



4 Parasitologische diagnostiek bij kat, hond en paard

ESCCAP
Malvern Hills Science Park, Geraldine Road, Malvern,
Worcestershire, WR14 3SZ, United Kingdom

Eerste druk uitgegeven door ESCCAP 2022

© ESCCAP 2022–2024

Alle rechten voorbehouden

Deze uitgave is beschikbaar onder de voorwaarde dat eventuele verspreiding of reproductie van een deel of de gehele inhoud, in welke vorm, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of op andere wijze alleen is toegestaan met voorafgaande schriftelijke toestemming van ESCCAP.

Deze uitgave mag alleen in de originele omslag worden verspreid tenzij voorafgaande schriftelijke toestemming van ESCCAP is verkregen.

Een catalogusregistratie van deze publicatie is verkrijgbaar bij The British Library.

ISBN: 978-1-913757-53-3

INHOUDSOPGAVE

INLEIDING	6
Monstername, verzending en opslag van diagnostisch materiaal	7
Standaarduitrusting van een parasitologisch laboratorium	8
Media en oplossingen	10
1. FECESONDERZOEK	10
1.1. Algemene informatie	10
1.2. Ontlastingonderzoek methoden	12
1.2.1. Sedimentatie in water	12
1.2.2. Centrifugatieflotatie	13
1.2.3. Gecombineerde sedimentatie-flotatiemethode	14
1.2.4. Aangepaste McMaster-techniek voor eitelling	15
1.2.5. Mini-FLOTAC	16
1.2.6. Dubbele centrifugatietechniek voor de detectie van <i>Anoplocephala</i> -eitjes in paardenfeces	17
1.2.7. SAFC-techniek	18
1.2.8. Telemann-Rivas-methode	19
1.2.9. Baermann-techniek	19
1.2.10. Fecale larvencultuur	20
1.2.11. Fecale uitstrijkjes, kleuring	20
1.2.12. Plakbandmethode	21
1.2.13. Commerciële onderzoekskits voor fecesanalyse/InPouch™ TF feline-/copro-antigeentesten	21

4 Parasitologische diagnostiek bij kat, hond en paard

2. SEROLOGIE	23
2.1. Algemene informatie	23
2.2. Kwantitatieve methoden voor antilichaamdetectie	26
2.2.1. Indirecte immunofluorescentie antilichaamtest (IFAT)	26
2.2.2. Enzyme-linked immune sorbent assay (ELISA)	26
2.3. Kwalitatieve methoden	27
2.3.1. Sneltesten	27
3. HUIDONDERZOEK	27
3.1. Algemene informatie	27
3.2. Gebruik vlooienkam	27
3.3. Huidafkrabsels	28
3.4. Plakbandmethode	29
3.5. Trichogram	29
3.6. Detectie van mijten in oorsmeer	30
3.7. Biomoleculaire technieken	30

4. DIVERSEN	30
4.1. Bloeduitstrijkjes	30
4.1.1. Algemene informatie	30
4.1.2. Pathogenen waarneembaar in bloeduitstrijkjes	31
4.2. Buffycoat methode	32
4.3. Dunne naald aspiratie biopt	32
4.3.1. Algemene informatie	32
4.3.2. Pathogenen waarneembaar in dunne-naald biopten	33
4.4. Detectie en identificatie van microfilariae	33
4.4.1. Algemene informatie	33
4.4.2. Knott test	34
4.4.3. Aangepaste Knott test	34
4.4.4. Filtratiemethode (Difil-Test®)	34
4.4.5. Zure fosfatase kleuring	35
4.4.6. Metingen microfilariae	35
4.5. Biomoleculaire detectie- en differentiatiemethoden: polymerasekettingreactie (PCR)	36
4.5.1. Algemene informatie	36
4.5.2. Specifieke informatie	37
4.6. Detectie van dermatofyten	40
4.6.1. Algemene informatie	40
4.6.2. Direct haaronderzoek	40
4.6.3. Onderzoek met Woodse lamp	40
4.6.4. Schimmelkweek	40

BIJLAGEN

BIJLAGE 1 – ACHTERGROND	41
BIJLAGE 2 – VERKLARENDE WOORDENLIJST, AFKORTINGEN EN NUTTIGE LINKS	42

INLEIDING

Een correcte diagnose van infectie en/of ziekte is vereist voor een juiste behandeling en doeltreffende bestrijding. De diagnostiek van parasitaire ziekten vormt daarop geen uitzondering. Een voorlopige diagnose op basis van klinische verschijnselen, bloedonderzoek of (histo)pathologie kan nuttig zijn bij de keuze van specifieke diagnostiek of het (in)direct aantonen van parasieten (of een combinatie van beide).

De ontwikkeling van standaardprocedures en goede laboratoriumtechnieken is van fundamenteel belang in de praktijk. Bij de diagnostiek van infecties bij gezelschapsdieren met klinische symptomen die wijzen op parasitaire ziekten of bij het screenen op infecties als onderdeel van een preventie- en bestrijdingsprogramma, is er behoefte aan nauwkeurige en betrouwbare methoden.

Directe detectie

Parasitologische laboratoriummethoden betreffen vaak het direct morfologisch aantonen van parasieten of de directe detectie van parasitaire moleculen, zoals antigenen of DNA.

Direct aantonen van parasieten is mogelijk door:

- morfologische identificatie (macroscopisch, microscopisch, direct of na concentratie, na kleuring, na markering met specifieke antilichamen of na schimmelkweek);
- immuundiagnostische detectie van parasietenantigenen;
- biomoleculaire detectie van parasitair DNA;
- detectie van macromoleculen van parasieten door middel van massaspectrometrie; en
- in-vitrokweek voor vermenigvuldiging of ontwikkeling van parasitaire stadia.

De beperkende factoren omvatten:

- onregelmatige verspreiding en uitscheiding van parasieten;
- onjuiste monsternamen, opslag en vervoer;
- beperkte beschikbaarheid van genetische/proteomische informatie; en
- in sommige gevallen lage sensitiviteit of specificiteit.

Let op: biomoleculaire detectie van DNA of antigenen kan soms leiden tot fout-positieve resultaten, omdat ze enige tijd na infectie aanwezig kunnen blijven.

Indirecte detectie

Voor bepaalde parasitaire infecties is direct aantonen niet altijd mogelijk. Dit kan te wijten zijn aan de locatie in het lichaam, of de parasiet in zeer lage dichtheden aanwezig is en dus niet betrouwbaar aangetoond wordt door directe methoden, of omdat de methode technisch te omslachtig of te invasief is voor de patiënt. In dergelijke gevallen kan indirecte detectie, via immuunreacties op de parasieten, nuttig zijn. Bij indirecte detectiemethoden worden specifieke antilichamen van verschillende substraten aangetoond.

De beperkende factoren omvatten:

- variabele en vertraagde immuunreacties (afhankelijk van het tijdstip na infectie, de intensiteit, de plaats en het type reactie);
- persistentie en kruisreactiviteit van antilichamen; en
- in sommige gevallen lage sensitiviteit of specificiteit.

Antilichamen kunnen gedurende verschillende periodes aanhouden nadat de infectie is verdwenen, zodat hun vermogen om huidige infecties op te sporen beperkt kan zijn.

Deze richtlijn is bedoeld voor gebruik door dierenartsen die in hun praktijk routinematige diagnostiek toepassen voor de opsporing van parasitaire infecties, en voor degenen die regelmatig monsters insturen naar externe laboratoria.

Het is onderverdeeld in hoofdstukken op basis van het materiaal dat wordt getest en de beschikbare methoden. Er is ook algemene informatie over de afname, behandeling en bewaring van monsters.

