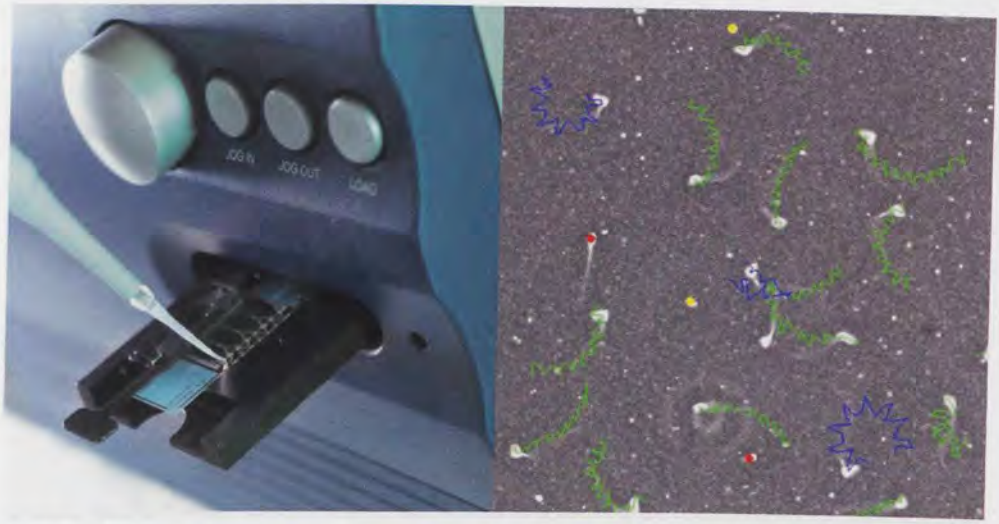


Fig. 2* A: *Het vullen van een telkamertje met een spermaverdunning ten behoeve van een CASA meting.* ***B:*** *CASA beeld van progressief bewegende spermacellen (groen traject), lokaal bewegende spermacellen (blauw traject), niet bewegende spermacellen (rode punt in de spermakop) en van stilstaande partikels die vergelijkbare afmetingen hebben als de spermakop (gele punt; de vraag is of dit losse spermakoppen zijn of niet relevante partikels).*

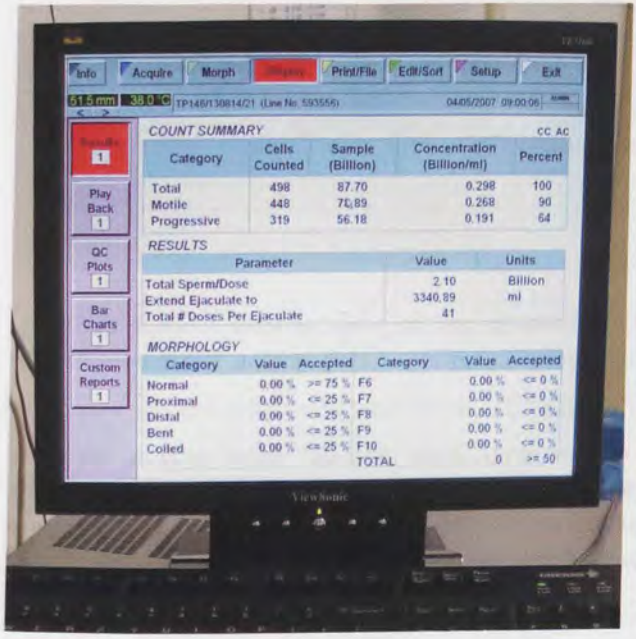


Fig. 3*: *In de intensieve veehouderij is het van belang om een vrouwelijk dier kunstmatig te insemineren met een inseminatiedosering die een optimaal fertiliserend vermogen heeft. Bij de varkens KI is recent overgegaan op een CASA-systeem waarbij niet alleen de spermamotiliteit (zie fig. 2) maar tevens de spermaconcentratie en de spermamorfologie (in de fig. niet meegenomen) in één keer kunnen worden geregistreerd. Het systeem vereist echter wel nauwkeurige kalibratie en onderlinge ijking die wordt onderbouwd met behulp van de diagnostiek die behandeld wordt in dit hoofdstuk.*

* Figuur 2 en 3: met dank aan Dr. Marleen Broekhuijse; Research & Development, ToPigs (varkens KI) en Delta CRV (runder KI).

Uitvoering: beoordeling beweeglijkheid van spermacellen

Beoordeel microscopisch de massale en individuele beweeglijkheid van de spermacellen in een ejaculaat van een stier. Er staan 2 microscoopopstellingen voor beoordeling van spermabeweeglijkheid klaar.

1. Bekijk onder 100 x vergroting de wolkvorming (zie voor uitleg van dit fenomeen ook paragraaf macroscopische beoordeling, aangezien het ook met het blote oog is te zien).
2. Schat onder 100 x vergroting op de andere microscoop het % beweeglijke spermacellen.

Verklaar het verschil van wat je ziet onder beide opstellingen.

Verwacht je dat alle levende spermacellen ook beweeglijk zijn?

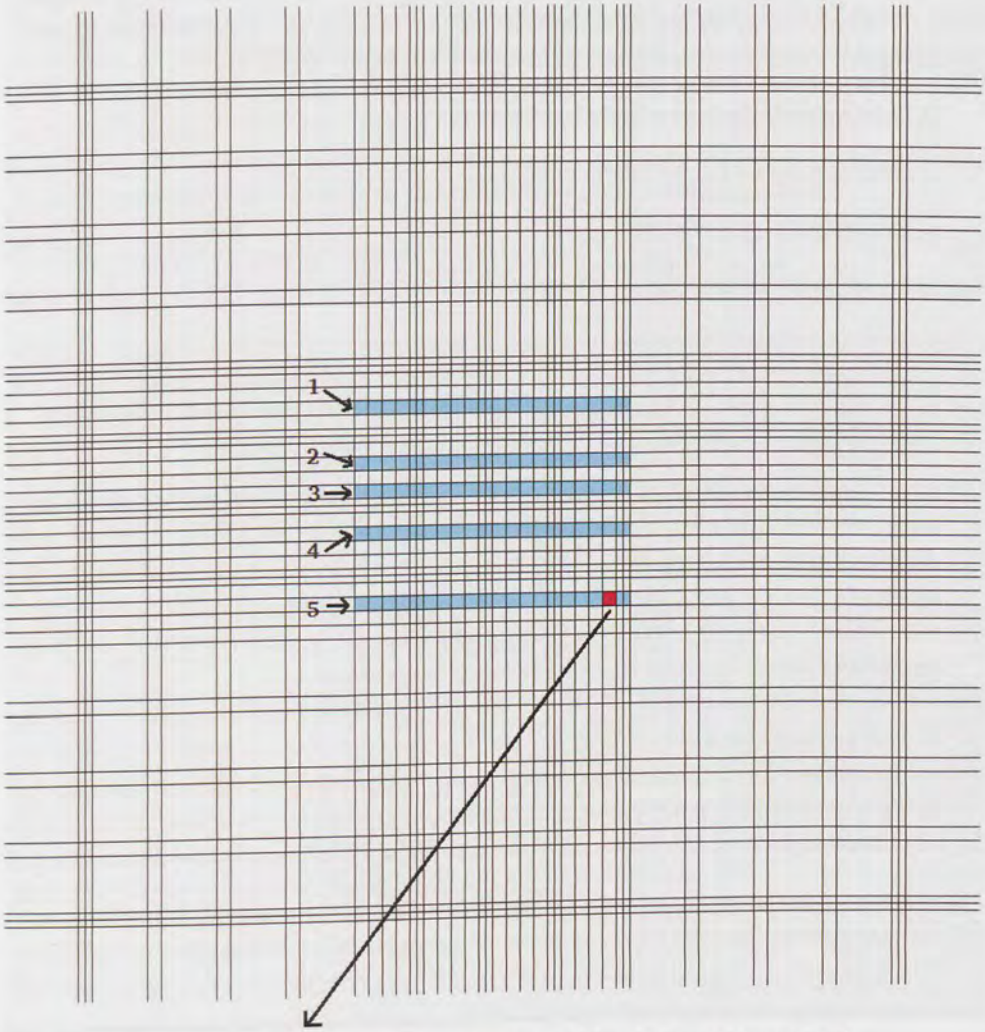
Bewegen de spermacellen in één richting?

De spermacelconcentratie

- Het aantal spermacellen in het ejaculaat is van belang voor de beoordeling van het fertiliserend vermogen van het mannelijke dier, maar ook voor het vaststellen van de verdunning die ten behoeve van de kunstmatige inseminatie gewenst is. Dit aantal kan onder andere worden bepaald met de haemocytometer (in ons geval van het type Bürker-Türk, zie fig. 4).

Fig. 4: Een haemocytometer die gebruikt kan worden om de spermacel-concentratie van een ejaculaat te bepalen.

- Sterk geconcentreerd sperma (bijvoorbeeld van de ram, zie tabel 1) wordt 200 maal verdund met een fysiologische zoutoplossing die 0.1% formaline bevat waardoor de spermacellen worden gefixeerd.
- Geconcentreerd sperma van de stier wordt in de regel 200 maal verdund, terwijl het sperma van bereb, hengsten en reuen meestal 20 of 100 maal wordt verdund. Het tellen vindt plaats bij een vergroting van ca. 100 maal en alleen de koppen, dus ook losse koppen, worden geteld, bij voorkeur met een fasecontrast microscoop.
- Voor het tellen wordt gebruik gemaakt van het rasterwerk aanwezig in de telkamer (zie fig. 5). In het midden van dit rasterwerk, gevormd door de brede banen van horizontale en verticale lijnen bevinden zich 400 hokjes.



De inhoud van één hokje in de telkamer is: 1/20 * 1/20 * 1/10 = 1/4000 mm^3

Fig. 5: *Rasterlijntjes in het telgebied van de telkamer.*

Uitvoering: bepalen van de spermaconcentratie

De telkamer wordt gevuld met de verdunde spermasuspensie. Na ongeveer 3 minuten zijn de spermacellen tot op de bodem gezakt en kan met tellen worden begonnen. Ondertussen wordt de microscoop ingesteld (LET OP VOLGORDE).

1. Draai de condensor eerst naar beneden.
2. Draai vervolgens het diafragma dicht.
3. Selecteer het 10 x objectief.
4. Plaats nu de telkamer op de kruistafel.
5. Draai voorzichtig de telkamer naar het objectief.
6. Kijk nu door het oculair en stel scherp door de kruistafel naar beneden te draaien.
7. Celtelling:
   In het centrum van het telraster worden 5 los van elkaar liggende balken van 20 kleine hokjes elk geteld (zie fig. 5). Spermacellen kunnen in twee hokjes liggen en kunnen daarom dubbel worden geteld. Om dit te voorkomen worden alleen de spermacellen geteld die met de kop geheel in het betreffende hokje liggen of op de linker- dan wel onderrand van dit hokje. Alle spermacellen met de kop op de boven- dan wel rechterrand worden dus niet in het betreffende hokje geteld.
8. Concentratie-berekening:
   Per 100 hokjes zijn n spermacellen geteld dus n/100 per hokje. De inhoud van 1 hokje is 1/4000 mm^3.Bij een 100-voudige verdunning vinden we dus n/100 x 100 x 4000 spermacellen per mm^3 (= µl), wat overeenkomt met [4 x n miljoen] spermacellen per ml.

Bereken de gemiddelde spermacelconcentratie in miljoen/ml, rekening houdend met het gemiddelde aantal cellen per 100 hokjes en de gebruikte verdunningsfactor.

De morfologie van spermacellen

Naast de bepaling van de beweeglijkheid en concentratie van spermacellen is ook de vorm, bouw en membraanintegriteit (vitaliteit) van de spermacellen van belang bij de bepaling van de kwaliteit van een ejaculaat. Het percentage levende cellen (ligt hoger dan het percentage bewegende) kan worden bepaald met een vitaalkleuring. Hiertoe wordt een druppeltje sperma vermengd met een buffer waarin bijvoorbeeld eosine en anilineblauw zijn opgelost. Het anilineblauw dient alleen voor de achtergrondkleuring, terwijl de eosine de dode zaadcellen geheel of gedeeltelijk rood kleurt. De levende, intacte cellen blijven ongekleurd.

Dit onderzoek zal in de regel plaatsvinden met behulp van uitstrijkjes. Ongekleurde gefixeerde spermacellen kunnen ook onder een fasecontrastmicroscoop op morfologie worden bestudeerd.

Voor het gewone routineonderzoek worden 200 zaadcellen geanalyseerd en het percentage normaal gebouwde spermacellen berekend. Het percentage morfologisch afwijkende zaadcellen is van belang voor de fertiliteitbeoordeling van het mannelijk dier. Over het algemeen kan gesteld worden dat bij de stier de dieren met <80% morfologisch normale spermacellen een verminderd fertiliserend vermogen hebben. Niet alleen het percentage maar ook de soort afwijking is van belang. Zo wordt wel vermeld dat het percentage kopafwijkingen niet groter dan 7% mag zijn.

Behalve de vorm speelt ook de uniforme grootte een rol. Dieren met een grotere variabiliteit van de kopafmetingen vertonen dan ook een geringere vruchtbaarheid.

Het aantal afwijkende vormen kan vrij groot zijn. Voor de uniformiteit wordt bij de indeling van deze afwijkingen gebruik gemaakt van de normentafel van Bretschneider (fig. 6). Op deze normentafel zijn de vormen links van de verticale dikke lijn normaal en rechts hiervan abnormaal. In de tabel zijn de bovenste afwijkingen het ernstigst en horizontaal gezien de meest rechtse. Het indelen van de spermacellen op basis van morfologische afwijkingen gebeurt op volgorde van A-F als aangegeven in fig. 6.

Voordat een aantal speciale afwijkingen worden behandeld zal eerst een morfologische indeling van de spermacel worden gegeven.

De kop van de spermacel

- De kop is aan één kant iets concaaf en bevat de spermacelkern. Over de kern is de kopkap of acrosoom gelegen. Dit geheel is met een celmembraan overdekt. Achter het acrosoom gedeelte van de kop bevindt zich het equatoriaal segment en de kopbasis. Onder de kopbasis ligt de hals, waar het middenstuk zit vastgehecht aan de spermakop.

- De acrosoom bevat een aantal proteases en glycosidases die in een soort enzymmatrix zijn gestapeld en is omsloten door één membraan (het gedeelte daarvan wat onder de plasmamembraan gelegen is noemt men de buitenste acrosoommembraan terwijl het gedeelte dat tegen de celkern gelegen is de binnenste acrosoommembraan wordt genoemd). Een afwijkende acrosoommorfologie (fig. 6 rij A) kan leiden tot een voortijdige

acrosoomreactie of juist tot geen acrosoomreactie. Beiden zullen de bevruchting niet ten goede komen. Het bovenste (apicale) deel van het acrosoom is bij de ram, hengst, beer en stier het dikst (bij bijv. knaagdierspermacellen is dat niet het geval).

- Bij een los acrosoom (fig. 6 rij A nr 6) is het apicale gedeelte van de buitenste acrosoommembraan tezamen met de overliggende plasmamemembraan losgelaten van de spermakop. Deze losse kopkappen duiden op gedegenereerde oudere spermacellen.