MONSTERNAME, VERZENDING EN OPSLAG VAN DIAGNOSTISCH MATERIAAL

Algemeen

De nauwkeurigheid van diagnostische testen hangt vooral af van de juiste monstername, opslag en verzending van de testmaterialen. Elk monster moet correct worden geëtiketteerd (o.a. patiënt en eigenaar gegevens plus de datum van de monstername), verzonden in goed afgesloten, onbreekbare verpakking (geëtiketteerd volgens voorschrift voor het vervoer van potentieel besmettelijk materiaal), snel naar het laboratorium worden overgebracht en vergezeld gaan van correct ingevulde formulieren waarmee het laboratoriumpersoneel de aangevraagde test kan uitvoeren. Bloed-/serummonsters moeten met een nachtkoerier worden verzonden in een lekbestendige plastic buis met schroefdop in een koelverpakking. Bij voorkeur in een zak met rits/monsterzak, in geval van breuk, in beschermend materiaal gewikkeld en in een stevige verzenddoos.

Veel laboratoria geven specifieke richtlijnen voor monstername en verzending. Bovendien moeten algemene en bijzondere veiligheidsmaatregelen in acht worden genomen en moeten giftige stoffen of infectieuze materialen op de juiste wijze worden verwijderd.

Monstername en opslag

1. Fecaal materiaal

Fecesmonsters moeten rectaal of onmiddellijk na uitscheiding worden verzameld om vervuiling vanuit de omgeving te voorkomen met vrijlevende nematoden. De analyse moet worden uitgevoerd met verse monsters of na bewaring bij 4°C omdat de eitjes van sommige wormen en coccidiose-oöcysten zich kunnen blijven ontwikkelen en hun diagnostische kenmerken kunnen veranderen. Bij oudere fecesmonsters kunnen longwormlarven in het eerste stadium (L1) onvoldoende levensvatbaar zijn voor migratie bij de Baermann-techniek. De larven van *Strongyloides* spp. en strongyliden kunnen na respectievelijk uren of dagen uit hun eitjes komen en een vals-negatief resultaat geven voor de detectie van eitjes. Om verdere ontwikkeling van nematoden eitjes te voorkomen, moeten de monsters en houders zo weinig mogelijk zuurstof bevatten en goed gesloten zijn.

In de diergeneeskundige parasitologie worden fecesmonsters meestal niet lang bewaard vóór het onderzoek. Voor langdurige opslag kan bewaring nodig zijn, bv. met chemicaliën (zie specifieke literatuur voor media) of door bevriezing bij -20°C. Sommige parasietenstadia, zoals nematodenlarven, strongyliden en andere wormeitjes met een dunne wand, kunnen daardoor minder betrouwbaar worden angetoond in bewaard of eerder bevroren materiaal.

2. Serum

In de meeste gevallen worden serummonsters verkregen uit perifeer bloed gebruikt voor het aantonen en kwantificeren van antigenen of antilichamen. Bij voorkeur moet het bloed vrij in het buisje kunnen stromen om hemolyse te voorkomen. Indien mogelijk wordt minimaal 5 ml bloed afgenomen om 2 ml serum te verkrijgen voor een volledig testpanel. Na coagulatie van ten minste 20 minuten wordt het serum door centrifugatie verkregen en overgebracht in een nieuw buisje en bij voorkeur onmiddellijk verzonden. Indien nodig kan het serum maximaal 24 uur vóór verzending bij 4°C worden bewaard. Langere bewaring moet bij -20°C plaatsvinden. Houd er rekening mee dat centrifugatie vóór volledige coagulatie hemolyse kan veroorzaken die de test kan verstoren; het bloed te lang bewaren, kan ook leiden tot microbiële groei en vervolgens afbraak van het monster. Als er geen serum beschikbaar is, kan plasma worden gebruikt voor bepaalde testen. Dit kan voorafgaand aan de test aan het laboratorium worden gevraagd.

3. Volbloed

Voor microscopische of moleculaire detectie van parasieten of parasitair DNA in volbloed (direct of na concentratie, bv. in de test van Knott) worden buisjes met een anticoagulans gebruikt (EDTA, Li-heparine). Volbloedmonsters kunnen maximaal 4 dagen bewaard worden bij 4°C. Invriezen op -20°C voor langere bewaring heeft geen invloed op de DNA-detectie, maar wel op de isolatie en identificatie van parasitaire stadia.

4. Geïsoleerde parasieten

Levende artropoden (en huidafkrabsels) worden in een goed gesloten buisje bewaard om ontsnapping te voorkomen. Vochtig papier kan worden toegevoegd om uitdroging te voorkomen. Voor verder onderzoek worden ze gefixeerd in 70% ethanol. Parasieten uit feces, braaksel, huid enz. moeten afzonderlijk worden verzameld en bewaard in een fysiologische zoutoplossing (korte termijn) of in 70% ethanol.

STANDAARDAPPARATUUR VAN EEN PARASITOLOGISCH LABORATORIUM

Aangezien microscopie benodigd is voor de evaluatie van monsters, is een goed onderhouden lichtmicroscop onmisbaar voor parasitologische diagnostiek. Microscopische afmetingen zijn vaak noodzakelijk voor identificatie, daarom moet apparatuur voor nauwkeurige gestandaardiseerde metingen beschikbaar zijn. Voor objecten die met het blote oog zichtbaar zijn, is een stereomicroscop meestal de beste optie voor gedetailleerd onderzoek (zie tabel 1).

Tabel 1: Aanbevolen vergrotingsbereiken en criteria voor identificatie van parasietstadia

Stadia	Vergroting*
Eitjes en larven van wormen, kleine artropoden	Geringe vergroting voor screening: 40-100x Voor details: 400x
Protozoa	Gemiddelde tot sterke vergroting: 400-650x Bloeduitstrijkjes, zeer kleine objecten in feces: 1.000x (olie-immersie)
Grote artropoden, volwassen wormen (of delen daarvan, bv. proglottiden)	Geringe vergroting (stereomicroscop)

* Houd er rekening mee dat vergroting wordt berekend als de oculaire vergroting (meestal 8-10x) x de objectieve vergroting voor een lichtmicroscop terwijl een stereomicroscop slechts één set vergrootglazen gebruikt.

Verschillende kenmerken zoals grootte, vorm, kleur en morfologie van het oppervlak, van de wand zelf en de inhoud worden meegenomen bij de microscopische diagnostiek van parasitaire stadia. Voor het aantonen van levende nematodenlarven (longwormen, strongyliden bij paarden, haakwormen bij hond en kat of *Strongyloides* spp.) kan rekening worden gehouden met de motiliteit. Specifieke structuren zoals de morfologie van het achterste deel, de slokdarm en de staartpunt zijn nuttig voor de identificatie.

Andere apparatuur voor een parasitologisch diagnostisch laboratorium omvat gewoonlijk:

(A) voor coproscopie:

- weegapparatuur
- stamper en mortier
- plastic buisje en spatel, tongspatel, plastic lepel en dergelijke
- plastic stokje of dunne spatel
- wattenstaafje
- plastic knijpfles
- centrifugebuisjes (12–15 ml; 50 ml)
- tafelcentrifuge met uitzwaaiende rotor
- beker (250 ml) of andere houder geschikt voor sedimentatie
- trechter
- theezeefjes met een zeefgrootte van ongeveer 0,5-1 mm (voor flotatie of sedimentatie-flotatie) en 0,3 mm (voor sedimentatie)
- Ose (in een rechte hoek, ongeveer 6 mm diameter) of andere apparaten om druppels van de flotatieoplossing van het oppervlak te verwijderen
- microscoopglasjes
- dekglasje
- immersieolie
- petrischaal (glas of kunststof, met korrelige bodem voor gemakkelijker microscopisch onderzoek)
- methyleenblauwe oplossing (inkt)
- waterstraalpomp (of pipetten van 10-20 ml)
- katoengaas (20 x 20 cm)
- plastic of glazen pasteurpipetten
- telkamer voor wormeitjes of oöcysten (bv. McMaster, FLOTAC)

Voor de Baermann-techniek bovendien:

- trechterfixatieapparaat
- rubber slang en slangklep
- gekalibreerde maatcilinders (100 ml en groter)
- magneetroerder en roermagneten

Voor ontlastingsweek ook:

- Jampot van 500 ml (of vergelijkbaar)
- petrischaal met een iets grotere diameter dan de glazen pot
- Stoof van 25°C, in het donker
- geautoclaveerd zaagsel, houtskool of vermiculiet

(B) voor hematologie en serologie

- Afhankelijk van het formaat en de uitleesmethode is verschillende apparatuur nodig, bijvoorbeeld een fluorescentie microscoop voor IFAT of een plaatlezer voor ELISA enz., evenals laboratoriumpipetten en apparatuur voor kleuringen.

C) voor huidafkrabsels:

- 10% KOH-oplossing of lactofenol
- minerale olie of glycerine

MEDIA EN OPLOSSINGEN

- 0,9% NaCl (fysiologische zoutoplossing)
- flotatiemedia (zie tabel 2):
- lugoloplossing (10 g kaliumjodide, 5 g jodium, ad 200 ml aqua dest.)
- di-ethylether¹
- SAF (natriumacetaat-azijnzuurformaline): 4,5 g natriumacetaat, 6,0 ml geconcentreerd azijnzuur, 12,0 ml formaline¹
- Ziehl-Neelsen-kleuring: carbolfuchsine, malachietgroen, zure alcohol (15 ml HCl (37%) in 485 ml EtOH), methanol (gebruik kleuringset)

¹ ether, formaline of merthiolaat-jodiumformaldehyde (die kwik bevat) worden gebruikt voor de SAF-concentratietechniek (zie 1.2.7.), de Telemann-Rivas-methode (zie 1.2.8.) en/of de MIFC-techniek (merthiolaat-jodiumformaldehydeconcentratie) (niet beschreven in deze richtlijn). De keuze van o.a. de gebruikte methode kan bepaald worden door de verschillende standaard veiligheidsmaatregelen van het laboratorium met betrekking tot deze oplossingen.

Tabel 2: Ingrediënten en eigenschappen van flotatieoplossingen voor parasitologische analyses in ontlasting (selectie)

Flotatie oplossing	Hoeveelheid	Volume water	Soortelijk gewicht*
Verzadigde zoutoplossing (NaCl)	340-360 g NaCl	1000 ml	~1,18-1,2
Zinkchloride zoutoplossing (ZnCl ₂ + NaCl)	275 g ZnCl ₂ + 262 g NaCl	1000 ml	1,3
Zinkchloride oplossing (ZnCl ₂)	440 g ZnCl ₂	1000 ml	1,3
Zinkchloride oplossing (ZnCl ₂)	660 g ZnCl ₂	1000 ml	1,45
Zinksulfaat oplossing (ZnSO ₄)	760 g ZnSO ₄	1000 ml	1,3
Magnesiumsulfaat oplossing (MgSO ₄)	350 g MgSO ₄	1000 ml	1,28
Sucrose oplossing**	550 g sucrose	440 ml	1,28
Verzadigde zout oplossing met 50% glucose	375 g glucose + 250 g NaCl	tot 1.000 ml	1,27
Sucrosezout oplossing**	50 g sucrose + 100 ml verzadigde zoutoplossing		1,33

* bij kamertemperatuur, meetbaar met een **hydrometer**.

** Voeg 0,7 ml formaline (37%) of 1 g kristallijne fenol per 100 ml toe om bacteriële en schimmelgroei te voorkomen of bewaar bij 4°C.

1. FECESONDERZOEK

1.1. Algemene informatie

Macroscopisch onderzoek

Elk fecesmonster wordt eerste macroscopisch beoordeeld op eventueel uitgescheiden wormen (bv. spoelwormen, lintwormproglottiden, draadwormen) of bloed (voor de bewaring van geïsoleerde parasieten, zie Inleiding).

Microscopisch onderzoek

Geschikt voor het aantonen van uitgescheiden eitjes, eipakketjes, larven, oöcysten, trofozoïeten (alleen in verse feces en niet gemengd met een bewaaroplossing) en cysten.

Wormeitjes en protozoaire (oö)cysten moeten worden gedifferentieerd op basis van hun:

- vorm: rond, ovaal, veelhoekig, citroenvormig;
- grootte: groot = ongeveer 80–150 (–300) µm (bv. eitjes van *Fasciola hepatica*, eipakketjes van *Dipylidium caninum*), gemiddeld = ongeveer 60–80 (–120) µm (eitjes van Ancylostomatidae, eitjes van Strongylidae), klein = ongeveer 40–60 µm (bv. eitjes van *Strongyloides*, eitjes van Taeniidae) en zeer klein = ongeveer <40 µm (bv. oöcysten van coccidiën en *Cryptosporidium*, cysten van *Giardia*);
- wand/envelop: dikte, oppervlak (bv. glad, ruw, gedeukt), kleur, onderscheidende kenmerken zoals en dekseltje of membraanporiën; en
- inhoud (in verhouding tot de tijd na fecale uitscheiding): niet-gesegmenteerde cellen, blastomeren, embryo of larve in wormeitjes, aantal sporocysten en sporozoïeten en andere structuren in coccidiën en andere protozoa.

De nematodenlarven worden gedifferentieerd m.b.v. hun lengte, de vorm van de cuticulaire schede, het spijsverteringskanaal en hun voorste en achterste uiteinden. Ze kunnen worden onderscheiden van vrije nematodenlarven op basis van de afwezigheid van extra schedes. Vrij levende nematodenlarven hebben een duidelijke mondopening en een donkerdere kleur dan infectieuze larvenstadia; ze kunnen oesofageale bulbi en verschillende andere specifieke kenmerken hebben.

Afhankelijk van de uitvoering wordt een onderscheid gemaakt tussen verschillende methoden: directe methode zonder concentratie (zoals fecusuitstrijkjes zonder kleuring, aantonen van bewegende stadia of uitstrijkjes met kleuring) i.t.t. tot methoden voor concentratie van parasitaire stadia:

- sedimentatie
- flotatie (met of zonder centrifugatie)
- gecombineerde sedimentatie-flotatie
- Baermann-techniek
- specifieke concentratiemethoden, zoals de Telemann-Rivas-methode, SAFC, enz.

Uitsluitsel biedende coproscopische onderzoeken

De opgesomde methoden kunnen vaak verschillende parasieten aantonen; geen enkele methode is echter even geschikt voor alle stadia en aanwezige parasieten. De voorkeursmethode moet worden gekozen op basis van de verwachte parasietenstadia en er zullen verschillende methoden nodig zijn om alle mogelijke infecties te vinden.

In het algemeen geldt dat hoe groter de hoeveelheid feces, hoe groter de kans op het vinden van parasitaire stadia (hogere sensitiviteit, d.w.z. minder fout-negatieve resultaten). De hoeveelheid onderzochte feces wordt echter beperkt door vervuiling van het monster: te veel debris vermindert de sensitiviteit (d.w.z. meer fout-negatieve resultaten) en ook de specificiteit.

Aangezien een grotere hoeveelheid feces kan worden verwerkt met behulp van een **gecombineerde sedimentatie-flotatiemethode**, is de sensitiviteit hoger, vooral bij lage uitscheidingsniveaus. Dit is dus de **voorkeursmethode** voor routineonderzoek. Net als flotatie en sedimentatie wordt deze methode als semikwantitatief geclassificeerd wanneer ze wordt uitgevoerd met een consistente methodologie en vaste hoeveelheden monsters. Actieve flotatie met centrifugatie heeft de voorkeur boven passieve flotatie. Ook de gekozen flotatieoplossing, dus het soortelijk gewicht, is belangrijk omdat sommige parasieten niet worden gevonden bij een hoog respectievelijk laag soortelijk gewicht.