- Het belangrijkste deel van de spermacel is de celkern, welke na penetratie van de eicel zijn rol moet spelen. Het is van belang dat het daarin gelegen DNA intact en goed gecondenseerd verpakt is (fig. 6 rij B, rij C nr 1-5). In sommige gevallen is er onvolledige condensatie van het kernmateriaal waardoor de spermakop-afmetingen groter zijn dan normaal, hetgeen de bevruchting van de eicel bemoeilijkt. Daarnaast is onvolledig gecondenseerd chromatine gevoeliger voor beschadigingen.

- Losse spermakoppen en/of afwijkingen in het verbindingsstuk tussen de spermakop en het middenstuk (fig. 6 rij C nr 6-11) worden ook regelmatig waargenomen. De losse spermakoppen kunnen normaal of abnormaal van vorm zijn.

- Bij de rijping van spermacellen in de epididymis wordt de protoplasmadruppel afgesnoerd. Het betreft hier een residu van de cytoplasmatische bruggetjes die de spermatiden met elkaar verbond en synchroniseerde in de testis. In de cauda epididymis is dit proces normaliter voltrokken. Echter in een klein aantal cellen is het afdalen van de protoplasmadruppel nog te zien (fig. 6 rij E nr 1-5). Te veel van dit type cellen kan duiden op een recent aanwezige hyperthermie die zowel de spermatogenese als de spermacel rijping in de epididymis verstoort en leidt tot verminderd bevruchtend vermogen van het onderzochte ejaculaat.

Het middenstuk

- Door de hals is het middenstuk met de kop verbonden. Hier ontspringen de fibrillen, (de axiale gaan uit van het centrosoom), die door contracties voor de voortbeweging zorgen. Het proximale centrosoom vormt hiertoe het kinetische centrum, terwijl het distale centrosoom aan het distale eind van het middenstuk, vermoedelijk bij de coördinatie een rol speelt. Om deze asfibrillen (in het Engels: outer dense fiber) in het middenstuk bevindt zich een schede van individuele (dus discontinue) uitgerekte mitochondriën die spiraalvormig zijn gewonden om de centrale flagellum. Afwijkingen in de spermiëring in de testis kunnen resulteren in middenstuk afwijkingen (zoals weergegeven in fig. 6 rij D).

De staart

- De staart heeft een veel dunnere schede van semi-circulaire ribben (in het Engels: fibrous stealth), die op tegenovergestelde plaatsen door longitudinale ribben zijn verenigd en perifeer liggen om de 'outer dense fibers'. Deze schede loopt bijna tot het eind van de staart door en heeft elastische eigenschappen waardoor de spermacel zijn karakteristieke bewegingspatronen verkrijgt.

- Omgeslagen staarten kunnen in vitro worden opgewekt door een koude shock of door toevoeging van water (fig. 6 rij E nr 5-7). De overige omgeslagen staarten van fig. 6 rij E worden veroorzaakt door een onjuiste/onvolledige afdaling van de protoplasmadruppel (zie bovenstaand). In sommige gevallen is er een te kleine staart (fig. 6 rij E nr 8). Het veel voorkomen van dit soort spermacellen gaat ten koste van een goede spermamotiliteit en resulteert in een lagere fertiliteit.

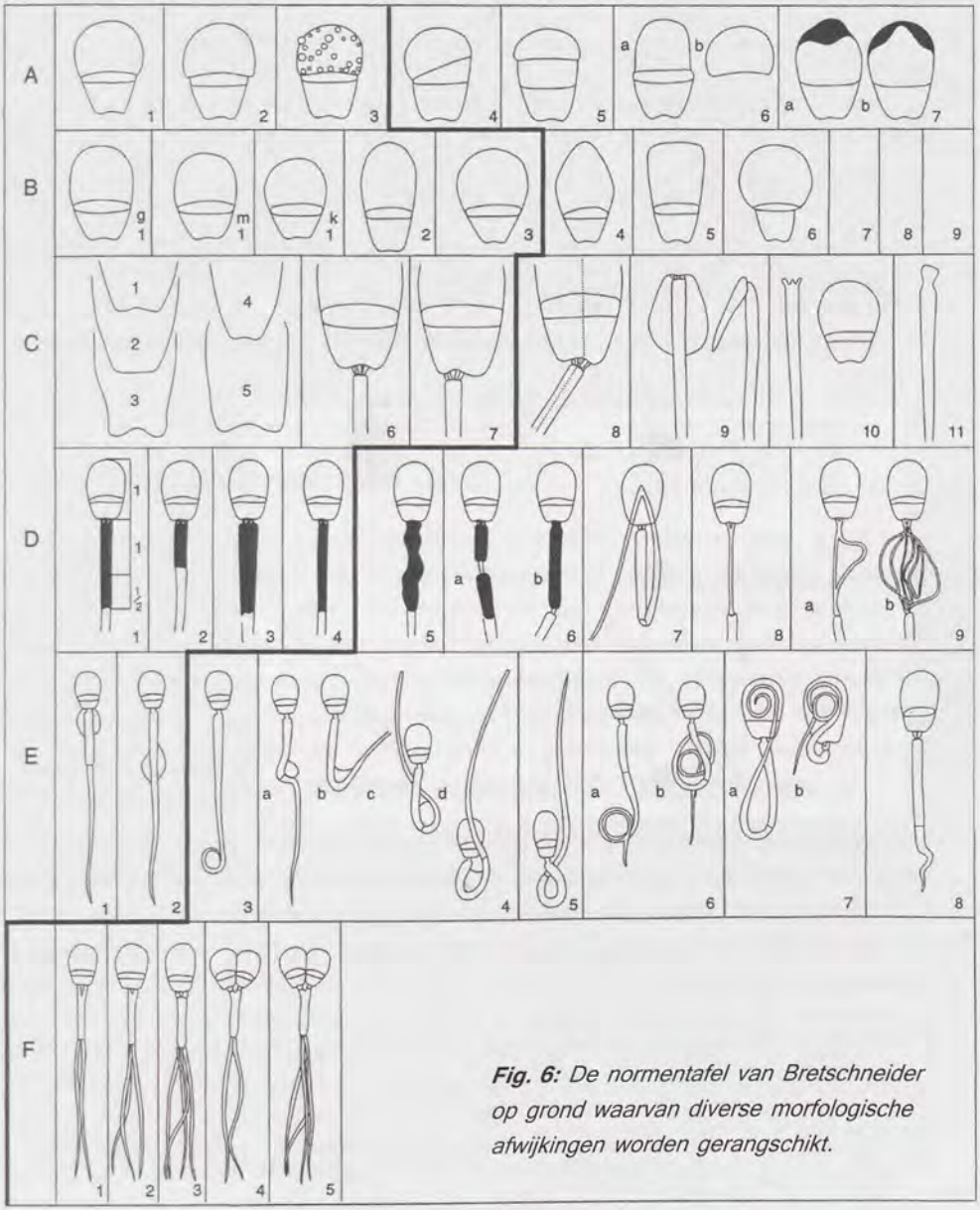


Fig. 6: *De normentafel van Bretschneider op grond waarvan diverse morfologische afwijkingen worden gerangschikt.*

Uit: Bretschneider, L.H. (1948) Een normentafel ten gebruike bij de morphologische beoordeling van stierensperma; Tijdschrift voor Diergeneeskunde; 73(12): 421-433

Uitvoering: morfologisch onderzoek aan spermacellen

Maak zelf een gekleurd preparaat met behulp van een aniline blauw/eosine kleuring (zie ook fig. 7) en beoordeel het percentage normaal gebouwde spermacellen aan de hand van circa 20 cellen (LET OP VOLGORDE)

1. Plaats eerst een druppel van de kleurstof rechts op het preparaat glas.
2. Roer met het spateltje even in het ejaculaat.
3. Breng naast de druppel kleurstof een klein druppeltje van het onverdunde sperma aan.
4. Pak een nieuw schoon spateltje en meng de twee druppels rustig.
5. Maak nu m.b.v. een tweede objectglas langzaam een uitstrijkje waarbij de druppel achter het glas aan uitgesmeerd wordt.
6. Dep eventuele dikke druppels vloeistof aan de rand van het preparaat af met een tissue.

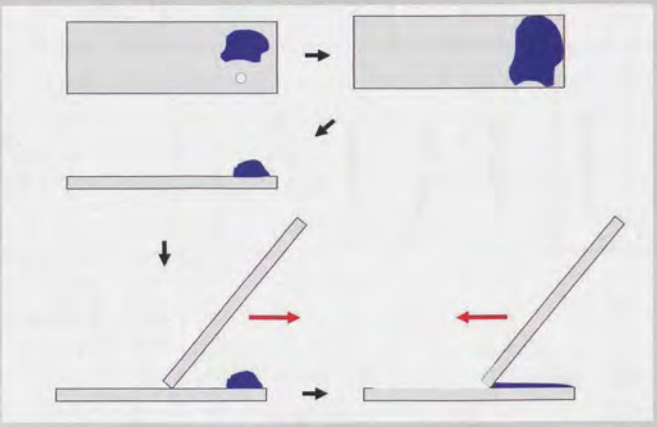


Fig. 7: *Het maken van een spermauitstrijkje*

7. Laat het preparaat drogen en bekijk DAARNA onder een 1000 x vergroting (100 x olie-immersie objectief) waarbij eerst een druppel immersie-olie moet worden opgebracht op het preparaat. Draai daarbij het diafragma open en de condensor omhoog.
8. Beoordeel microscopisch ook een aantal uitstrijkjes van sperma van o.a. een stier, een hengst, een muis, een haan, een beer en een reu. Let hierbij op diersoort specifieke verschillen in grootte en vorm van de spermacellen. Let tevens op de variatie in bouw van de spermacellen zoals die kan worden waargenomen in een uitstrijkje van één enkel ejaculaat.

Dubbelvorm levend | Dubbelvorm dood | Acrosoomafwijking

Fig. 8: *Enkele morfologische afwijkende spermacellen*

Het verdunnen van sperma.

Wanneer het sperma voor kunstmatige inseminatie moet worden bewaard, wordt dit in het algemeen verdund en afgekoeld. Als verdunningsmiddel wordt in de eerste plaats gebruik gemaakt van een bufferoplossing, die het door de hoge glycolytische ATP-productie van de spermacellen gevormde lactaat moet kunnen neutraliseren. Daarnaast bevat het beschermende en voedingsbestanddelen zoals eidooier, suikeroplossingen enz. Het verdunningsmiddel dient bijna isotonisch te zijn, voor stierensperma wordt veel gewerkt bij een pH van 6,6-6,8. Het verdunnen dient zeer geleidelijk en voorzichtig te geschieden. Na het verdunnen wordt het sperma langzaam afgekoeld tot koelkast temperatuur (5°C; hengst, ram, stier).

Hoewel stierensperma in sommige landen na deze afkoeling wordt getransporteerd voor kunstmatige inseminatie wordt stierensperma in de regel in rietjes ingevroren, en bewaard bij -196°C en later na ontdooien gebruikt voor kunstmatige inseminatie. Voor andere diersoorten gebeurt dit op minder routinematige basis eveneens (bijvoorbeeld voor export of voor speciale fokprogramma's). Berensperma wordt bij 17°C bewaard. Om bij deze temperatuur optredende bacteriële groei te remmen dienen antibiotica te worden toegevoegd. Op dit moment wordt er onderzoek gedaan om verdunners zonder antibiotica te gaan gebruiken mede vanwege de problematiek van multiresistente micro-organismen in de stallen van varkenshouders.

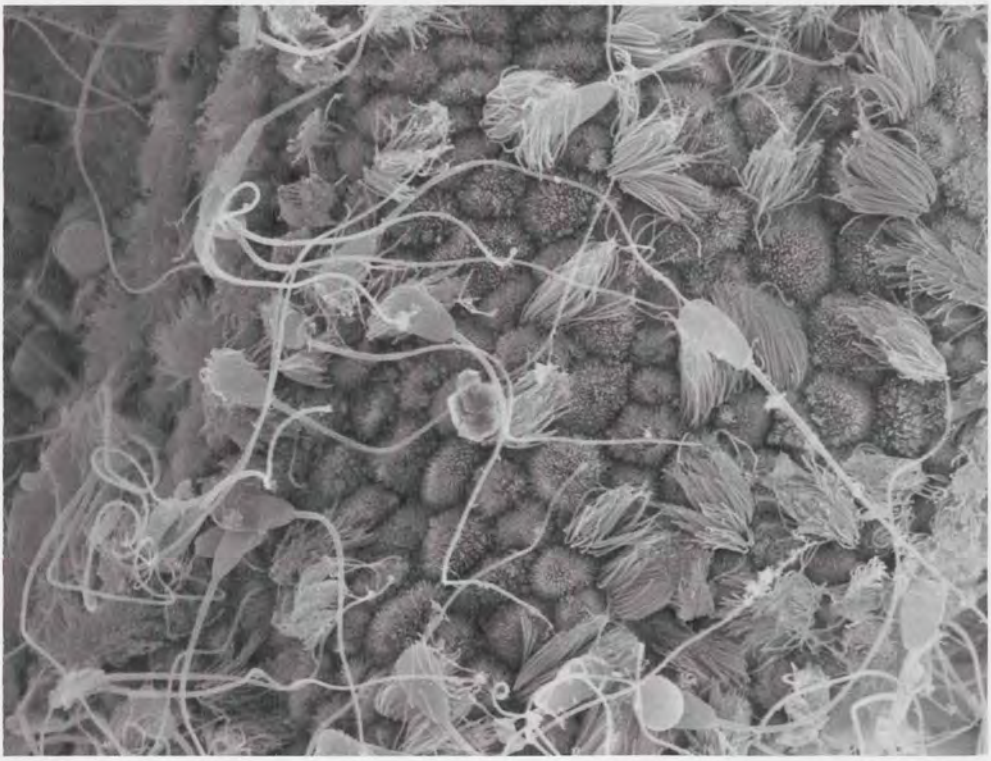


Fig. 9: *Geselecteerd stierensperma met uitsluitend excellente morfologie treft men aan na kunstmatige inseminate in de eileider (scanning electronen microscopische opname).*

MELKONDERZOEK

Mastitis en bacteriologisch onderzoek

Klinische mastitis

Melk is het belangrijkste product van de melkkoe en daarmee is uierontsteking, mastitis, de belangrijkste bedrijfsgebonden aandoening bij melkvee. Mastitis wordt in het algemeen veroorzaakt door bacteriën, maar soms ook door gisten, algen, virussen of schimmels. Als een infectie van de uier leidt tot ontsteking, is er sprake van mastitis. Mastitis kan leiden tot klinische symptomen zoals zwelling, roodheid en/of pijnlijkheid van het betreffende kwartier en, meestal het meest in het oog springende symptoom, afwijkende melk. Zowel kleur, geur als viscositeit van deze melk kunnen afwijken. De afwijkingen van de melk kunnen variëren van kleine vlokken die alleen in de eerste stralen van de melk aanwezig zijn tot een serum-achtig secreet of een kwartier met geheel purulente inhoud. De eigenschappen van de melk zijn alleen in bepaalde gevallen specifiek genoeg om iets te kunnen zeggen over het oorzakelijk agens (bijvoorbeeld *T. pyogenes*).

De klinische diagnostiek van klinische mastitis bij lacterende koeien vindt in het algemeen plaats tijdens het melken in het melkput, door de eerste melkstralen, die als onderdeel van een goede voorbehandeling worden weggestraald, te controleren. Als niet wordt voorgestraald en bij droogstaande koeien, is palperen van de uier het alternatief. Daarnaast wordt gekeken naar het algehele voorkomen van de koe, maar dat is uiteraard alleen afwijkend in ernstige gevallen. Bedrijven die met een melkrobot melken, proberen op basis van afwijkingen in de melk (geleidbaarheid, de aanwezigheid van bepaalde enzymen, melktemperatuur) klinische mastitis op te sporen. Deze methoden worden ook in reguliere melkmachines wel toegepast ter ondersteuning van de klinische diagnostiek.

Subklinische mastitis

In de meeste gevallen van mastitis zijn bij het klinisch onderzoek geen afwijkingen waar te nemen. In die gevallen is sprake van subklinische mastitis. Een koe met subklinische mastitis heeft een verhoogd 'celgetal'. Het celgetal is het totaal aantal cellen dat in de melk aanwezig is (per ml). Melk bevat altijd een zekere hoeveelheid cellen. Dit zijn afgestoten oppervlaktecellen en leukocyten. In geval van mastitis neemt het aantal leukocyten sterk toe, wat leidt tot een verhoging van het celgetal. Veel melkveehouders laten op regelmatige basis het celgetal bepalen in de monsters die genomen worden in het kader van de Melk Productie Registratie (MPR). Dit zijn monsters die op koe-niveau verzameld worden en dus een menging van melk uit vier kwartieren vormen. Ook is apparatuur beschikbaar om het celgetal op het melkveebedrijf te meten, soms ook ingebouwd in de melkrobot.

Er is variatie in het celgetal tussen koeien en er is ook dagelijkse variatie binnen een koe. Van invloed zijn lactatiestadium, productieniveau, leeftijd etc. Om praktisch met het koecelgetal te kunnen werken zijn attentiewaarden voor koecelgetallen vastgesteld. Het uitgangspunt is dat bij overschrijding van die attentiewaarde het zeer waarschijnlijk is dat minimaal in één kwartier sprake is van subklinische mastitis. In Nederland wordt voor een vaars uitgegaan van subklinische mastitis bij een celgetal > 150.000 cellen/ml en bij een (ouderekalfs)koe bij een celgetal > 250.000 cellen/ml.

Genoemde attentiewaarden zijn overigens niet erg hard. Het is best mogelijk dat bij een koe met een celgetal > 250.000 cellen/ml geen mastitisverwekker wordt gevonden, terwijl bij een andere koe met een celgetal < 250.000 cellen/ml wel een mastitisverwekker wordt aangetoond. Internationaal wordt ook wel 200.000 cellen/ml gebruikt voor zowel koeien als vaarzen, of ligt de attentiewaarde juist lager. Het celgetal kan bij subklinische mastitis zeer sterk wisselen en vertoont enorme schommelingen per dag, binnen de dag en zelfs binnen het melkmaal. Over het algemeen bevindt het celgetal van een koe met subklinische mastitis zich echter wel steeds boven de attentiewaarde, maar een uitschieter naar beneden is zeker mogelijk. De diagnostiek op basis van het celgetal is dus niet foutloos. Maar omdat de bepaling niet duur is, de gegevens gemakkelijk beschikbaar zijn en we er veel ervaring mee hebben, kunnen we goed met deze attentiewaarden werken.

California Mastitis test

De California Mastitis Test (CMT) of T-pol test is bedoeld om op een eenvoudige wijze - naast de koe - een indicatie van het celgetal te krijgen. De resultaten zijn niet erg nauwkeurig en worden vaak uitgedrukt in een aantal plusjes (- , +, ++, +++). Bij de uitvoering van de CMT worden melk en een (vetoplossende) zeepoplossing (T-pol = 3% natriumlaurylsulfaat) gemengd, waardoor de celwanden van aanwezige cellen beschadigd raken. Het DNA komt vrij uit de celkernen en vormt een gelachtige substantie. Hoe meer cellen er in de melk zitten, des te slijmiger wordt de vloeistof. Een positieve CMT (er is slijm zichtbaar) geeft aan dat het celgetal in het betreffende kwartier hoger is dan ca. 300.000 cellen/ml. Hoewel de CMT een semi-kwantitatieve test is, komt de uitvoering ervan zeer nauw.

Uitvoering: California Mastitis Test (CMT)

1. Reinig de vierkwartierenschaal grondig vóór gebruik.

2. Behandel de uier voor en melk uit iedere speen enkele stralen melk weg.

3. Houd de vierkwartierenschaal in een eenduidige (steeds dezelfde) richting onder de koe. Melk vervolgens uit iedere speen ongeveer twee stralen melk in de respectievelijke cup van de vierkwartierenschaal.

4. Wanneer de vierkwartierenschaal schuin gehouden wordt, blijft de gewenste hoeveelheid melk in de cupjes achter. Soms zijn maatstreepjes aangegeven.

5. Voeg aan elk cupje evenveel CMT-vloeistof toe als er melk in zit.

6. Meng de melk en de CMT-vloeistof door gedurende tien seconden de schaal langzaam horizontaal te zwenken. Wacht vervolgens niet, maar lees het resultaat direct af door de vierkwartierenschaal scheef te houden.

Foto's zijn afkomstig van het uiergezondheidscentrum Nederland (UGCN) www.ucgn.nl

Bacteriologisch onderzoek

Ondanks de opkomst van moleculair-biologische technieken als PCR, blijft het op kweek zetten van melk en het uitvoeren van het bacteriologisch onderzoek een belangrijke methode voor het aantonen van mastitisverwekkers in melk. Bacteriologisch onderzoek levert informatie over de prognose van de koe, geeft daarmee richting aan de behandeling en helpt bij het opstellen van een managementstrategie om nieuwe gevallen van mastitis te voorkomen. Alleen al het identificeren van de mastitisverwekker geeft informatie over behandelmogelijkheden. Een gevoeligheidsbepaling van de specifieke kiem kan de behandeling nog verder fine-tunen.

In het algemeen geldt voor klinische mastitis dat de informatie die uit bacteriologisch onderzoek komt vaak niet van belang is voor de individuele koe waarvan het monster afkomstig is. Hetzelfde geldt ook voor PCR onderzoek van melk; de behandeling is vaak al ingezet voordat de uitslag van het onderzoek beschikbaar is. Op bedrijfsniveau is de informatie echter wel van waarde. Om die reden wordt geadviseerd van elke koe met klinische mastitis een melkmonster te nemen voordat de koe behandeld wordt met antibiotica. Als dat weinig gevallen zijn op een bedrijf, is het weinig werk en als het veel gevallen zijn, is de informatie die er uit komt van groot belang om het bedrijfsprobleem te analyseren en op te lossen. De monsters kunnen in de diepvries bewaard worden

tot een moment dat het nuttig is de monsters te onderzoeken. In de diepvries blijft een monster enige tijd goed geschikt voor bacteriologisch onderzoek.

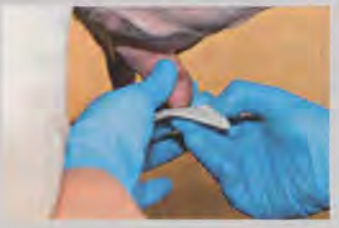
Voor de eventuele behandeling van subklinische mastitis met antibiotica is bacteriologisch onderzoek een vereiste om de diagnose zeker te stellen. Om op bedrijfsniveau een beeld te krijgen van de uiergezondheidssituatie is het nuttig bacteriologisch onderzoek te doen van een daarvoor geselecteerde groep dieren. Voor bacteriologisch onderzoek is het noodzakelijk dat het nemen van het melkmonster op de juiste manier gebeurt, zodat geen verontreiniging van het monster optreedt.

Bacteriologisch onderzoek van melk kan zowel op bedrijfsniveau (tankmelk) als op koe- en kwartierniveau worden uitgevoerd. In Nederland is aangetoond dat de sensitiviteit van het bacteriologisch onderzoek op melkmonsters van mengmelk van vier kwartieren sterk achteruitgaat. Daarom wordt geadviseerd om voor de diagnostiek op koeniveau bacteriologisch onderzoek uit te voeren van kwartiermonsters. Een uitzondering op dit advies is het bacteriologisch onderzoek bij verdenking op Mycoplasmasoorten.

Uitvoering: nemen van een melkmonster voor bacteriologisch onderzoek

1. Maak de uier en speen goed schoon met een uierdoek. Melk de eerste stralen weg.

2. Maak vervolgens de speenpunt schoon en ontsmet deze.



N.B: Als vier kwartieren van een koe bemonsterd worden, worden eerst de twee spenen 'veraf' gedesinfecteerd en dan de twee spenen 'dichtbij'. De volgorde bij het nemen van de monsters is precies andersom.

3. Neem het melkbuisje tussen duim en wijsvinger van de niet melkende hand. Trek met de andere hand de dop van het buisje en klem deze tussen de middelvinger en de wijsvinger van de niet melkende hand. Houd de dop met de onderzijde naar beneden.

4. Nadat een of twee stralen zijn weggemolken, wordt het monsterbuisje voor driekwart vol gemolken. Houd het monsterbuisje schuin onder de koe, zodat de kans dat er vuil in valt zo klein mogelijk is en sluit het buisje direct af.

N.B.: Uiteraard is een goede kwartier en koe-identificatie op de monsterbuisjes cruciaal.

Foto's zijn afkomstig van het uiergezondheidscentrum Nederland (UGCN)

Alternatieve methoden voor het aantonen van mastitisverwekkers in melk zijn veelal moleculair-biologische methoden, gebaseerd op het aantonen van DNA van bekende mastitisverwekkers. Vaak wordt de PCR (Polymerase Chain Reaction) gebruikt. Er zijn verschillende PCR kits voor het aantonen van mastitisverwekkers in melk op de markt, meestal gebaseerd op real-time PCR's waarmee een semi-kwantitatief resultaat wordt verkregen. Het voordeel van de PCR is dat deze ook gebruikt kan worden als koeien al met antibiotica behandeld zijn of als een conserveringsmiddel aan de monsters is toegevoegd, omdat voor de PCR de bacteriën niet levend hoeven te zijn. Ook is er een aantal lastig te kweken bacteriën zoals *Mycoplasma bovis*, die met PCR relatief eenvoudig aan te tonen zijn. Een nadeel van de PCR is dat je van te voren moet bepalen welke kiemen je wilt testen, terwijl met de kweek vrijwel alle bekende mastitisverwekkers aangetoond worden. Bovendien worden met PCR de mastitisverwekkers niet geïsoleerd uit de melk, zodat geen aanvullende typeringen kunnen worden uitgevoerd. Het ontbreken van de mogelijkheid, bij gebruik van een PCR, om een antibiogram te maken wordt deels ondervangen door de detectie van het β-lactamase gen en de daarmee samenhangende genetische resistentie tegen penicilline.

De belangrijkste bacteriën die mastitis kunnen veroorzaken en die in dit hoofdstuk aan de orde komen zijn weergegeven in onderstaande tabel.

Gram positieve kokken	**Gram negatieve staven**
- *Staphylococcus aureus* - Coagulase negatieve stafylokokken - *Streptococcus agalactiae* - *Streptococcus dysgalactiae* - *Streptococcus uberis*	- *Enterobacter* spp. - *Escherichia coli.* - *Klebsiella* spp.
Gram positieve staven	
- *Trueperella pyogenes* - *Corynebacterium bovis* - *Corynebacterium species*	

Tabel 1 *De belangrijkste mastitisverwekkers, ingedeeld op basis van gramkleuring*

Veiligheid en hygiëne

Wanneer het onderzoek in de dierenartspraktijk zelf wordt uitgevoerd, moet dit volgens standaardmethoden plaatsvinden om te komen tot betrouwbare resultaten. Dit begint bij het aseptisch nemen van een melkmonster. Daarnaast is het van belang om de nodige veiligheidsvoorschriften te hanteren, bedoeld voor de veiligheid van de laboratoriummedewerkers en diens contactpersonen, maar ook om te voorkomen dat schadelijke biologische agentia in het milieu terechtkomen. De meeste mastitisverwekkers vallen volgens de Arbowet onder risicoklasse II aangezien ze mogelijk ook ziekte bij de mens kunnen veroorzaken. Maar omdat het hierbij gaat om lage concentraties van micro-organismen mag het bacteriologisch onderzoek worden uitgevoerd op beheersingsniveau I, zoals bedoeld in het Arbeidsomstandighedenbesluit. Dit betekent dat geen bijzondere eisen gesteld worden aan laboratoria of werkruimten. Wel

worden werkvoorschriften geadviseerd die bekend staan als Veilige Microbiologische Technieken (VMT). Zonder te suggereren compleet te zijn, staan in Tabel 2 enkele belangrijke hygiëne- en veiligheidsregels voor het uitvoeren van bacteriologisch onderzoek van melk.

1. Sluit alle deuren en ramen;
2. Geen toegang voor onbevoegden;
3. Houd de werkruimte schoon en opgeruimd (vrij van bijvoorbeeld administratieve werkzaamheden);
4. Houd persoonlijke uitrusting buiten de werkruimte;
5. Eet, drink of rook nooit in de werkruimte;
6. Bewaar geen etens- of drinkwaren in het laboratorium;
7. Pipetteer nooit met de mond;
8. Vermijd zoveel mogelijk contact tussen hand en gezicht;
9. Draag geen sieraden, horloges, etc;
10. Zorg voor schone handen en kortgeknipte nagels;
11. Was bij iedere onderbreking van de werkzaamheden, na afloop van een experiment en bij het verlaten van de werkruimte de handen grondig met warm water en zeep en gebruik zo nodig een handdesinfectans;
12. Desinfecteer na afloop van het werk alle gebruikte werkoppervlakken;
13. Desinfecteer aan het einde van iedere werkdag alle werkoppervlakken;
14. Draag een gesloten laboratoriumjas ter bescherming van de eigen kleding en draag deze niet buiten de eigenlijke werkruimte;
15. Verschoon de laboratoriumjas regelmatig en vervang een bemorste jas direct door een schone;
16. Voorzie alle materialen waarin biologische agentia worden gekweekt en bewaard van initialen van de laboratoriummedewerker(s) die het monster in onderzoek heeft en een datum (niet op de deksels van de petrischalen aangezien deze makkelijk kunnen worden verwisseld);
17. Voorkom aërosoolvorming;
18. Verzamel besmet afval (biologisch en wegwerpmateriaal) op een juiste manier en voer het op een adequate werkwijze af, bijvoorbeeld in breukvaste, lekvrije en gesloten afvalvaten. Afval met micro-organismen behorend tot risicoklasse I en II mag zonder voorafgaande inactivatie als ziekenhuisafval ter verwerking worden aangeboden;
19. Voer materialen die met micro-organismen in contact zijn geweest en moeten worden hergebruikt op een adequate wijze af voor reiniging en desinfectie/ sterilisatie om te voorkomen dat besmetting buiten de werkruimte optreedt.