De sensitiviteit van coproscopische methoden wordt beperkt door de volgende factoren:

- Infecties moeten zich in de patente fase bevinden, d.w.z. er moeten stadia (eitjes, larven, (oö)cysten) aanwezig zijn in het substraat, wat wijst op een actieve infectie met vermenigvuldiging/vorming van nakomelingen. Infecties in de pre- of postpatente fase worden niet gevonden met copromicroscopie;
- Niet alle stadia/parasieten worden continu uitgescheiden; verschillende monsters van individuele dieren (bv. gedurende 3 opeenvolgende dagen) of opnieuw bemonsteren kan nodig zijn;
- Vaak produceren kleine infecties weinig detecteerbare stadia. Een grotere hoeveelheid feces of het uitvoeren van meerdere analyses per dier kan nuttig zijn, zoals hierboven beschreven;

Diarree kan monsters verdunnen door het grotere fecale volume en zo de sensitiviteit te verminderen. Dit kan worden voorkomen door de sedimentatie-flotatiemethode te gebruiken waarbij vloeibare feces worden geconcentreerd door sedimentatie vóór de concentratie van de parasiet door flotatie.

Door de lage sensitiviteit van de copromicroscopie moeten **negatieve resultaten** voorzichtig worden geïnterpreteerd. Het feit dat er geen parasietstadia in de feces worden gevonden, sluit een infectie niet uit bij typische klinische symptomen (bv. nog prepatente infecties). Verder onderzoek is dan gewenst en soms kunnen alternatieve methoden worden toegepast (zoals antigeen- of antilichaamdetectie).

Anderzijds heeft het direct aantonen van parasitaire stadia over het algemeen een hoge specificiteit en zijn fout-positieve resultaten zeldzaam wanneer het onderzoek correct wordt uitgevoerd. Fout-positieve resultaten kunnen voorkomen door coprofagie bij honden (bv. passage door de darm van de kattenparasieten *Toxocara cati* of *Toxoplasma gondii*). De eigenaar moet daarom worden geadviseerd om te proberen dit gedrag te voorkomen, met name de dagen voorafgaand aan de afname van een fecesmonster, om dit te voorkomen. Antigeentesten, die beschikbaar zijn voor sommige nematodensoorten bij de hond, kan dit probleem omzeilen.

Voor de interpretatie van resultaten in een klinische context moeten parasitologische bevindingen worden geëvalueerd samen met andere diagnostische bevindingen (bv. klinisch onderzoek, hematologie, enz.) en, in het geval van zoönotische stadia, de gevolgend voor de volksgezondheid.

1.2. Coproscopische methoden

1.2.1. Sedimentatie in water

Principe:

Met deze methode sedimenteren parasietstadia met een relatief hoog soortelijk gewicht (bv. trematode-eitjes, vooral die van *Fasciola hepatica* en *Opisthorchis felinus* maar ook oöcysten van *Eimeria leuckarti*) en zware fecale deeltjes snel in water. Door herhaaldelijk sedimenteren en verwijderen van de bovenste laag worden lichtere fecesdeeltjes verwijderd. Deze methode wordt meestal toegepast om leverbroteitjes aan te tonen in feces van paarden en katten.

Vereist fecaal materiaal:

5-10 g feces (sensitiviteit verhoogd door herhaalde monsternamen).

Procedure:

1. Meng het fecesmonster met een spatel met water tot een homogene oplossing. Als de consistentie zeer stevig is, meng deze dan vooraf met water met behulp van een stamper en mortier.
2. Giet de feces-watersuspensie door een theezeef (maaswijdte 0,3 mm) in een geschikte houder (bv. een bekersglas) en spoel de zeef met een sterke waterstraal uit een plastic knijpfles totdat het bekersglas vol is.
3. Laat 3 minuten staan.
4. Giet het supernatant in een vloeïende beweging af (of verwijder het met een waterzuigpomp).
5. Vul het bekersglas opnieuw met water.
6. Herhaal de sedimentatie in totaal drie keer. Het uiteindelijke supernatant moet bijna doorschijnend zijn.
7. Voeg 1-3 druppels methyleenblauw (inkt) toe aan de laatste sedimentatie en meng grondig door te zwenken.
8. Giet het gehele sediment in een petrischaal (met papier).
9. Onderzoek het sediment onder een microscoop of stereomicroscoop (20-50x vergroting).

Voor gestandaardiseerd aantonen van *Fasciola*-eitjes in paardenfeces is er ook een commerciële test (FlukeFinder®).

1.2.2. Centrifugatie-flotatie

Principe:

Flotatie wordt uitgevoerd voor de detectie van wormeitjes, protozoacysten en oöcysten met een soortelijk gewicht dat lager is dan dat van de flotatieoplossing. In een suspensie van een fecesmonster dat is vermengd met een flotatieoplossing met een bekende specifieke dichtheid, stapelen lichtere parasitaire stadia zich op aan het oppervlak, terwijl zwaardere deeltjes zinken of in suspensie blijven.

Er kunnen verschillende flotatieoplossingen gebruikt worden (zie Tabel 2). De gekozen oplossing moet ten minste één dag vóór de analyse worden bereid en het soortelijk gewicht gecontroleerd met een hydrometer.

Met een verzadigde natriumchlorideoplossing kunnen eitjes van *Strongyloides* (verse feces), strongyliden, ascariden, oxyuren, coccidiën-oöcysten en andere protozoaire cysten worden gedetecteerd. Met deze methode drijven de parasietstadia door hun lage s.g. in een zoutoplossing met een hoger s.g.. De detectie van *Trichuris*-, *Capillaria*-, taena-, spirurida- of oxyureneitjes en *Eimeria leuckarti*-oöcysten kan twijfelachtig zijn omdat daarvoor flotatieoplossingen met een hoger s.g. nodig zijn. *Giardia*-cysten worden vervormd, terwijl trematode-eitjes niet worden gezien. Lange bewaring van wormeitjes of protozoastadia in hypertonische oplossingen kan leiden tot vervorming, wat de diagnose bemoeilijkt. Soms kunnen er nematodelarven worden aangetroffen in flotatiepreparaten; meestal krimpen ze echter snel en bemoeilijkt de morfologische diagnose.

Naast de bovengenoemde stadia kunnen *Trichuris*, *Capillaria*-, taeniae en spirurida-eitjes en *Giardia*-cysten (vervormd) worden aangetoond met behulp van zinksulfaat of -chloride, magnesiumsulfaat, sucrose of sucrose-zoutoplossingen. Gebruikte oplossingen met zink (zwaar metaal), moeten worden bewaard en afgevoerd als speciaal afval.

Verskillende aanpassingen aan de standaard flotatietechniek zijn mogelijk, zoals voor sommige hierna beschreven.

Vereiste hoeveelheid feces:

Kleine dieren: 4-5 g (ongeveer de grootte van een walnoot), eventueel op 3 opeenvolgende dagen verzameld, geanalyseerd als een submonster van het gepoolde monster; paarden: tot 20 g feces.

Procedure:

1. Bereid de flotatieoplossing op kamertemperatuur en controleer het soortelijk gewicht met een hydrometer (indien niet beschikbaar, totdat het zout bijna volledig is opgelost).
2. Meng het fecesmonster met een 10-voudig volume flotatieoplossing tot een homogene oplossing. Als de consistentie stevig is, laat het monster dan voorweken in water.
3. Giet de fecale suspensie door een theezeef en via een trechter in twee centrifugebuisjes per monster. Laat aan de bovenkant van elk buisje 1 cm vrij om morsen in de centrifuge te voorkomen.
4. Centrifugeer de buisjes 3-5 minuten bij 300 x g.
5. Verwijder met een ose (of vergelijkbaar iets) 3-5 druppels van het oppervlak van de suspensie en breng deze over een objectglaasje.
6. Bedek met een dekglasje en onderzoek onder de microscoop, beginnend met een 40x vergroting. Focus op het juiste optische niveau met behulp van kleine luchtballen of deeltjes als referentie. Het hele gebied van het dekglasje kan dan worden onderzocht bij een hogere vergroting (100–400x). In geval van slechts matig vuile monsters kan onderzoek zonder dekglasje bij een geringe vergroting de sensitiviteit verhogen aangezien eitjes en cysten geconcentreerd zijn op het bolle oppervlak van de druppels.