Tabel 2 *Een aantal belangrijke richtlijnen m.b.t. hygiëne en veiligheid bij het uitvoeren van bacteriologisch onderzoek van melk*

Het kweken van micro-organismen

Door middel van kweek worden micro-organismen vermeerderd. Hierbij wordt gebruikt gemaakt van vaste of vloeibare voedingsmedia. Op vaste voedingsmedia vormt elk micro-organisme dat zich kan vermeerderen een zogenaamde kolonie met specifieke koloniekenmerken (macromorfologie). Kolonies zijn met het blote oog zichtbaar. Micro-organismen kunnen vanaf een vaste voedingsbodem eenvoudig worden geïsoleerd voor bijvoorbeeld identificatie; dit kan door het simpelweg aantippen en overenten van koloniemateriaal op een nieuwe vaste voedingsbodem. Bovendien kan op basis van het aantal kolonies op een vaste voedingsbodem een inschatting worden gemaakt van de hoeveelheid van het betreffende micro-organisme aanwezig in het oorspronkelijke monstermateriaal. In een vloeibaar medium, een bouillon, is groei van micro-organismen zichtbaar als een troebeling van het medium. Kweek in een vloeibaar medium wordt met name gebruikt om micro-organismen te vermeerderen voorafgaand aan het vervolg van de bepaling, omdat ze naar verwachting in lage aantallen aanwezig zijn of in een minder goede conditie verkeren, of om de groei van micro-organismen te volgen met turbiditeitsmetingen (de troebelheid).

Belangrijke microbiologische definities:

Cultuur	Voedingsmedium of bouillon begroeid met bacteriën, schimmels of gisten
Kolonie	De zichtbare groei van micro-organismen op een voedingsbodem, meestal 1-2 mm Ø groot
Reincultuur	Een cultuur bestaande uit één soort micro-organisme, elke kolonie is ontstaan uit één cel
Mengcultuur	Een cultuur bestaande uit meerdere soorten micro-organismen

Voedingsbodems

Er bestaan verschillende soorten voedingsbodems. Algemene voedingsbodems bevorderen de groei van in principe alle micro-organismen, zonder voor bepaalde soorten een selectief voordeel te leveren. Ze bevatten water, voedingsstoffen en eventueel een geleermiddel. Soms wil men echter selectief bepaalde soorten of groepen kweken en de overige micro-organismen (stoorflora) in het monster remmen of doden.

Selectieve voedingsbodems zijn voedingsbodems waaraan groeibevorderende, selectieve en vaak ook electieve stoffen zijn toegevoegd. Groeibevorderende stoffen stimuleren de groei van de gewenste micro-organismen. Selectieve stoffen remmen de groei van ongewenste micro-organismen. En electieve stoffen geven de kolonies van de gewenste micro-organismen (of het medium eromheen) een specifiek (herkenbaar) uiterlijk, zodat bij aanwezigheid van stoorflora toch een onderscheid kan worden gemaakt tussen de gewenste micro-organismen en de overige micro-organismen. Het meest specifiek werken voedingsbodems met een zogenaamd chromogeen of fluorogeen substraat. Dit zijn stoffen die door een specifiek enzym kunnen worden omgezet in een gekleurde of fluorescerende verbinding. Omdat het bezit van een dergelijk enzym soort- of groepspecifiek is, is het mogelijk bepaalde soorten of groepen microorganismen te herkennen. De keuze voor een bepaalde voedingsbodem wordt bepaald

door het micro-organisme dat men wil kweken en de aard van het onderzoeksmateriaal. Wanneer het materiaal van nature veel bacteriesoorten bevat, zal voor het isoleren van een specifieke soort de voorkeur uitgaan naar het gebruik van een selectieve agar.

De meeste voedingsbodems zijn commercieel kant en klaar verkrijgbaar. De bewaartemperatuur en de bewaartermijn worden aangegeven door de producent. Gebruik de media niet na de expiratiedatum, omdat de bestanddelen vaak niet lang houdbaar zijn en de voedingsbodem na deze datum mogelijk niet meer dezelfde kwaliteit heeft. Bewaar de vaste voedingsbodems met de agarzijde hangend in verband met condensvocht dat niet op de agar mag vallen.

Voedingsbodems voor het isoleren van mastitisverwekkers

Voor het isoleren van mastitisverwekkers worden vaak drie verschillende voedingsbodems gebruikt: een niet-selectieve bloedagar, een selectieve voedingsbodem voor *Streptococcus* spp. en een voedingsbodem, selectief voor gramnegatieve bacteriën, voor het aantonen van coliformen.

Niet-selectieve bloedagar

In principe groeien (bijna) alle micro-organismen op bloedagar en meestal beter dan op een selectieve voedingsbodem. Op deze plaat kunnen de hemolytische eigenschappen van de bacterie worden gezien. De bloedagar wordt na incuberen beoordeeld op groei en kolonievorming zoals hieronder beschreven.

Groei

- De hoeveelheid groei: + weinig groei, ++ matige groei, +++ veel groei
- Het aantal morfologisch verschillende kolonies
- Het in overmaat aanwezig zijn van één of twee typen

Koloniemorfologie

- Grootte
- Vorm: plat of bol, droog, vochtig of slijmerig
- Kleur: wit, crème, geel, grijs, ...
- Hemolyse (afbraak van de rode bloedcellen): totale opheldering van de voedingsbodem of vergroening rondom de kolonies (beoordeel tegen het licht)
- Zwerming (groei over de agarplaat, *Proteus* spp.)

Selectieve agar voor Streptococcus species

Voor het isoleren van *Streptococcus* spp. wordt vaak gebruik gemaakt van gemodificeerd Edwardsmedium en TKT agar. Deze media bevatten selectieve agentia voor het remmen van de groei van gramnegatieve bacteriën en *Staphylococcus* spp. Aesculine is toegevoegd voor het differentiëren van groep D streptokokken en *Streptococcus agalactiae*. Groep D streptokokken zijn in staat aesculine te hydrolyseren, waardoor een zwarte neerslag rond de kolonies zichtbaar wordt. *S. agalactiae* is hiertoe niet in staat, waardoor geen zwarte neerslag wordt gevormd. Het gemodificeerde Edwardsmedium en TKT agar worden na incuberen als

volgt beoordeeld op groei en kolonievorming:

Groei
- De hoeveelheid groei: + weinig groei, ++ matige groei, +++ veel groei
- De overeenkomst met de groei op de bloedagarplaat
- Het in overmaat aanwezig zijn van één of twee typen

Koloniemorfologie
- Grootte
- Vorm
- Kleur
- Aesculinehydrolyse: zwarte neerslag rond de kolonie bij blootstelling aan UV-licht

Selectieve plaat voor coliformen

Als selectieve plaat voor coliformen wordt veelal MacConkey agar gebruikt. De meeste grampositieve bacteriën en de gramnegatieve *Pasteurellaceae* groeien niet op deze plaat. De remmende factoren in deze plaat zijn galzouten en kristalviolet. Door het aanwezige lactose kunnen coliformen, een specifieke groep binnen de familie van de *Enterobacteriaceae* die in staat zijn lactose te fermenteren, worden onderscheiden van andere *Enterobacteriaceae* die dit niet kunnen. Coliformen, zoals *E. coli* en *Klebsiella* spp., vormen als gevolg van het fermenteren van de lactose paarsrode kolonies. Soms zijn deze kolonies omgeven met een rode hof door precipitatie van de aanwezige galzouten. Niet-coliforme *Enterobacteriaceae* vormen gele kolonies. De MacConkey agar wordt na incuberen beoordeeld op:

Groei
- De hoeveelheid groei: + weinig groei, ++ matige groei, +++ veel groei
- De overeenkomst met de groei op de bloedagarplaat
- Het in overmaat aanwezig zijn van één of twee typen

Koloniemorfologie
- Grootte
- Vorm: plat of bol, droog, vochtig of slijmerig
- Kleur: paarsrode kolonies zijn lactosefermenterend en gele kolonies zijn niet-lactosefermenterend

Uitvoering: beënten van de voedingsbodem

N.B.: In verband met condensvorming worden agarplaten altijd op de kop, met de agarzijde hangend, neergezet. Ook worden ze op deze manier in de broedstoof geplaatst.

Zorg altijd voor steriele entogen. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van wegwerpentogen, of het entoog kan direct voor én na gebruik worden uitgegloeid. Laat hiervoor eerst het midden van de naald gloeien totdat eventueel infectieus materiaal aan het oog is opgedroogd. Vervolgens moet het oogje zelf worden uitgegloeid. Laat het entoog goed afkoelen (15 seconden) voordat deze gebruikt wordt om te enten.

Enten:
Neem een steriel entoog in de ene hand en neem met de andere hand de schaal met het medium. Ent vervolgens een volume van 10 µl melk in 3 stappen zodanig uit over een voedingsbodem dat na incuberen op de laatste entstrepen losliggende kolonies groeien; alleen met losliggende kolonies kan verder gewerkt worden.

Stap 1 Stap 2 Stap 3

- Stap 1: Beënt $^1/_3$ deel van een voedingsbodem door evenwijdige strepen over de agar te trekken;

- Stap 2: Strijk met een nieuw entoog, of hetzelfde entoog na uitgloeien (5 sec.) en afkoelen (15 sec.), driemaal door de laatste entstrepen van deze eerste afenting en trek daarna opnieuw evenwijdige strepen over de agar, zodat in totaal circa driekwart van de plaat is beënt;

- Stap 3: Strijk met wederom een nieuw entoog, of hetzelfde entoog na uitgloeien (5 sec.) en afkoelen (15 sec.), driemaal door de laatste entstrepen gemaakt bij stap 2 en trek daarna evenwijdige strepen over het laatste kwart van de plaat.

Incuberen van de voedingsbodems

Na het afenten van de melk op de voedingsbodems worden de platen bij 37°C geïncubeerd. In verband met condensvorming worden ze op de kop, met de agarzijde hangend, in de broedstoof geplaatst; het condensvocht mag niet op de agar vallen.

Omdat sommige mastitisverwekkers pas zichtbaar zijn na 48 uur incuberen, worden de platen zowel na 24 (21 ± 3 uur) als na 48 uur incuberen beoordeeld. Een aantal micro-organismen groeit trager en heeft daarom een langere incubatietijd nodig om zichtbaar te worden op de voedingsbodem (tabel 3).

Het kweken van Mycoplasma species gebeurt alleen in gespecialiseerde laboratoria, omdat hiervoor speciale groeicondities (voedingsbodem en atmosfeer) nodig zijn.

Micro-organisme	Tijd	Temperatuur
Streptococcus spp.	24-48 uur	35-37°C
Staphylococcus spp.	24-48 uur	35-37°C
Gramnegatieve bacteriën	24 (-48 uur)	35-37°C
Trueperella pyogenes	2-4 dagen	35-37°C
Nocardia spp. (zeldzaam)	2-5 dagen	35-37°C
Prototheca spp. (groep van algen)	48-72 uur	23-37°C
Corynebacterium bovis	48-72 uur	35-37°C
Corynebacterium spp.	1-4 dagen	35-37°C
Grampositieve bacteriën	24-48 uur	35-37°C
Mycoplasma spp. (speciale condities)	2 tot 10 dagen	35-37°C
Gisten, schimmels	24-72 uur	23-37°C

Tabel 3 *Incubatietijden en temperaturen van verschillende (groepen) mastitisverwekkers*

Beoordeling van de directe kweek

Is het monster goed uitgestreken?

Wanneer goed is uitgestreken, groeien op de laatste entstrepen losliggende kolonies.
Wanneer niet goed is uitgestreken, groeien er geen of onvoldoende losliggende kolonies op de voedingsbodem. Een plaat waarop geen of onvoldoende losliggende kolonies groeien, kan niet worden beoordeeld.

Rein- of mengcultuur

De volgende stap is het beoordelen van de losliggende kolonies op uiterlijke kenmerken (koloniemorfologie) als grootte, vorm (plat of bol, droog, vochtig of slijmerig) en kleur.
De grootte van de individuele kolonies wordt beïnvloed door de incubatieduur en -temperatuur, de voedingsbodem en de koloniedichtheid.

De morfologische kenmerken van de verschillende typen kolonies worden vastgelegd en tevens wordt het aantal kolonies per type genoteerd.

Wanneer alle kolonies dezelfde morfologie hebben, is er sprake van een reincultuur. Wanneer morfologisch verschillende kolonies herkenbaar zijn, betreft het een mengcultuur en moeten de verschillende typen worden reingekweekt.

Het maken en beoordelen van reinculturen

Voor het maken van een reincultuur wordt een losliggende kolonie aangetipt met een steriel entoog en het koloniemateriaal op dezelfde wijze als eerder aangegeven voor de melk, afgestreken op een niet-selectieve voedingsbodem. Dit wordt gedaan voor één kolonie van elk van de morfologisch verschillende typen kolonies. De beënte voedingsbodems worden 24 uur bij 37°C geïncubeerd.

Bij het beoordelen van de reincultuur wordt eerst gekeken of goed is uitgestreken. Dit is het geval als op de laatste entstrepen losliggende kolonies groeien. Vervolgens wordt gekeken naar koloniemorfologie. Wanneer alle kolonies dezelfde morfologie hebben, is een reincultuur verkregen.

Wanneer morfologisch verschillende kolonies worden onderscheiden, moeten opnieuw voor elk van de morfologisch verschillende typen kolonies, reinkweken worden gemaakt.

Identificatie van reinculturen

Voor de identificatie van de reinculturen kunnen verschillende methoden worden gebruikt, zoals bijvoorbeeld een Gramkleuring, biochemische testen en moleculair-biologische testen. In de grotere diagnostische laboratoria wordt tegenwoordig veelal gebruik gemaakt van MALDI-TOF MS, een op massaspectrometrie gebaseerde methode. Vaak wordt een combinatie van testen ingezet. Voor een juiste identificatie moeten alle gegevens (morfologie van de kolonies, beeld van de Gramkleuring, biochemische testresultaten en eventuele resultaten van commerciële testen etc.) samen beoordeeld worden.

Gramkleuring

Voor het op klassieke wijze identificeren van mastitis veroorzakende bacteriën wordt geadviseerd te beginnen met een Gramkleuring, waarmee op basis van de vorm en de kleur van het microorganisme een eerste classificering kan worden gedaan, op grond waarvan gericht specifieke biochemische testen kunnen worden ingezet voor het bepalen van het geslacht en eventueel de soort mastitisverwekker.

De Gramkleuring is vernoemd naar de Deense bacterioloog Hans Christian Gram, die deze methode in 1884 voor het eerst beschreef en is weergegeven in figuur 1. Het is bijna altijd de eerste test om bacteriën te identificeren. De Gramkleuring zegt iets over de aard van de celwand en deelt bacteriën in de volgende twee groepen in: grampositieve en gramnegatieve bacteriën. Daarnaast kan onder de microscoop de vorm van de bacterie worden beoordeeld.