Er zijn verschillende opties voor het microscopisch onderzoek van parasietstadia die op het oppervlak van de monsters drijven:

- verschillende druppels van het oppervlak van de fecale suspensie kunnen worden overgebracht naar een glaasje met behulp van een ose die in een rechte hoek is gebogen en vervolgens worden onderzocht (met of zonder dekglasje) onder de microscoop. Zorg ervoor dat u het oppervlak van de suspensie niet breekt wanneer u de druppels verwijderd en dat het oogje tussen de verschillende monsters wordt schoongemaakt (wassen gevolgd door uitvlammen);
- plaats een dekglasje op de rand van een gevuld centrifugebuisje (het dekglasje moet in contact staan met het oppervlak van de flotatieoplossing) en centrifugeer met het dekglasje op zijn plaats. Het dekglasje kan dan worden verwijderd, op een microscoopglasje geplaatst en onderzocht onder een microscoop. De drijvende parasietenstadia worden overgebracht naar het glaasje, samen met de vloeistof die aan de onderkant van het dekglasje kleeft. Centrifugeren met een dekglasje werkt het best met een sucroseoplossing;
- plaats een dekglasje op het buisje na het centrifugeren (hiervoor moet het buisje tot de rand worden gevuld zodat de suspensie een meniscus vormt), wacht dan enkele minuten om de parasitaire stadia te laten zweven.

1.2.3. Gecombineerde sedimentatie-flotatiemethode

Met deze methode stapelen de parasietstadia zich eerst op, vormen ze een sediment in water, en vervolgens drijven ze door hun lage soortelijk gewicht in een flotatieoplossing met een hoger soortelijk gewicht. Het voordeel van deze combinatiemethode is de hogere sensitiviteit omdat een grotere hoeveelheid feces (tot 20 g) kan worden onderzocht.

De methode kan worden gebruikt om alle klassen van wormeitjes en de meeste protozoaire oöcysten en cysten nauwkeurig te identificeren. Detectie van nematodenlarven en trematodeneitjes vereist expertise omdat ze vervormd raken. Het is niet mogelijk om protozoaire trofozoïeten en amoebacysten te detecteren met deze methode.

Vereist fecaal materiaal:

Voor honden en katten wordt minimaal 4-5 g feces (ongeveer de grootte van een walnoot) verzameld. In sommige gevallen kan het, om de kans op detectie te vergroten, nuttig zijn om op 3 opeenvolgende dagen fecesmonsters te verzamelen en een submonster van het gepoolde monster te analyseren. Voor paarden: tot 20 g feces.

Procedure:

1. Doe het monster in een mortier en meng het goed met water met behulp van de stamper.
2. Giet de feces-watersuspensie door een theezief via een trechter in twee centrifugebuisjes. Spoel de feces door de zeef met een sterke waterstraal uit een verstuiver (hierbij mag geen materiaal verloren gaan).
3. Centrifugeer gedurende 8 minuten, ongeveer 500-700 x g, voor sedimentatie.
4. Giet het supernatant in één vloeiende beweging af (of hevel het over met een waterzuigpomp) tot er maximaal 5 mm sediment overblijft.
5. Vul de busjes met flotatieoplossing.
6. Centrifugeer de busjes 3-5 minuten bij 300 x g.
7. Ga verder zoals bij de flotatietechniek (zie 1.2.2.).

Als er geen centrifuge beschikbaar is, meng dan het fecesmonster met water en laat de busjes gedurende 30 minuten tot één uur op kamertemperatuur staan, giet het supernatant af en meng het sediment met de flotatieoplossing tot een meniscus kan worden waargenomen. Breng een dekglasje aan, wacht 10-20 minuten (afhankelijk van de flotatieoplossing), plaats het dekglasje op een objectglasje en onderzoek onder een microscoop. Deze methode is minder gevoelig dan deze gebaseerd op centrifugatie en detecteert meestal alleen parasietstadia die in hogere aantallen aanwezig zijn.

1.2.4. Aangepaste McMaster-techniek voor eitelling

Principe:

Deze techniek wordt gebruikt voor **kwantitatief** fecesonderzoek van wormeitjes of coccidiënoöcysten. Een bepaalde hoeveelheid feces drijft in een vat en wordt microscopisch geteld onder een gemarkeerd veld. Uit het getelde aantal stadia wordt de hoeveelheid in 1 g feces berekend en uitgedrukt als epg (aantal eitjes per g) of opg (aantal oöcysten per g). Eitelling wordt vaak gebruikt voor de kwantitatieve bepaling van strongylideitjes bij paarden, maar het is ook van toepassing op andere parasitaire stadia die drijven. Meestal wordt een verzadigde NaCl-flotatieoplossing gebruikt; door het gebruik van flotatieoplossingen met een hogere specifieke dichtheid, kunnen zwaardere eitjes worden gedetecteerd.

Voor veldstudies over geneesmiddelresistentie wordt de techniek toegepast voor en na behandeling met anthelmintica (test voor de afname van het aantal eitjes in de feces (faecal egg count reduction test, FECRT)). De FECRT is een test om de doeltreffendheid van de behandeling te controleren.

In bestrijdingsprogramma's met gerichte geselecteerde behandelingen geven epg-tellingen informatie over de rol van individuele dieren in weidebesmetting en kunnen ze worden gebruikt als hulpmiddel bij de besluitvorming over selectieve behandelingsprocedures voor paarden (zie Richtlijn 8 van ESCCAP: Een gids voor de behandeling en bestrijding van infecties door gastro-intestinale parasieten bij paarden).

Vanwege de detectielimieten (zie hieronder) wordt de aangepaste McMaster-eitellingstechniek niet aanbevolen voor de screening van parasieten bij dieren, in het bijzonder voor zeer relevante endoparasieten (d.w.z. *Echinococcus* spp. bij carnivoren of *Parascaris* spp. bij paarden).

Vereist fecaal materiaal:

Ten minste 4 g feces.

Procedure:

1. Meng precies 4 g feces met ongeveer 30 ml flotatieoplossing in een mortier met een stamper.
2. Giet de fecale suspensie door de zeef en trechter in de cilinder; knijp het zeefresidu uit met een stamper; spoel de mortier en stamper met flotatieoplossing.
3. Verwijder de zeef en trechter en vul de flotatieoplossing aan tot 60 ml.
4. Breng deze suspensie over in een bekerglas en meng goed door continu te roeren, bijvoorbeeld met een magneetroerder.
5. Verwijder snel een monster met een pipet en vul het eerste vak van het telglas met een volume van minstens 0,15 ml. Het telraster moet volledig worden gevuld; er mogen geen luchtbelletjes worden toegevoegd.
6. Meng de suspensie opnieuw grondig en neem een tweede monster om het tweede vak van het glaasje te vullen.
7. Laat het glaasje 5-10 minuten staan om de eitjes/oöcysten te laten drijven.
8. Plaats het telglas onder de microscoop en tel alle parasietenstadia in het telraster (40–100x vergroting).

Berekening van epg/opg:

$$\text{epg/opg} = (\text{aantal eitjes/oöcysten uit alle getelde rasters (N) / hoeveelheid feces (g)} \times \text{telrasteroppervlak (cm}^2\text{)}) \times \text{volume fecale suspensie (ml) / hoogte van telkamer (cm)} \times \text{aantal getelde rasters (n)}$$

- waarbij N het gemiddelde getelde aantal eitjes/oöcysten per raster is;

- waarbij n het aantal getelde rasters is;

- volume onder het raster = telrasteroppervlak (cm²) x hoogte van de telkamer (cm).