De primaire kleur die wordt gebruikt in de Gramkleuring is kristalviolet. De bacteriën nemen de kleurstof op en krijgen daardoor een paarse kleur. Daarna volgt een behandeling met lugoloplossing dat er voor zorgt dat een onoplosbaar kristalviolet-jodium complex wordt gevormd, waardoor de cel sterker kleurt. Na ontkleuring met ethanol, behouden grampositieve bacteriën het kristalviolet-jodium complex, terwijl gramnegatieve bacteriën het verliezen. De gramnegatieve bacteriën bezitten een hele dunne peptidoglycaanlaag (celwand) waardoor ze makkelijk worden ontkleurd door alcohol. I.p.v. een dikke peptidoglycaanwand hebben ze wel een extra buitenmembraan met liposacchariden, maar deze is gewoon doordringbaar voor alcohol. Bij tegenkleuring met safranine kleuren de ontkleurde gram negatieve bacteriën rozerood.

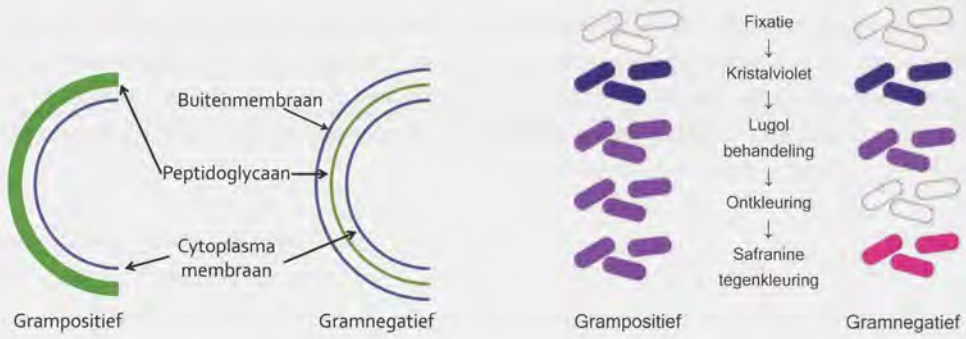


Fig 1 *Links: Celmembraan van grampositieve en gramnegatieve bacteriën.*
Rechts: Schematische weergave van de verschillende stappen van de Gramkleuring.

Uitvoering: Gramkleuring

N.B. Er bestaan verschillende uitvoeringen van de Gramkleuring. Wanneer een commerciële kit wordt gebruikt dan moet het bijgeleverde voorschrift worden gevolgd.

N.B. Aandachtspunten zijn het gebruik van niet te dikke preparaten en culturen niet ouder dan 24 uur. Grampositieve soorten kunnen bij het ouder worden negatief worden, zodat zowel Grampositieve als Gramnegatieve cellen in het preparaat aanwezig kunnen zijn.

- Breng een druppel fysiologisch zout (0.9%) op een objectglaasje aan;
- Neem met een steriel entoog een kolonie (of gedeelte daarvan) van de voedingsbodem en meng het koloniemateriaal voorzichtig met het fysiologisch zout;
- Laat het preparaat goed aan de lucht drogen;
- Fixeer het preparaat, wanneer het helemaal droog is, door het glaasje driemaal "snijdend" door de vlam te halen;
- Laat het preparaat afkoelen;
- Kleur het preparaat als volgt (indien een commerciële kit wordt gebruikt, volg dan het voorschrift van de fabrikant):
    a. Kleur 60 seconden met Gram I (Gram's Karbolgentiaanviolet)
    b. Spoel af met Lugol
    c. Kleur 60 seconden met Lugol (Gram's lugoloplossing)
    d. Giet af
    e. Ontkleur 45 seconden met 96% alcohol (spoelen in een bakje alcohol) en zwenk daarbij.
    f. Spoel af met leidingwater
    g. Kleur 90 seconden na met Gram 3 (Gram's Karbolfuchineoplossing)
    h. Spoel af met water
    i. Laat het preparaat drogen aan de lucht
- Bekijk het preparaat onder een microscoop met olie-immersie bij een vergroting van 10x100.
- Beoordeel de grootte, vorm en kleur van de micro-organismen

Gram-positief: paarsblauw
Gram-negatief: rozerood

N.B.: naast bacteriën kunnen in een Grampreparaat soms ook gisten worden gezien; gisten zijn donkerpaars na Gramkleuring en ongeveer 10x groter dan kokken.

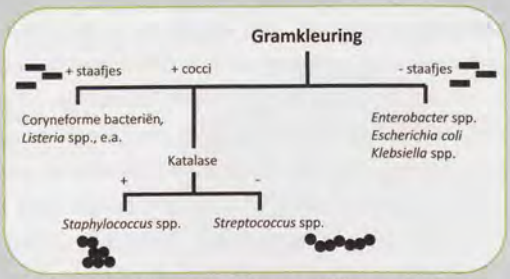


Fig 2 *Indeling mastitisverwekkers op basis van Gramkleuring*

Biochemische identificatie

Na deze eerste grove indeling in grampositieve kokken, grampositieve staven en gramnegatieve staven kunnen gericht specifieke biochemische testen worden ingezet voor het bepalen van het geslacht en eventueel de soort mastitisverwekker.

Grampositieve kokken

Voor mastitisdiagnostiek is het belangrijk binnen de grampositieve kokken onderscheid te maken tussen *Staphyloccoccus* spp. en *Streptococcus* spp. Dit kan op eenvoudige wijze met behulp van de katalasetest. De katalasereactie wordt gebruikt om te bepalen of een bacterie het enzym katalase bezit. Het enzym katalase splitst, bij oxidatieve afbraak van glucose en andere suikers, het gevormde giftige eindproduct H_2O_2 in H_2O en O_2. *Staphyloccoccus* spp. zijn katalase-positief en *Streptococcus* spp. katalase-negatief.

Uitvoering: Katalasetest

- Breng m.b.v. een entoog een deel van de te onderzoeken kolonie op een objectglaasje;

N.B: Neem geen stukjes van de bloedplaat mee; deze geven vals-positieve resultaten;

- Laat op de plaats waar de kolonie is opgebracht een druppel 3% H_2O_2 vallen.

positieve reactie: het ontstaan van gasbelletjes
negatieve reactie: geen gasbelletjes

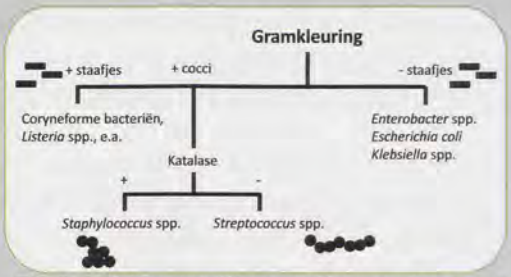


Fig 3 *Indeling mastitisverwekkers op basis van Gramkleuring en katalasetest*

Staphyloccoccus spp.

Verder is het belangrijk de coagulase-positieve *Staphyloccoccus aureus* en coagulase-negatieve *Staphyloccoccus* spp. van elkaar te onderscheiden. Typische mastitisveroorzakende *Staph. aureus* kolonies vertonen op een bloedplaat dubbele hemolyse; een grote zone van incomplete en een kleine zone van complete hemolyse. Wanneer de geïsoleerde *Staphyloccoccus* spp. geen dubbele hemolyse vertoont, moet een coagulase-test uitsluitsel geven. De test is erop gebaseerd dat alle *Staph. aureus* stammen in een natte omgeving in korte tijd vrije coagulase vormen, dat konijnenplasma in een buisje doet coaguleren/stollen. Helaas zijn er stammen die ook staphylokinase vormen, zodat het stolsel weer vervloeit. Een alternatief voor de vrije coagulasetest is de gebonden coagulasetest op een voorwerpglas. Deze is echter minder betrouwbaar dan de vrije coagulasetest. Met de coagulasetest kan echter geen onderscheid worden gemaakt tussen *Staph. aureus* en andere coagulase-positieve *Staphyloccoccus* spp.

(*Staph. intermedius* en de coagulase variabele *Staph. hyicus*). *Staph. intermedius* wordt echter zelden uit melk geïsoleerd en *Staph. hyicus* met een lage frequentie. Typisch voor *Staph. hyicus* zijn de heel witte kolonies zonder hemolyse.

Uitvoering: Vrije Coagulasetest

- Pipetteer 0,5 ml konijnenplasma in een buisje;
- Suspendeer hierin enkele kolonies van de te onderzoeken stafylokokkencultuur;
- Neem een positieve (*S. aureus*) en negatieve (*S. epidermidis*) controle mee;
- Incubeer de buisjes 4 uur in een waterbad van 37 ± 1°C en beoordeel de buizen ieder uur gedurende de eerste 4 uur.
- Als de buis na 4 uur negatief is, wordt de buis voor 17 ± 3 uur teruggezet in het waterbad (totale incubatietijd 21 ± 3 uur);

N.B.: De buis niet schudden of ruw behandelen vóór het aflezen.

positieve reactie: het stollen of stroperig worden van het plasma
negatieve reactie: plasma nog dun-vloeibaar

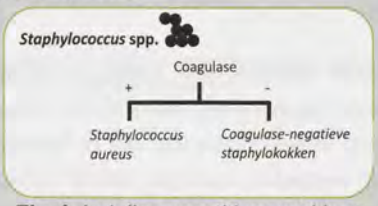


Fig 4 *Indeling mastitisverwekkers op basis van de coagulasetest*

***Streptococcus* spp.**

De meest voorkomende *Streptococcus* spp. in melk zijn *Streptococcus dysgalactiae* en *Streptococcus uberis*. *Streptococcus agalactiae* komt minder vaak voor, maar is wel belangrijk.

Alleen bij *Streptococcus spp.* wordt de vorm van hemolyse op de bloedagarvoedingsbodem met α, β en γ benoemd. De hemolyse wordt op een bloedagarplaat beoordeeld:

α-hemolyse: ook wel incomplete hemolyse genoemd en gekenmerkt door een vergroenende zone van de agar om de kolonies. Deze hemolyse wordt veroorzaakt door waterstofperoxide dat door de bacterie wordt gevormd en het hemoglobine omzet in met-hemoglobine.

β-hemolyse: complete hemolyse en heldere rand om de kolonies, veroorzaakt door de exotoxine Streptolysine.

γ-hemolyse: geen verandering van de bloedagar om de kolonies = indifferent

Fig 5 Sreptococcus *spp en α-, β-, en γ-hemolyse op een bloedagarplaat*

Verder verschillen deze drie species in esculinehydrolyse. Dit kan worden beoordeeld aan de hand van de groei op gemodificeerd Edwardsmedium of TKT agar (zie p.179). Andere testen waarmee deze drie *Streptococcus* spp. van elkaar kunnen worden onderscheiden, zijn een Lancefieldtypering en de CAMP-test. De Lancefieldtypering dient volgens de instructie van de testleverancier uitgevoerd te worden. Op basis van al deze gegevens samen kan een goed onderscheid tussen de verschillende streptokokken gemaakt worden, zoals in tabel 4 in overzicht is weergegeven.

	Hemolyse	Serotype Lancefield	CAMP	Aesculine
Strept. agalactiae	β (α, γ)	B	+	-
Strept. dysgalactiae	α (γ)	C	-	-/+
Strept. uberis	γ (α)	geen	-/+	+
Enterococcus species	α (γ)	D (-)	-	+

+ = >90% van de stammen is positief
- = >90% van de stammen is negatief
-/+ = meer stammen zijn negatief dan positief

Tabel 4. *Onderscheid van de belangrijkste mastitis streptokokken*

CAMP-test (Christie, Atkins en Munch-Peterson)

Strept. agalactiae produceert op schapenbloedagar de zogenaamde CAMP-factor. Deze factor werkt synergistisch met het β-hemolysine van een *Staph. aureus* stam, hetgeen resulteert in een versterkte hemolyse van de schapen-erythrocyten op het punt waar het β-hemolysine van *Staph. aureus* samenkomt met de CAMP-factor van de te onderzoeken bacterie.

Uitvoering: CAMP-test

- Gebruik een *Staph. aureus* stam met een dubbele hemolyse zone;
- Beënt een bloedplaat zoals op de afbeelding is aangegeven;
- Incubeer de bloedplaat overnacht (21 ± 3 uur bij 37 ± 1°C).

positieve reactie: versterking van de hemolyse (*Strep. agalactiae*)

negatieve reactie: geen versterking van de hemolyse, dus geen *Strep. agalactiae*

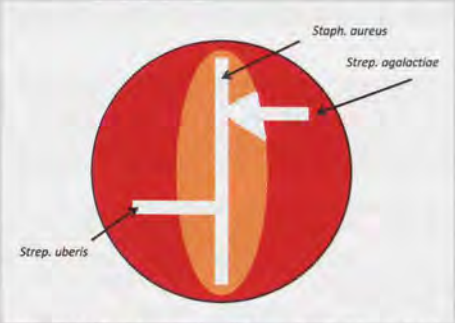


Fig 6 *CAMP-test met* Staph. agalactiae *en* Staph. uberis

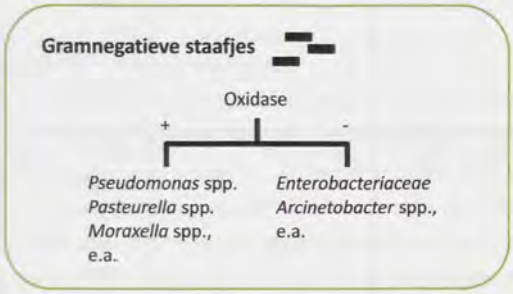
Grampositieve staven

Grampositieve staven die mastitis kunnen veroorzaken zijn *Trueperella pyogenes* (voorheen *Arcanobacterium pyogenes, Actinomyces pyogenes, Corynebacterium pyogenes*) en *Corynebacterium* spp. Beiden groeien alleen op bloedagar en vaak pas na 48 uur incuberen. Ze kunnen van elkaar worden onderscheiden op basis van bijvoorbeeld koloniemorfologie, hemolyse en katalase-activiteit (zie tabel 5).

Bacterie	Groeiwijze koloniën schapenbloedagar	Groeiwijze MacConkey	Groeiwijze koloniën Edwards medium	Extra testen
Trueperella pyogenes	Zeer fijn (< 0,5 mm Ø), grijs-wit, hemolyse langs entstreep (bloedplaat tegen het licht houden). N.B. Groei meestal pas te zien na 48 uur incuberen	geen groei	geen groei	Gram-labiel staafje Katalase -
Corynebacterium bovis	Dof, grijswit, klein (1-2 mm Ø)	geen groei	geen groei	Gram + staafje Katalase +

Tabel 5 *Identificatie van de verschillende grampositieve staven.*

Gramnegatieve staven



De groep gramnegatieve staven is heel groot. Met behulp van de oxidasetest is het mogelijk ze in twee grote groepen in te delen.

Fig 7 *Indeling gramnegatieve staven op basis van de oxidase-reactie.*

Uitvoering: Oxidase-test

Breng een kleine druppel oxidase reagens (tetramethylparafenyleendimine) op een strip filtreerpapier (mag niet doorweekt zijn) en wrijf er met een entoogje een beetje cultuur van een vaste voedingsbodem op. Zorg dat de strip niet rechtstreeks op tafel ligt; leg de strip bijv. op een voorwerpglaasje.