Als voorbeeld:

Wanneer de hoeveelheid feces = 4 g en het volume van de suspensie = 60 ml en het volume onder het raster = 0,15 ml, is de technische onderste detectielimiet 100 epg/opg. Met glaasjes met twee kamers en wanneer het totale aantal getelde eitjes **onder beide rasters** wordt opgeteld, is de technische onderste detectielimiet per glaasje 50 epg/opg.

epg/opg =

getelde eitjes		volume fecale suspensie (ml)
hoeveelheid feces (g) x grootte van het raster (cm ²)	x	hoogte kamer (cm) x aantal getelde rasters

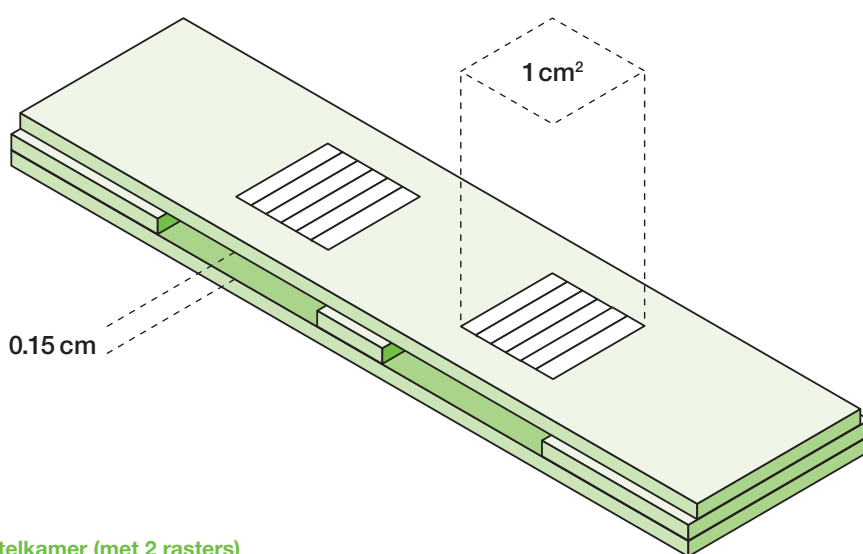
epg/opg = eitjes/oöcysten per gram feces

grootte van het raster: 1 x 1 cm = 1 cm²

hoogte van de kamer = 0,15 cm

volume onder het raster = 0,15 ml (berekend vanaf de hoogte van de kamer en de grootte van het raster)

aantal getelde rasters: kan variëren, daarom wordt dit opgenomen in de formule



Figuur 1: McMaster-telkamer (met 2 rasters)

1.2.5. Mini-FLOTAC

Principe:

Mini-FLOTAC maakt detectie en kwantificering van gastro-intestinale parasieten mogelijk, waaronder oöcysten van coccidiën, wormeitjes en larven van nematoden. Het is afgeleid van het originele FLOTAC-apparaat, maar heeft als bijkomend voordeel dat er geen centrifugatiestap nodig is. Mini-FLOTAC kan worden uitgevoerd op verse of vaste fecesmonsters, wat de mogelijkheid biedt om monsters dagen of weken na bezorging aan het laboratorium te verwerken. De sensitiviteit van Mini-FLOTAC is 5 oöcysten/eitjes/larven/coccidiën per gram feces.

Mini-FLOTAC bestaat uit twee componenten: de basis en de afleesschijf. Er zijn twee flotatiekamers van 1 ml die zijn ontworpen voor het onderzoek van suspensies van fecesmonster met een maximale vergroting van 400x.

Fill-FLOTAC 2 en 5 zijn wegwerphulpmiddelen voor monsters en maken deel uit van de FLOTAC- en Mini-FLOTAC-kits. Ze bestaan uit een houder, een collector (2 g of 5 g) en een filter. Deze kits vergemakkelijken de uitvoering van de eerste vier opeenvolgende stappen van de Mini-FLOTAC-technieken, d.w.z. monsterafname (inclusief weging), homogenisatie, filtratie en vulling. De kit en het proces van de Mini-FLOTAC worden hieronder beschreven.

Voor honden en katten

Vereist fecaal materiaal:

Ten minste 2 g feces.

Procedure:

1. Voeg 18 ml flotatieoplossing toe in de Fill-FLOTAC 2-houder.
2. Vul met een spatel de conische collector van het Fill-FLOTAC-hulpmiddel met 2 g feces en nivelleer het oppervlak.
3. Homogeniseer het monster door de conische collector op en neer te bewegen.
4. Plaats een pipetpunt op de Fill-FLOTAC, homogeniseer kort en vul vervolgens de twee kamers van het Mini-FLOTAC-hulpmiddel tot er zich een kleine meniscus vormt.
5. Voer na 10 minuten translatie van de afleesschijf uit door met de klok mee te draaien en plaats het hulpmiddel onder een microscoop met behulp van de meegeleverde adapter. De Mini-FLOTAC kan worden onderzocht bij een vergroting van maximaal 400x.
6. Onderzoek het monster door beide kamers van de Mini-FLOTAC te lezen. Vermenigvuldig elk geteld ei met 5 om de ei/larve/oöcyste per gram-telling te verkrijgen.

Opmerking: voor de betrouwbare detectie van taenia-eitjes moeten flotatieoplossingen met een hogere dichtheid worden gebruikt (zie tabel 2).

Voor paarden

Vereist fecaal materiaal:

Ten minste 5 g feces.

Procedure:

1. Voeg 45 ml flotatieoplossing (d.w.z. verzadigde NaCl) toe in de Fill-FLOTAC 5-houder.
2. Vul met een spatel de conische collector van het Fill-FLOTAC-hulpmiddel met 5 g feces en nivelleer het oppervlak.
3. Homogeniseer het monster door de conische collector op en neer te bewegen.
4. Plaats een pipetpunt op de Fill-FLOTAC, homogeniseer kort en vul vervolgens de twee kamers van het Mini-FLOTAC-hulpmiddel tot er zich een kleine meniscus vormt.
5. Voer na 10 minuten translatie van de afleesschijf uit door met de klok mee te draaien en plaats het hulpmiddel onder een microscoop met behulp van de meegeleverde adapter. De Mini-FLOTAC kan worden onderzocht bij een vergroting van maximaal 400x.
6. Onderzoek het monster door beide kamers van de Mini-FLOTAC te lezen. Vermenigvuldig elk geteld ei met 5 om de ei per gram-telling te verkrijgen.

1.2.6. Dubbele centrifugatietechniek voor de detectie van *Anoplocephala*-eitjes in feces van paarden

De detectie van lintwormeitjes in feces van paarden met behulp van de standaard flotatiemethode met 20 g feces geeft slechts een beperkte sensitiviteit. Het gebruik van een gecombineerde sedimentatie-flotatie-procedure, waarbij twee centrifugatiestappen worden gebruikt met 15 g feces, zorgt voor een hoger detectiepercentage.

Vereist fecaal materiaal:

15 g

Procedure:

1. Meng het fecesmonster (minimaal 15 g) met een spatel grondig met minimaal 40 ml water.
2. Plaats de zeef op het bekglas van 250 ml en breng het fecesmonster over in de zeef. Giet alle vloeistof door de zeef door op het fecesmonster te drukken met de spatel.
3. Breng het filtraat over in buisjes van 50 ml.
4. Centrifugeer gedurende 10 minuten bij 400 x g.
5. Verwijder het supernatant met een zuigpomp of pipet.
6. Los de resterende pellet op in 1-2 ml sucroseoplossing en breng de suspensie over in een buisje van 15 ml.
7. Vul bij met sucroseoplossing.
8. Centrifugeer gedurende 10 minuten bij 200 x g.
9. Breng met een ose druppels van het (volledige) oppervlak van de gecentrifugeerde fecessuspensie over op een objectglaasje en dek af met een dekglasje.
10. Onderzoek het volledige gebied onder het dekglasje microscopisch zoals beschreven onder 1.2.2.

1.2.7. SAFC-techniek

Principe:

De **SAFC** (**S**odium **A**cetate **A**cetic **A**cid **F**ormalin **C**oncentration)-techniek is geschikt voor het opsporen van geëncysteerde en vegetatieve stadia van protozoa (bv. *Giardia*) en kleine eitjes van sommige trematoden zoals *Opisthorchis* en *Metorchis*. Er worden eerdere in SAF-oplossing bewaarde verse fecesmonsters gebruikt. Door het monster te bewerken met ether worden vetbestanddelen verwijderd en parasitaire stadia geconcentreerd. Varianten van de SAFC-techniek zijn de Telemann-Rivas-methode (zie 1.2.8.) en de MIFC-techniek (hier niet beschreven).