Interpretatie: positief als er binnen 30 seconden een diepblauwe kleur ontstaat.

Bacteriën van de familie van de *Enterobacteriaceae* zijn tevens darmbewoners. Het zijn mastitisverwekkers afkomstig uit het milieu en te vinden in stro, water, aarde en plantenmateriaal. De familie van de *Enterobacteriaceae* bestaat uit meer dan 30 genera. De belangrijkste genera die mastitis kunnen veroorzaken zijn *Escherichia* en *Klebsiella*. Deze zijn goed te onderscheiden d.m.v. een Indoltest. Deze test is gebaseerd op het aantonen van het enzym tryptofanase welke tryptofaan samen met water omzet in pyruvaat en indol en waarbij ook ammoniak ontstaat.

Heel vaak wordt ook de benaming 'coliforme bacteriën' gebruikt. Coliforme bacteriën zijn *Enterobacteriaceae* die lactose kunnen fermenteren. Voor het identificeren van bacteriesoorten behorend tot de familie van de *Enterobacteriaceae* zijn veel verschillende biochemische reacties noodzakelijk. Hierbij kan gebruik gemaakt worden van commerciële testsystemen (bijvoorbeeld API20E, Crystal). In onderstaande tabel staan de verschillende eigenschappen van de belangrijkste mastitisverwekkers. Ook de indoltest is commercieel verkrijgbaar

Bacterie	**Groeiwijze koloniën schapenbloedagar**	**Groeiwijze MacConkey**	**Groeiwijze koloniën Edwards medium**	**Extra testen**
Escherichia coli	Rond, glad, glanzend, afgeplat, (3-5 mm Ø)	paars, zelfde vorm als op shapenbloedagar	geen groei	Gram - staafje Oxidase - Indol +
Klebsiella spp.	Rond, glad, glanzend, slijmerig, (4-5 mm)	vet, slijmerig, bleek rose	geen groei	Gram - staafje Oxidase - Indol -, Commercieel systeem
Enterobacter spp.	Rond, glad, glanzend, (4-5 mm Ø)	vet, bleek rose	geen groei	Gram - staafje Oxidase - Indol - Commercieel systeem
Pseudomonas aeruginosa	Rond of onregelmatig, afgeplat, grijswit tot grauwgroen, soms metaalglans (~3 mm Ø), typische geur (ester, aromatisch), hemolyse	vorm: zie schapenbloedagar, kleurloos	geen groei	Gram - staafje Oxidase +

Tabel 6 *Identificatie van de meest belangrijke gramnegatieve staven.*

Kwaliteitscontroles

In gecertificeerde laboratoria wordt gewerkt met eerste-, tweede- en derdelijns kwaliteitscontroles. De eerstelijns kwaliteitscontrole wordt uitgevoerd door de analist zelf door bij elke reeks bepalingen een blanco en een positieve controle mee te nemen. Resultaten mogen pas

worden afgelezen nadat de eerstelijns controles zijn beoordeeld en geen afwijkingen zijn geconstateerd. Bij tweedelijns controles worden blinde monsters gebruikt, de analist weet dan niet wat er in het monster zit. Monsters kunnen gesplitst zijn of bijvoorbeeld kunstmatig besmet. De variatie binnen en tussen analisten kan zo beoordeeld worden. Bij derdelijns kwaliteitscontroles wordt deelgenomen aan rondzendoefeningen en worden de resultaten met andere laboratoria vergeleken.

Interpretatie van het resultaat in samenhang met het klinische beeld

Een juiste interpretatie van het bacteriologisch onderzoek is lang niet altijd eenvoudig. Men dient de interpretatie altijd te relateren aan het ziektebeeld. Ook en vooral bij het opsturen van een monster is de anamnese van cruciaal belang voor een juiste interpretatie. Helaas ontbreekt de anamnese te vaak bij monsters, met name of het rund ziek is en of de mastitis zich afspeelt rond de partus. In geval van een reincultuur of een overheersende groei kan men aannemen dat de gevonden kiem zeer waarschijnlijk de verwekker is van de mastitis. Dat geldt ook voor minor pathogenen zoals coagulase-negatieve stafylokokken. Bij het kweken van meerdere kiemen uit een monster zal men zoeken naar bekende pathogene kiemen en zal men rekening dienen te houden met de kwaliteit van de monstername en de transportcondities. Afhankelijk van de situatie kan een bacterie die in overmaat aanwezig is, echter toch van belang zijn. In dergelijke gevallen, maar ook als er slechts enkele kolonies groeien, is de klinische informatie van groot belang. Bij een mengcultuur is er in het algemeen sprake van een verontreiniging van het monster.

Negatieve kweekresultaten

Een grote drempel voor veel veehouders en dierenartsen om een kweek van mastitismelk te (laten) doen, is het grote percentage negatieve uitslagen. Men mag ervan uitgaan dat ongeveer 1/3 van alle monsters van klinische mastitis een negatieve uitslag oplevert. Dit is internationaal bekend en in verschillende laboratoria over de hele wereld worden grofweg dezelfde percentages gezien. De frustratie en teleurstelling kan aanmerkelijk verminderd worden wanneer vóór het insturen van de melkmonsters al is aangegeven dat ongeveer een derde van de monsters negatief zal worden en als is uitgelegd wat daar de oorzaken van kunnen zijn.

Op bedrijven waar klinische mastitis veroorzaakt door *E. coli* veel voorkomt kan het percentage bacteriologisch-negatieve monsters oplopen tot wel 50%. Met *E. coli* mastitis kan de immunologische verdediging van het uierweefsel soms succesvol zijn in het opruimen van de bacteriën binnen 8-12 uur. Dus op bedrijven waar tweemaal daags wordt gemolken, kan de infectie, die net na het melken is opgelopen, bij de volgende melking weer verdwenen zijn en dus niet aangetoond worden in het laboratorium. De melk kan in deze gevallen nog sterk afwijkend zijn en de koe nog ernstig ziek.

Een andere mogelijke oorzaak van kweek-negatieve uitslagen is de chronisch intermitterende uitscheiding van *Staph. aureus*. Eén enkel monster zal de infectie missen in ongeveer 25% van de gevallen. Als twee monsters gedurende twee opeenvolgende melkmalen genomen zouden

worden, is de kans op het missen van de infectie teruggelopen zijn tot 6%.

Dan is er nog de mogelijkheid dat bacteriën gemist worden, omdat ze de opslag en het transport niet overleefd hebben. Idealiter worden melkmonsters vers en binnen enkele uren na het verzamelen ervan in het laboratorium ingezet. Bewaartijden langer dan 24 uur zijn minder geschikt om de melkmonsters alleen gekoeld te bewaren. Deze melkmonsters moeten worden ingevroren bij een constante temperatuur. Ook kunnen biest of de aanwezigheid van residuen van antibiotica in de melk de groei van eventueel aanwezige bacteriën belemmeren.

Het kan uiteraard ook zo zijn dat daadwerkelijk geen oorzakelijke bacterie aanwezig is, maar dat bijvoorbeeld sprake is van een steriele ontsteking door een chemische, mechanische of fysische oorzaak. Tenslotte is het nog mogelijk dat een infectie speelt met een bacterie die middels routine diagnostiek niet gevonden wordt. Een voorbeeld hiervan is *Mycoplasma* spp.; voor het kweken van *Mycoplasma* spp. zijn speciale media nodig.

Vervuilde melkmonsters of mengflora

Melkmonsters kunnen gemakkelijk verontreinigd raken. In deze monsters zitten zoveel verschillende micro-organismen, dat het laboratorium niet meer aan kan geven of ze nu uit de omgeving komen tijdens het nemen van het monster (bijvoorbeeld stof en boxmateriaal van de uier), of dat het de oorzaak is van mastitis. De oorzaak van deze uitslag kan velerlei zijn. Eén zaak staat wel vast en dat is dat het zonde van de tijd en de kosten is. Als er veel verontreinigde monsters op één uitslag voorkomen, beïnvloeden ze de interpretatie van de overige monsters. Als er immers in één monster *E. coli* gevonden wordt tussen allemaal verontreinigde monsters, is het mogelijk dat deze *E. coli* een verontreiniging is in plaats van de veroorzaker van mastitis. Een bepaald percentage verontreinigde monsters is vrijwel niet te voorkomen, maar het totaal moet ruim onder de 10% kunnen blijven. De oorzaak van de verontreiniging moet gezocht worden in de kwaliteit van de monstername en de kwaliteit van het transport of opslag.

Conclusies voor de praktijk

- Bacteriologisch onderzoek is van grote waarde bij het oplossen van uiergezondheidsproblemen
- Voor een waardevolle bacteriologische uitslag is een goede monstername essentieel
- Het uitvoeren van bacteriologisch onderzoek is goed uitvoerbaar, maar vraagt om een professionele aanpak
- Voor een juiste interpretatie van de resultaten van bacteriologisch onderzoek zijn anamnese en klinisch beeld onontbeerlijk

PENSVLOEISTOFONDERZOEK

Inleiding

Het verteringsproces van herkauwers verschilt aanzienlijk van dat van andere dieren door de microbiële vertering en stofwisseling in de pens. Dat komt bijvoorbeeld doordat het amylase dat in de pancreas wordt gesynthetiseerd, alleen de alfa-glycosidische bindingen van zetmeel kan afbreken en niet de beta-glycosidische bindingen die veel veel in cellulose aanwezig zijn. Cellulolytische bacterien in de pens kunnen deze beta-glycosidische verbindingen wel verbreken en daardoor komen de glucose monomeren beschikbaar voor de bacteriën en protozoën in de pens.

In het anaerobe milieu van de pens kunnen de bacteriën en protozoën glucose uitsluitend d.m.v. fermentatie afbreken. Naast de gassen CO_2, H_2 en CH_4, zijn de vluchtige vetzuren acetaat, propionaat en butyraat de belangrijkste eindprodukten van de pensfermentatie. Deze kort keten vetzuren bevatten nog veel energie en kunnen via de penswand opgenomen worden in het bloed van de herkauwer. Deze vluchtige vetzuren vormen de voornaamste energiebron voor de herkauwer.

In de uitgebalanceerde microbiologische biotoop van de pens kunnen ongewone verstoringen ontstaan die bij monogastrische dieren uiteraard niet optreden. Zo kunnen bij abrupte veranderingen in dieet bepaalde fermentatieprodukten sneller gevormd worden dan verwijderd, waardoor aandoeningen kunnen ontstaan door verstoring van het evenwicht in deze zeer specifieke biotoop.

Het onderzoek van pensinhoud wordt slechts dan gedaan wanneer er vanuit de anamnese bij meerdere koeien in een koppel storingen in de pensfermentatie verwacht worden.

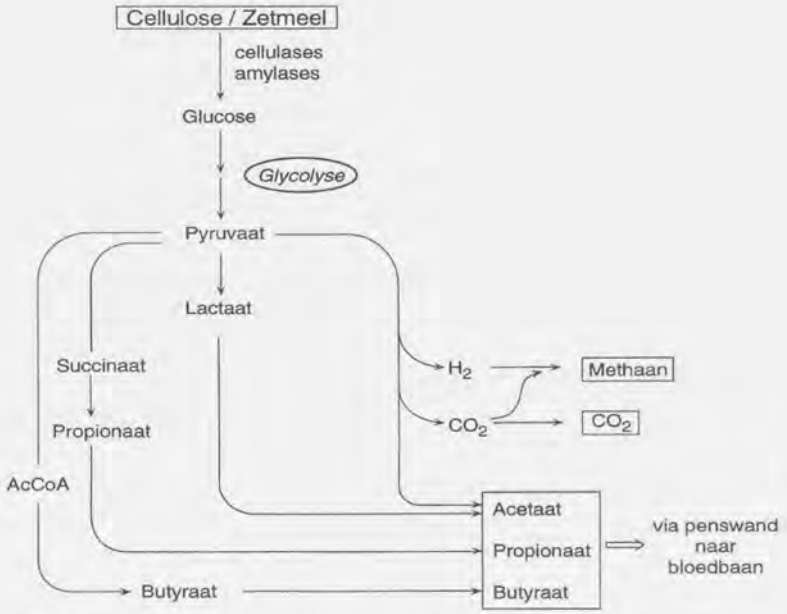


Fig 1a *Begin en eindproducten van de fermentatie van koolhydraten*

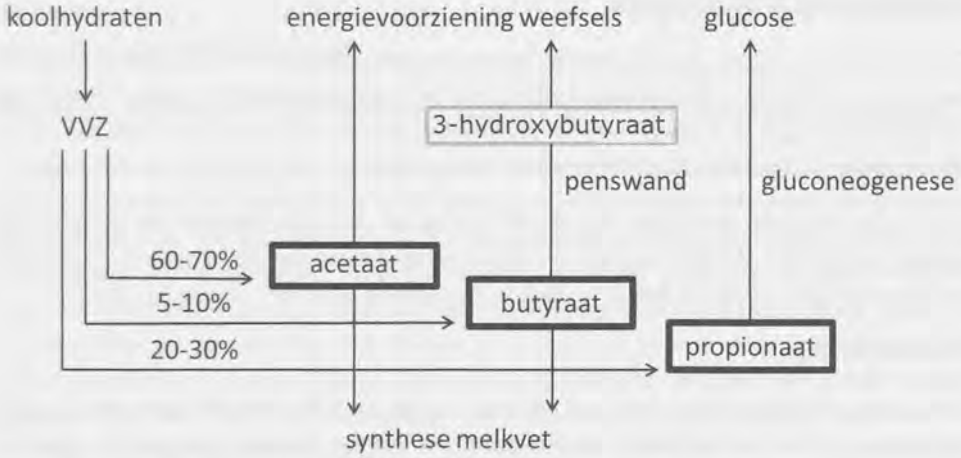


Fig 1b *Het gebruik van vluchtige vetzuren door de herkauwer.*

Monstername

Voor het pensvloeistofonderzoek moet m.b.v. een slokdarmsonde een monster van de pensinhoud genomen worden. Laat de eerste 100-200 ml pensvloeistof weglopen; de pH hiervan is te hoog door verontreiniging met speeksel en slijm uit de oesophagus. Het monster moet meteen worden beoordeeld. Om het monster langere tijd goed te houden is het belangrijk om het direct bij 40°C te plaatsten. Het liefst in een atmosfeer van 100% CO_2.
Ook is het mogelijk om een monster te nemen d.m.v. een penspunctie. Ventro-lateraal kan met een naald wat vloeistof worden afgenomen. Er is wel een klein risico op het ontstaan van een peritonitis en het volume van dit monster is beperkt ten opzichte van monstername met een slokdarmsonde. Toch kan van dit monster prima de pH worden bepaald en de hoeveelheid en beweeglijkheid van de pensprotozoën worden bekeken.

pH

De pH van de pensvloeistof kan bepaald worden met eenvoudig pH papier. Meting met een pH-meter is ook mogelijk. Plaats dan direct na de monstername in een klein pensvloeistof-monster de electrode van een geijkte pH meter en lees de pH af; denk aan de temperatuur-instelling van de pH meter. De normale zuurgraad van pensvloeistof varieert van pH 5,5-6,8.

Bij een koolhydraatrijke voeding kan de pH dalen tot 5,5. Wanneer de pH lager is dan 5,5, is er sprake van pensacidose. Bij subacute pensacidose daalt de pH periodiek onder de 5,5. Ook kan de pH op verschillende plekken in de pens verschillen. Bij verdenking van subacute pensacidose in de koppel kan van 12 dieren een pensmonster worden genomen. Voor een bevestiging van de diagnose moeten 3 van de monsters een pH waarde lager dan 5,5 hebben.

Bij speekselbijmenging, ondervoeding, ammoniak intoxicatie en rijke eiwitvoedering vindt men te hoge pH-waarden.

Microscopisch onderzoek

Om een indruk te krijgen van de soorten rijkdom en beweeglijkheid van de pensfauna kan de pensvloeistof onder een microscoop worden bekeken. Een preparaat is te maken door m.b.v. een pasteurse pipet 'n monster van het sediment te nemen en hiervan een druppel op een objectglaasje te pipeteren. Dek dit af met een dekglaasje.

Onder een vergroting van 10x40 kunnen het aantal en de beweeglijkheid van de protozoën worden beoordeeld. Meerdere actieve prozotoën moeten zichtbaar zijn. Wanneer er sprake is van pensverzuring zullen er niet of nauwelijks bewegende protozoën aanwezig zijn.

Gas-vorming

Niet zozeer voor diagnostiek, maar wel om inzicht te krijgen in de mate van gasvorming tijdens fermentatie, kunnen verschillende vergistingsproeven worden gedaan. Hier worden zowel de sedimentatie en flotatie beschreven als de glucose-vergisting.

Sedimentatie en flotatie

De gassen die tijdens de fermentatie ontstaan, zullen voor een deel in de pensvloeistof oplossen. Maar zodra de vloeistof verzadigd is met opgelost gas, zal de rest als vrij gas uit de vloeistof ontsnappen. De gasmoleculen hechten zich aan de aanwezige voedseldeeltjes, zoals stukjes gras. Dit heeft tot gevolg dat deze voedseldeeltjes een relatief laag soortelijk gewicht krijgen en dus vanuit de vloeistof boven komen drijven. Dit verschijnsel noemen we flotatie. Het gas wordt vervolgens afgegeven aan de omgeving.

Breng hiervoor 50 ml van het monster, na zéér goed mengen, over in een 100 ml maatcylinder. Sluit de cylinder af met een wattenprop en plaats de cylinder in een broedstoof van 40°C. Bepaal de tijd die nodig is voor duidelijke sedimentatie en flotatie. Er moet na ca. 30 min een duidelijke scheiding te zien zijn; is dit niet het geval dan is de pensflora en fauna in slechte conditie; meestal zijn de protozoën dood.

Resultaat bij een goede conditie van de pensflora en -fauna:

wit sediment:	protozoën
tussenlaag:	pensvloeistof met bacteriën
bovendrijvende massa:	gestructureerd voedsel met aangehechte bacteriën.

Glucose-vergisting:

In een saccharometer volgens Einhorn (zie fig 2) kan de afbraak van glucose o.i.v. de pensvloeifstof gevolgd worden door de in een bepaalde tijd ontstane hoeveelheid gas te meten. Breng hiervoor 0,5 ml van een 0,9M glucose-oplossing in een saccharometer (0.9M = 16 gram glucose opgelost in 100ml water). De rest wordt vervolgens aangevuld met pensvloeistof met zo weinig mogelijk voedselpartikels (vanuit de heldere tussenlaag na sedimentatie en flotatie). Zorg er voor dat zich in het afgesloten been van de saccharometer geen luchtbelletjes bevinden.

Fig 2 saccharometer volgens Einhorn

Na incubatie van 30, 60 en 90 minuten in een broedstoof van 40°C, kan de vrijgekomen hoeveelheid gas worden afgelezen.

Bepaling van vluchtige vetzuren (totale hoeveelheid en de verdeling)

De belangrijkste vluchtige vetzuren in de pens zijn azijnzuur, propionzuur en boterzuur. De totale hoeveelheid van deze zuren in de pens en hun onderlinge verhouding wordt gebruikt als maatstaf voor de activiteit van de microörganismen en dus voor de kwaliteit van de pensvloeistof en/of het voer. Voor de bepaling van het totaal aan vluchtige vetzuren wordt de pensvloeistof eerst aangezuurd om de vetzuren in de ongedissocieerde vorm om te zetten. (In de zoutvorm zijn ze immers niet vluchtig.) Pensvloeistof kan na aanzuren gaschromatografisch worden geanalyseerd, waarbij vluchtige vetzuren van elkaar worden gescheiden en voor elk van die vetzuren de procentuele bijdrage aan het totaal van de vluchtige vetzuren wordt vastgesteld.

BIJLAGE: MICROSCOOPGEBRUIK

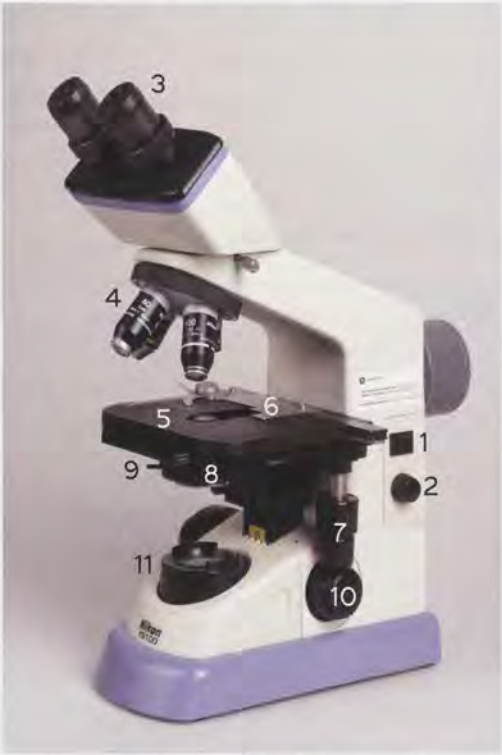
Inleiding

De microscoop wordt in de diergeneeskundige praktijk veel gebruikt om informatie te verkrijgen van biologische objecten en/of structuren die te klein zijn om met het blote oog te zien. Denk aan het bekijken van cellen in bioptweefsel, het beoordelen van de cellen in het bloed, het bekijken van bacteriën in genomen monsters, wormeieren in feces, parasieten in huidafkrabsels, enz.

De kwaliteit van de verkregen informatie hangt allereerst sterk af van de kwaliteit van de genomen monsters en van de methode om het monster te verwerken tot een preparaat (kleuring e.d.). Daarnaast is ook de beeldkwaliteit van belang, welke voor een groot gedeelte bepaald wordt door de instellingen van de microscoop.

De optimale instellingen voor een goede beeldkwaliteit zijn afhankelijk van het preparaattype en welke structuren er zichtbaar gemaakt moeten worden. Er is dus geen richtlijn voor één juiste instelling. Daarom zullen in deze bijlage een aantal belangrijke principes van de standaard lichtmicroscopie beschreven worden en tevens zullen er praktische aanwijzingen gegeven worden. Hiermee kan de gebruiker van de microscoop makkelijker de juiste instelling vinden; hoewel oefenen het belangrijkste blijft.

Onderdelen en werking van de microscoop



1. Lampschakelaar
2. Lichtintensiteitsregelaar
3. Oculair
4. Revolver met objectieven
5. Objecttafel
6. Kruistafel met preparaathouder
7. Stelschroef kruistafel
8. Condensor met eronder het diafragma
9. Diafragmaregelaar
10. Microschroef/fijnregelaar
11. Lamp en vaste condensor

Fig. 1 *Zijaanzicht van de Nikon binoculair YS100*

1 Hefboom condensor,

2 Macroschroef/grofregelaar

3 Microschroef/fijnregelaar,

Fig. 2 *Zijaanzicht van de Nikon binoculair YS100*

Lenzen

De moderne microscopen zijn samengestelde microscopen. Dit betekent dat de vergroting van een specifieke structuur wordt verkregen door de gecombineerde werking van de objectieflens (fig 1 nr 4) en de oculairlens (fig. 1 nr. 3). De sterkte van het oculair ligt vaak rond de 10x vergroting (dit varieert tussen de 8-12 x). Daarnaast bevat een microscoop vaak meerdere objectieven met verschillende vergrotingen die in een draaibare revolver zijn geplaatst. De vergroting van de objectieven varieert gewoonlijk tussen de 4x en 100X. Hierdoor kan bij een oculair met 10x vergroting, een totale vergroting bereikt worden van 40-1000x. De kwaliteit van de verschillende lenzen die deel uitmaken van de microscoop zijn bepalend voor de uiteindelijke kwaliteit van het verkregen beeld. Moderne objectieven voor lichtmicroscopie zijn opgebouwd uit meerdere aparte lenzen (soms wel 6), die ieder corrigeren voor afwijkingen die kunnen optreden als gevolg van de stralengang door de lens.

Numerieke apertuur

De kwaliteit van een lens wordt voornamelijk bepaald door de numerieke apertuur (N.A.). Deze fysische parameter geeft aan onder welke uiterste hoeken licht opgevangen wordt (zie figuur 3). Hierbij maakt het uit hoe dik het dekglaasje bovenop de waar te nemen structuren is. Ook maakt het verschil of er tussen het preparaat en het objectief enkel lucht bevindt, of dat het licht ook gebroken wordt door eventuele olie op de lens. De numerieke apertuur staat meestal gegraveerd in de metalen behuizing van het objectief voor de betreffende lens (zie figuur 4) en varieert tussen de 0,25 en 1,4. Hoe hoger de numerieke

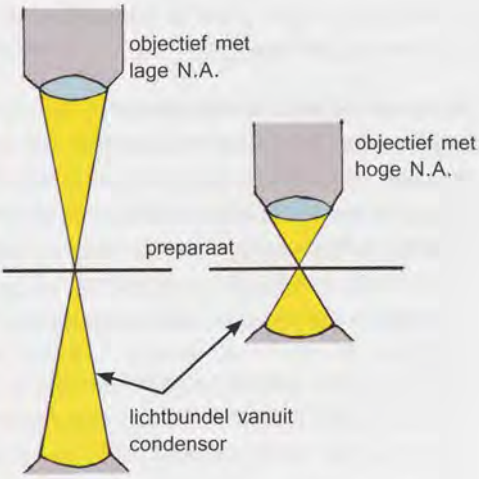


Fig. 3 *Objectieven en N.A. waarden*

apertuur, hoe beter de resolutie (oplossend vermogen). Hoge N.A. waarden betekenen ook kleinere scherptedieptes. Dit wil zeggen dat de zone in het preparaat waarbij alles in focus is kleiner is bij een hoge N.A. Objectieven met een N.A. van 1 of hoger kunnen alleen met immersie-olie worden gebruikt.

Eigenschappen van het objectief

Vergroting: Geeft aan hoeveel keer het beeld door het objectief wordt vergroot.

Werkafstand: De afstand tussen objectief en preparaat. Als regel geldt: hoe hoger de vergroting hoe kleiner de werkafstand. Wanneer de werkafstand kleiner is dan de dikte van het preparaat kan er geen scherp beeld worden gevormd. Dit kan het gebeuren bij dikke preparaten die met een hoge vergroting worden bekeken.

Dekglasdikte: Aangezien hoek van lichtinval en uitstraling afhankelijk is van de dikte van het materiaal, wordt de N.A. gecorrigeerd voor de dikte van de dekglaasjes. De standaardmaat van dekglaasjes is 0,17 mm. Bij een grotere werkafstand is deze dikte te verwaarlozen.

Fig. 4 *Afbeelding van een 100X objectief met een numerieke apertuur van 1.25, gecorrigeerd voor een dekglasdikte van 0,17mm (dit is de standaard dekglasdikte) en een werkafstand (WD) van 0,14mm.*

Licht en lichtinval

Belangrijk voor de optimale werking van de microscoop is dat de lichtinval zo helder en egaal mogelijk is en niet het beeld verstoort. Bij de meeste microscopen wordt gebruik gemaakt van een halogeen of led lampje welke aangesloten kan worden op 220 Volt. Met de condensor en het diafragma kan het kleurcontrast worden geregeld. Met de lichtintensiteitsregelaar van de lamp (fig. 1 nr. 2) kan de hoeveelheid licht worden geregeld. Voor een goed beeld is de hoeveelheid licht belangrijk.

Condensor betekent letterlijk verdichter en wordt gebruikt om het licht zo efficiënt en gelijkmatig mogelijk over het te object te verdelen. De condensor concentreert het licht vanaf de lichtbron en straalt deze zo evenwijdig mogelijk naar boven. Vaak is de condensor samengesteld en bestaat uit een vaste lens vlak boven de lamp (fig. 1 nr. 11) en een beweegbare condensor vlak onder het preparaat (fig. 1 nr. 8). Hoe dichter deze condensor zich bij het preparaat bevindt, hoe meer de lichtstralen zijn gebundeld en gelijkmatiger over het object worden verdeeld. Een blauwfilter onder de condensor corrigeert voor de oranje kleur van het lamplicht.

Tussen de twee condensorlenzen bevindt zich het diafragma. Hiermee kan de hoeveelheid licht die op het preparaat valt, worden bepaald. Bij preparaten waarbij er weinig contrast is (zoals bij ongekleurde urinesediment- en fecespreparaten) is het belangrijk om zoveel mogelijk contrast op te roepen. Dit kan worden bereikt door het diafragma te sluiten en de condensor

naar beneden te zetten (en de hefboom omhoog (zie fig. 2 nr. 1)). Ter compensatie kan de dimschakelaar van het licht dan helemaal open worden gedraaid.

Scherpte

Voor de scherpstelling zijn er twee knoppen beschikbaar om de werkafstand in te stellen. De macroschroef/grofregelaar (fig. 2 nr. 2), die een bereik van centimeters heeft, en de microschroef/fijnregelaar (fig. 1 nr 10 en fig. 2 nr 3), die een bereik van 1 à 2 millimeter heeft. De werkafstand is bij sterke vergroting zo klein dat men gemakkelijk de lens door het preparaat heen kan draaien. Let op! Bij grote vergrotingen dient men dus alleen met de microschroef scherp te stellen nadat er met de macroschroef een scherp beeld is verkregen bij een kleinere vergroting (bijv. 10x10).

Bij het bekijken van een preparaat door een 100x-objectieflens moet immersieolie gebruikt worden, zodat er geen lucht-glas lichtbrekingsovergangen zijn. Andere objectieflenzen mogen niet met de olie in contact komen, dus moet na gebruik van het 100x-objectieflens deze lens en het preparaat eerst goed schoon gemaakt worden met speciaal daarvoor bestemde lensdoekjes. Wanneer er gezocht moet worden in het preparaat, is het belangrijk om van het 100x-objectief terug te draaien via het 4x objectief i.p.v. het 40x-objectief om verontreiniging van het 40x-objectief met olie te voorkomen.

Bedenk dat 40 en 100x objectieven een geringe scherptediepte hebben zodat men praktisch maar in één vlak scherp waarneemt. Kernen die op verschillende hoogte liggen zijn dan niet of lastig te zien. Met de microschroef kan men gemakkelijk op de verschillende hoogte scherpstellen.