SAF-oplossing:

20 ml geconcentreerd azijnzuur
40 ml formaldehyde (37%)
15 g natriumacetaat
ad 1 l aqua dest.

Vereiste hoeveelheid feces:

Minimaal 1 g verse feces, overgebracht in monsterbuisjes met 10 ml SAF-oplossing.

Procedure:

1. Schud de monsterbuisje met feces en SAF-oplossing.
2. Giet de helft van de suspensie door een gaasje in een centrifugebuisje en centrifugeer gedurende 2 minuten (500 x g).
3. Verwijder het supernatant, voeg 8 ml fysiologische zoutoplossing toe en roer het sediment op met een plastic spatel of stokje.
4. Voeg 3 ml di-ethylether toe, sluit het buisje en meng de inhoud door voorzichtig te schudden.
5. Verwijder de dop en centrifugeer gedurende 5 minuten (500 x g) zodat er zich verschillende lagen kunnen vormen.
6. Maak met een stokje de aanslag los van de wand van het buisje en verwijder het supernatant.
7. Breng twee of meer druppels van het sediment over op een glaasje. Voeg eventueel lugoloplossing toe en bedek met een dekglasje.
8. Onderzoek het volledige gebied onder de dekglasjes microscopisch zoals beschreven in rubriek 1.2.2.

1.2.8. Telemann-Rivas-methode

Principe:

Deze methode is een variant van de SAFC-techniek. Deze methode concentreert eitjes, cysten en larven in feces met hoge vetconcentraties (zoals van carnivoren).

Vereiste hoeveelheid feces:

1 g, vers.

Procedure:

1. Weeg 1 g verse feces af.
2. Doe de feces in een glazen potje en voeg 5 ml azijnzuur (minimaal 5% concentratie) toe.
3. Homogeniseer grondig met een stokje en filter door een dubbele laag gaas.
4. Breng de fecesoplossing over in een centrifugebuisje (12 ml).
5. Voeg een gelijke hoeveelheid di-ethylether toe en meng door te schudden.
6. Centrifugeer gedurende 5 minuten (300 x g). Het mengsel scheidt in 4 lagen (van boven naar beneden): di-ethylether-detritus (inclusief vetcomponenten)-azijnzuur-sediment. Het sediment is vaak erg weinig.
7. Verwijder het sediment met een pipet en breng het over op een glaasje. Voeg eventueel lugoloplossing toe voor de detectie van bepaalde parasitaire stadia (*Giardia*-cysten) en bedek met een dekglasje.
8. Onderzoek het volledige gebied onder de dekglasjes microscopisch zoals beschreven in rubriek 1.2.2.

1.2.9. Baermann-techniek

Principe:

Deze methode wordt meestal gebruikt voor de isolatie van beweeglijke nematodenlarven (L1 van longwormen, *Strongyloides*). De Baermann-techniek kan ook worden gebruikt om larven in het derde stadium (L3) van strongyliden in feceskweek te vinden. Het principe is gebaseerd op de migratie van larven naar water (hydrotaxis) en de zwaartekracht en is alleen geschikt voor levende larven in verse feces. Door de feces te wegen en alle aanwezige larven te tellen, is een kwantitatieve analyse mogelijk.

Vereist fecaal materiaal:

Ten minste 4-10 g feces; monsternamen gedurende drie opeenvolgende dagen is nuttig als oplossing voor de tussentijdse uitscheiding van L1 van longwormen.

Procedure:

1. Maak het Baermann-apparaat klaar door de trechter met een hydrofiel gaasje en zeef in de houder te plaatsen en de rubberslang op het trechteruiteinde te bevestigen. Met de klem parallel aan de openingszijde aan de onderkant. Giet wat leidingwater in de trechter. Controleer of de klem niet lekt door bijvoorbeeld het apparaat de dag voor gebruik te vullen.
2. Meng de feces goed (er kan zaagsel worden gebruikt om de feces los te maken als het monster hard en compact is) en plaats het homogene mengsel op het gaasje.
3. Plaats het gaasje met de uitwerpselen in de trechter en voeg water toe tot het bijna volledig bedekt is.
4. Laat het monster minstens 12 uur op kamertemperatuur staan. De larven migreren uit de feces in het buisje en zinken (zwaartekracht) naar het trechteruiteinde.
5. Na opening van de klem, worden de eerste druppels bekeken onder een microscoop (40–400x vergroting). Bewegende larven kunnen met 1 druppel lugoloplossing worden gedood om de morfologische kenmerken makkelijker vast te stellen. Een andere methode is om 10-14 ml van de vloeistof in een buisje te centrifugeren gedurende 2 minuten (500 x g) en 0,5-1 ml van het sediment te onderzoeken na verwijdering van het supernatant.

Voor de kwantitatieve bepaling van het aantal larven per gram feces (LPG), eerst de feces wegen, alle larven (of delen) in het sediment tellen en het LPG extrapoleren.

1.2.10. Fecale larvencultuur

Principe:

Feceskweken worden uitgevoerd met paardenfeces om larven in het derde stadium (L3) van maagdarmparasieten te vinden: eitjes van trichostrongyliden en strongyliden worden gekweekt tot L3 waardoor differentiatie op genusniveau mogelijk is.

Vereist fecesmateriaal:

Ten minste 50 g feces, rechtstreeks uit het rectum of onmiddellijk na defecatie om verontreiniging met bodemparasieten te voorkomen.

Procedure:

1. Meng feces met gesteriliseerd zaagsel tot een vochtige, kruimelige massa (voeg indien nodig leidingwater toe, maar zorg ervoor dat het water altijd geabsorbeerd wordt; als het mengsel te vochtig is, ontwikkelen de larven zich niet).
2. Breng het mengsel over in een glazen pot met schroefdop die half wordt gevuld en laat het deksel los (er moet nog lucht in de pot kunnen).
3. Incubeer de pot 7-10 dagen in het donker bij 25 °C, waardoor de zich ontwikkelende larven kunnen migreren tegen de glazen wanden.
4. Open de pot en druk de feceskweek naar beneden met een stamper of een lepel.
5. Vul de pot voorzichtig tot de rand met leidingwater zonder de feceskweek te roeren.
6. Druk het deksel van een glazen petrischaaltje stevig op de hals van de glazen pot en draai de kweek ondersteboven.
7. Vul het petrischaaltje half met water en laat de pot en het schaalpje 12 uur staan, zodat de larven van het kweekglas in de vloeistof van het petrischaaltje kunnen gaan.
8. Verzamel de vloeistof in het petrischaaltje met een pipet en differentieer de larven onder de microscoop (zie 1.2.9.).

Een andere methode is na incubatie en ontwikkeling van larven in het derde stadium (punt 3) deze te concentreren volgens de Baermann-methode (zie 1.2.9.).

1.2.11. Fecesuitstrijkjes, kleuring

Principe:

Directe fecesuitstrijkjes op voorwerpglaasjes kunnen een optie zijn voor snelle detectie van grote aantallen longwormlarven of protozoaire trofozoïeten. Zonder concentratie heeft deze procedure echter een lage gevoeligheid en is in de meeste gevallen niet betrouwbaar voor detectie van parasieten. De enige uitzondering is de hier beschreven kleuring voor detectie van *Cryptosporidium*.

Oöcysten van *Cryptosporidium* kunnen worden gedetecteerd in dunne fecesuitstrijkjes na kleuring. Na gemodificeerde Ziehl-Neelsen-kleuring (zuurvaste kleuring) zijn de oöcysten zichtbaar als roze, wat ronde objecten (diameter 4-6 µm) op een turquoise achtergrond. Na kleuring met carbolfuchsin volgens Heine zijn oöcysten zichtbaar als kleurloze structuren op een roodachtige achtergrond. De Kinyoun-kleuring is ook geschikt om dergelijke oöcysten op te sporen.

Vereist fecesmateriaal:

1 g feces, halfvloeibaar of vloeibaar (gemengd met water wanneer te stevig).