Bij een binoculair microscoop is de afstand tussen de beide oculairen instelbaar. Ook kun je na scherpstelling van het preparaat op het rechteroog indien nodig de scherpte voor het linkeroog bijregelen met de draairing op het linker-oculair en andersom.

Histologische diagnostiek en kleuringen

Histologische diagnostiek wordt toegepast om weefselbiopten te beoordelen op de aanwezigheid van pathologische processen. In de praktijk zal een dierenarts een biopt nemen en dit ter beoordeling door een patholoog naar een gespecialiseerd laboratorium sturen. Een eerstelijns practicus zal zelden zelf een histologische opwerking van deze biopten uitvoeren, aangezien dit de aanwezigheid van een gespecialiseerde (dure) laboratoriumuitrusting vereist. De meeste weefsels zijn na uitname uit een dier namelijk te groot voor microscopisch onderzoek en dienen bewerkt te worden. Veelal wordt het uitgenomen weefsel in kleinere fragmenten verdeeld en vervolgens tegen bederf beschermd door chemische fixatie. Veelgebruikte fixatieven zijn (para) formaldehyde, glutaaraldehyde, picrinezuur en mengsels van deze fixatieven. Na inbedding in een stevige matrix van bijv. paraffine kunnen de weefselfragmenten in dunne plakjes (5-10μm) worden gesneden m.b.v. een microtoom en op een microscoopglaasje worden opgevangen. In geval van weefsels die chemische fixatie niet goed verdragen is het mogelijk om van bevroren

specimen dunne plakjes te snijden en deze vervolgens op glaasjes te bewaren in een vriezer. Na ontdooien en korte fixatie in bijv. methanol kunnen deze worden gebruikt.

Zonder kleurstof zijn structuren in histologische preparaten vaak niet waarneembaar. In veel microscopische preparaten zijn specifieke structuren dus ook zichtbaar gemaakt m.b.v. histochemische kleuringen. Veel kleurstoffen reageren met structuren in het preparaat vaak via elektrostatische interacties. Het gevolg is dat die stoffen een neerslag vormen dat zichtbaar wordt als het overmaat aan kleurstof is weggewassen.

Een aantal kleurstoffen kan grofweg ingedeeld worden in acidofiele en basofiele kleurstoffen (ouderwetse naamgeving) omdat ze reageren met structuren die respectievelijk zuur (bv DNA in kern) of basisch (bijv. eiwitten) zijn. Veel chemische kleurstoffen reageren in oplossing zuur of basisch en binden zich aan weefselelementen via elektrostatische affiniteit. Cytoplasma kan zowel voor zure als basische kleurstoffen een affiniteit hebben (afhankelijk van de eiwitsamenstelling). De kern, met nucleïnezuren, heeft een affiniteit voor basische kleurstoffen. Wanneer kleurstoffen op deze wijze reageren, spreekt men van een aspecifiek chemisch proces, waarvan het exacte mechanisme meestal onbekend is. Ook bepaalde fixatieven (bijv. picrinezuur) kunnen op deze manier als kleurstof reageren.

Kleurvloeistoffen bevatten meestal combinaties van verschillende kleurstoffen. Proefondervindelijk (empirisch) heeft men vastgesteld welke combinaties contrastverhogend werken. Bij gebruik van meerdere kleurstoffen worden vaak bepaalde weefselcomponenten, die aanvankelijk gekleurd waren, weer ontkleurd, waardoor ze weer kleurbaar worden voor een andere kleurstof.

Weefsels kunnen ook worden onderzocht door gebruik te maken van specifieke antilichamen, die opgewekt zijn (vaak in konijn of muis) tegen bepaalde weefselcomponenten, de zgn. immunohistochemie. Na binding van deze antilichamen aan hun epitoop in het weefsel kan deze binding zichtbaar gemaakt worden door deze antilichamen te labellen. Deze gelabelde antilichaamcomplexen kunnen vervolgens in het weefsel zichtbaar worden gemaakt m.b.v. een simpele enzymreactie.

Na kleuring worden de preparaten ontdaan van water, bedekt met een insluitmedium en vervolgens met een dekglaasje ingesloten. Na droging zijn deze preparaten permanent bewaarbaar en klaar voor microscopische inspectie.

Gebruik van de microscoop (Nikon binoculair YS100)

1. Zorg voor een juiste zithoogte: ogen bij de oculairen, rug recht.

2. Controleer of de objectafel naar beneden is gedraaid en het laagste objectief voor staat.

3. Zet het licht van de microscoop aan en stel met de dimschakelaar het licht in.

Het niveau van het licht moet zo zijn dat het nog wel rustig kijkt. De levensduur van de lamp zal aanzienlijk worden verkort wanneer deze voortdurend op maximale spanning brandt.

4. Standaardinstelling diafragma en condensor: blauwfilter onder de condensorlens, condensorlens helemaal omhoog en het diafragma helemaal open.

5. Klem een preparaat in de preparaathouder op de kruistafel. Controleer of het dekglas boven ligt.

6. Draai het 4x of 10x objectief voor en zoek de structuur door kruistafelschroef te draaien en stel scherp met de macro- en micro(focusseer)knop.

7. Stel de oculairen per ook afzonderlijk bij. Kijk tenminste enkele seconden naar het beeld door beide oculairen, doe vervolgens het rechteroog dicht, kijk alleen met het linkeroog en stel met de draairing van het linkeroculair het beeld scherp; doe daarna hetzelfde voor het rechteroculair.

8. De oculairafstand moet zodanig aangepast worden dat bij gebruik van beide ogen één beeld ontstaat waarin de aanwijsnaald waargenomen kan worden. Neem hier de tijd voor.

Het is even oefenen om met twee ogen door beide oculairen tegelijkertijd te kijken, maar uiteindelijk werkt het gemakkelijker en meer ontspannen. Hierdoor is het microscoperen tijdens lange practica minder vermoeiend

9. Draai de objecttafel m.b.v. de macroschroef rustig omhoog terwijl er door het oculair gekeken wordt. Wanneer er een beeld ontstaat, kan verder scherp gesteld worden door aan de microschroef te draaien.

10. Pas het condensordiafragma aan de vergroting aan, door de diafragmaregelaar te verschuiven naar de waarde die overeenkomt met de gebruikte vergroting.

11. Om bepaalde structuren in een hogere vergroting te bekijken, moeten de objectieven altijd in de volgorde 4x → 10x → 40x → 1 druppel immersie-olie aanbrengen op het dekglas van het preparaat → 100x worden voorgedraaid.

12. Stel de 40x en 100x vergroting uitsluitend scherp met de micro(focusseer)knop.

Indien er geen scherp beeld binnen twee of drie slagen verkregen wordt, moet niet verder worden gedraaid. Als een te dik afdekglas is gebruikt, kan er niet met het 100x objectief scherp worden gesteld en is 10x40 de hoogst te gebruiken vergroting.
Indien het preparaat erg doorzichtig is, kan makkelijker de juiste hoogte gevonden worden door scherp te stellen op de rand van het dekglaasje.

13. Voor het zoeken naar andere structuren kan weer worden teruggedraaid naar lagere vergrotingen.

Let op! *Als er immersie-olie op het preparaat is aangebracht, niet het 40x objectief voordraaien om verontreiniging van dit objectief met olie te voorkomen. Dus bij zoeken: schakelen tussen 100x en 10x via het 4x objectief. Wanneer het 40x objectief toch met olie in aanraking komt, moet dit met lenspapier worden gereinigd.*

14. Bij grotere vergrotingen is meer licht nodig dan bij lagere vergrotingen. Indien nodig dus aanpassen d.m.v. lichtintensiteitsregelaar en het diafragma.

Na gebruik

Berg na gebruik de microscoop weer op. Hieronder staan een aantal punten, die doorlopen moeten worden.

1. Zet de lampschakelaar uit.
2. Reinig het 100x objectief met lenspapier.
3. Draai het 4x objectief voor.
4. Plaats het blauwfilter onder de condensor, draai de condensorlens helemaal omhoog en zet het diafragma open.
5. Berg de microscoop op onder een microscoophoes.
6. Ruim de preparaten op (eventueel schoonmaken met een tissue)

Bij de Nikon binoculair YS100 is de schroef om de oculairen naar voren en naar achteren te draaien erg kort. Hierdoor kunnen de oculairen makkelijk losraken bij het draaien. Daarom is het beter om bij deze microscopen de oculairen voor het opbergen niet naar achteren te draaien, maar naar voren te laten staan.

Veel voorkomende problemen en bijbehorende oplossingen

Als het beeld niet scherp wordt, controleer dan:

- Ligt het preparaat omgekeerd op de kruistafel?
- Is het preparaat te dun of te dik?
- Zijn de lenzen vies?
- Is het diafragma niet goed ingesteld (te veel of te weinig lichtinval)?
  Dit is afhankelijk van de dikte en de contrasten van een preparaat dat men bekijkt, maar ook van de vergroting die men gebruikt. Zorg ervoor dat tijdens het gebruik van de microscoop de diafragma-opening wordt aangepast aan gewenste lichtsterkte.
- Is de condensor niet goed ingesteld (te veel of te weinig lichtinval onder de verkeerde hoek)?

Preparaten met een zwak kleurcontrast
(ongekleurde bloeduitstijkjes, urinesediment, huidafkrabsels, wormeieren e.d.)

Bij preparaten met zwak kleurcontrast is het de moeite waard om te spelen met de condensorhoogte en het diafragma te sluiten. De dimschakelaar van de lamp moet dan worden opengedraaid om tenminste nog iets te kunnen zien.

Let op! Als vergeten wordt deze instelling terug te zetten en er wordt naar een contrastrijk preparaat gekeken dan zullen lijnen en celcontouren verdubbelen en zal de aanblik onaangenaam voor de ogen zijn (een soort schittering).

Opmeten van lengte van preparaat

Met behulp van het in het oculair aanwezig aanwijsnaaldje kan een inschatting worden gemaakt van de grootte van structuren in het preparaat. Let hierbij wel op dat voor iedere vergroting de relatieve lengte en dikte van de aanwijsnaald verandert (zie onderstaande tabel). Het is raadzaam ook het preparaat met het blote oog te bestuderen voor het in de preparaathouder wordt geplaatst. Er kan dan beter worden georiënteerd binnen het preparaat en het inzicht in de dimensies van de structuren in het preparaat wordt groter.

Objectief	Lengte aanwijsnaald (µm)	Dikte aanwijsnaald (µm)
4 x	2250	50
10 x	900	20
40 x	225	5 (diameter rode bloedcel)
100 x	90	2

Tabel 1 *relatieve afmetingen van aanwijsnaald bij diverse vergrotingen.*

Aanvullingen per preparaattype

Sediment van de urine

In de ongekleurde preparaten van het urinesediment is weinig contrast. Het is dan van belang om het diafragma zoveel mogelijk dicht te doen en de condensor naar boven te zetten. Het sediment wordt beoordeeld aan de hand van 10 gezichtsvelden bij een vergroting van 10x10 (LPF = Low Power Field) en 10 gezichtsvelden bij een vergroting van 10x40 (HPF = High Power Field). Het is dus NIET nodig de 100x immersie-lens te gebruiken.

Hematologisch onderzoek

Voor een goed beeld moet een gekleurd bloeduitstrijkje bekeken worden met de condensor omhoog en het diafragma helemaal open. Een gekleurd bloeduitstrijkje, voor het beoordelen van het witte en rode bloedbeeld, wordt eerst bekeken bij een vergroting van 10x10 om de juiste plek in het preparaat te zoeken (zie onderdeel hematologisch bloedonderzoek). Vervolgens worden de bloedcellen gedetermineerd met behulp van de 100x immersie-lens.

Wormen/protozoën bekijken in fecespreparaat

Bij het zoeken naar wormeieren, oöcysten of cysten is het van belang om het diafragma bijna dicht te zetten om meer contrasten waar te kunnen nemen. De condensor kan in de hoogste stand gezet worden.

NB: voor het *zoeken* naar wormeieren of (oö)cysten (met uitzondering van *Cryptosporidium*) zonder specifieke determinatie, is het NIET noodzakelijk en ook ongewenst om de 100x immersie-lens te gebruiken. Vrijwel alle wormeieren zijn goed te vinden bij een vergroting van 10x10. Alleen voor sommige (oö)cysten is het noodzakelijk te zoeken bij 10x40.

Ectoparasieten

Ectoparasieten worden meestal niet gezocht in een microscopisch preparaat, maar in oppervlakkig genomen haar- of huidafkrabsels onder een prepareermicroscoop (bij lagere vergrotingen van 4x tot ong. 10x). Alleen van diepe huidafkrabsels worden direct microscopische preparaten gemaakt.

Indien in een oppervlakkig genomen haar- of huidafkrabsel een ectoparasiet wordt aangetroffen m.b.v. een prepareermicroscoop, kan deze op een voorwerpglaasje worden gelegd om, indien nodig, verder microscopisch te kunnen worden gedetermineerd
Hiervoor kan het handig zijn om de geleedpotige in een druppeltje naaimachineolie op een voorwerpglaasje aan te brengen. Dit maakt het mogelijk om meer details te zien voor de determinatie.

Het microscoperen gaat vervolgens hetzelfde als bij het onderzoek op wormeieren of (oö)cysten (zie boven). Het is dus NIET noodzakelijk, noch gewenst, om de 100x immersie-lens te gebruiken. Objectieven 4x en 10x zijn ruimschoots voldoende.

Bacteriën bekijken na kleuring volgens bijv. Gram of Ziehl Neelsen.

Indien van bijvoorbeeld een oormonster (swab) een preparaat wordt gemaakt is het van belang om het preparaat te kleuren om de eventueel aanwezig bacteriën in dit preparaat goed te kunnen beoordelen. Na kleuring heeft het preparaat veel contrast waardoor het voor het microscopisch bekijken hiervan van belang is de condensor in de hoogste stand en het diafragma open te zetten. Begin met scherpstellen bij lage vergroting en werk zo door tot grootste vergroting.

Om bacteriën goed te kunnen beoordelen moet de 100x immersie-lens gebruikt worden. Voordat het 100x objectief wordt gebruikt dient een druppel immersie-olie op het preparaat te worden aangebracht. Let hierbij op dat na gebruik van de 100x immersie-lens teruggedraaid moet worden via het 10x objectief en niet via de 40x objectief.

Histologische preparaten

Histologische preparaten zijn altijd gekleurd en daarom contrastrijk. De condensor moet dan in de hoogste stand en het diafragma helemaal open. Voor een overzicht van het preparaat wordt dit eerst bekeken bij een 4x10 en/of 10x10 vergroting. Wanneer een structuur beter beoordeeld moet worden, kan stapsgewijs de 40X en 100x objectieflens worden voorgedraaid. Ook hierbij geldt dat voordat het 100x objectief wordt gebruikt een druppel immersie-olie op het preparaat moet worden aangebracht. Na gebruik van de 100x immersie-lens moet hierna teruggedraaid worden via het 10x objectief en niet via de 40x objectief.

Universiteit Utrecht

Faculteit Diergeneeskunde

ISBN 978-90-393-6776-6