Procedure Ziehl-Neelsen-kleuring:

1. Verdeel het fecesmateriaal met een wattenstaafje in een dunne laag op een voorwerpglasje.
2. Laat het drogen aan de lucht gedurende ongeveer 30 minuten bij kamertemperatuur.
3. Fixeer gedurende 5 minuten in methanol in een kleuringsapparaat.
4. Laat drogen aan de lucht.
5. Kleur gedurende 4 minuten met carbofuch sine in een kleuringsapparaat.
6. Spoel met koud stromend leidingwater.
7. Ontkleur met zure alcohol in een kleuringsapparaat tot er geen kleur meer stroomt.
8. Spoel met koud stromend leidingwater.
9. Voer gedurende 4 minuten een tegenkleuring uit met malachietgroen in een kleuringsapparaat.
10. Spoel met koud stromend leidingwater.
11. Laat drogen aan de lucht.
12. Voer een microscopisch onderzoek uit met 400–1000x vergroting (olie-immersie) en zoek naar roze, wat ronde objecten (diameter 4-6 µm).

Procedure Heine-kleuring:

1. Meng een druppel feces met carbofuch sine en spreid dun uit op een microscoopglasje.
2. Laat aan de lucht drogen tot het oppervlak er mat uitziet en onderzoek onmiddellijk microscopisch met olie-immersie zoals hierboven beschreven.

1.2.12. Plakbandmethode

Met transparant plakband (ca. 1 cm breed en 4 cm lang) kan direct materiaal rond de anus van paarden worden verzameld voor detectie van *Oxyuris equi*-eitjes. Dit kan ook worden toegepast om *Echinococcus* en andere *Taenia*-eitjes te vinden in het perianale gebied van de hond. De kleefzijde van de plakband wordt meerdere malen op de huid gedrukt en vervolgens met de kleefzijde naar beneden als dekglasje op een voorwerpglasje gedrukt. Het monster kan nu microscopisch worden beoordeeld.

1.2.13. Commerciële onderzoekskits voor fecesanalyse/ InPouch™ TF feline-/coproantigeen testen

Er zijn verschillende kits voor de flotatiemethode verkrijgbaar om fecesonderzoek te vergemakkelijken (bv. Parasite Diagnosis System®, ParaTest®, Fecalyzer®, Ovatec® Plus); deze kits werken met een gebruiksklare flotatieoplossing (soortelijk gewicht 1,2) en fecespotjes voor analyse.

Over het algemeen zijn deze kits het meest geschikt voor fecesonderzoek bij hond en kat. Ze zijn aantrekkelijk omdat ze gebruiksvriendelijk zijn en een hygiënische manier om te werken met fecesmonsters en deze te onderzoeken.

De kits kunnen slechts kleine hoeveelheden feces verwerken omdat het potje klein is, en de procedure kan inhouden dat het fecesmonster aan de onderzijde van het zeefje moet worden aangebracht. Als gevolg daarvan zijn kits alleen geschikt voor monsters die bij carnivoren zijn verzameld en hebben ze, in geval van lichte infestaties, een lagere detectiegevoeligheid (kleinere hoeveelheid feces onderzocht, lager s.g. van de flotatieoplossingen, geen concentratie door centrifugatie) in vergelijking met de hierboven beschreven gecombineerde sedimentatie-flotatiemethode. Bovendien is het meestal niet mogelijk om het monster macroscopisch te inspecteren (bv. op de aanwezigheid van proglottiden) als de eigenaar van het dier de houder met het fecesmonster al heeft gesloten alvorens het voor analyse binnen te brengen. In vergelijking met conventionele methoden kost analyse met behulp van een kit meer en produceert het meer plasticafval omdat er wegwerppcomponenten worden gebruikt.

InPouch™ TF Feline

Deze methode wordt gebruikt voor de kweek en detectie van *Tritrichomonas foetus*-trofozoïeten in kattenfeces. Feces (0,03 g, dit komt overeen met de grootte van een speldenkop) wordt door middel van een steriel wattenstaafje in een commercieel verkrijgbaar zakje (InPouch™ TF Feline) met kweekmedium, gebracht. Het zakje wordt gelabeld en vervolgens gesloten voor de kweek in een verticale positie bij 37 °C gedurende 24 uur, en wordt daarna in het donker bij kamertemperatuur. Het zakje wordt na 24 uur, 48 uur en daarna om de twee dagen tot 12 dagen met de microscoop onderzocht op trofozoïeten.

Hoewel de test als specifiek is voor *T. foetus*, kunnen niet-pathogene flagellaten zoals *Pentatrichomonas* voorkomen in de kweek, waardoor moleculaire differentiatie nodig is.

Coproantigeentesten en andere parasitaire detectietesten op basis van antilichamen

Coproantigeentesten detecteren kwalitatief antigenen van parasieten in feces en worden vaak gebruikt als 'point of care' testen in de praktijk, maar ook in gespecialiseerde laboratoria, vanwege de hoge gevoeligheid voor onderzoek van de beoogde gastsoort. De formats voor coproantigeendetectie kunnen directe immunofluorescentie testen (DFA) zijn op glaasjes, ELISA- of enzymimmunoassay (EIA)-geformatteerde antigeendetectietesten in 96-wellplaten of immunochromatografische dipsticktesten (ICT) (zie ook tabel 3). Omdat er nu testen beschikbaar zijn voor gebruik bij hond en kat, krijgen deze de voorkeur boven testen die ontwikkeld zijn voor fecesmonsters van de mens, vanwege de verbeterde kwaliteitsborging, vooral voor specificiteit.

In het geval van *Giardia* moet worden opgemerkt dat de coproantigeendetectie niet altijd correleert met ziekte, en de testresultaten moeten worden geïnterpreteerd in combinatie met klinische symptomen.

Tabel 3: Voorbeelden van commercieel beschikbare coproantigeentesten (niet volledig)

Test	Fabrikant	Gedetecteerde parasiet	Format	Gastheersoort*
Anigen Rapid CPV/CCV/ Giardia Ag 2.0	BioNote, Korea	<i>Giardia</i>	immunochromatografie	hond, kat
FASTest® GIARDIA Strip	Megacor, Oostenrijk	<i>Giardia</i>	immunochromatografie	hond, kat
FASTest® CRYPTO-GIARDIA Strip	Megacor, Oostenrijk	<i>Giardia/Cryptosporidium</i>	immunochromatografie	hond, kat
SNAP® <i>Giardia</i>	IDEXX, VS	<i>Giardia</i>	ELISA	hond, kat
Merifluor® <i>Cryptosporidium</i> / <i>Giardia</i>	Meridian Bioscience, VK	<i>Giardia/Cryptosporidium</i>	directe immunofluorescentiedetectie	hond
PetChek™ IP Fecal Dx™**	IDEXX, VS	<i>Giardia</i> -ascariden Trichuridae-haakwormen	ELISA	hond, kat
Speed Giardia™	BVT-Virbac, Frankrijk	<i>Giardia</i>	immunochromatografie	hond, kat
Uranotest® <i>Giardia</i>	Uranovet, Spanje	<i>Giardia</i>	immunochromatografie	hond, kat
WITNESS™ GIARDIA	Operon S.A., Spanje****	<i>Giardia</i>	immunochromatografie	hond, kat

* volgens de instructies van de fabrikant; sommige testen kunnen worden uitgebreid naar andere soorten zoals beschreven in de literatuur.

** PetChek™ IP-afnamekit verkocht door dierenartspraktijken, monsters gaan naar de fabrikant voor de test. Fecal Dx™ verwijst naar dezelfde testen van hetzelfde bedrijf.

*** beschreven voor gebruik bij honden.

**** geleverd door Zoetis.

2. SEROLOGIE

2.1. Algemene informatie

Bij chronische infecties hebben serologische testen de voorkeur boven directe detectie, omdat deze laatste een kleiner slagingspercentage heeft bij lage aantallen parasieten in het substraat, bijvoorbeeld bij babesiose of neosporose, of in gevallen waarin het geïnfecteerde weefsel niet kan worden bemonsterd en stadia niet direct toegankelijk zijn in lichaamsvloeistoffen. Bijvoorbeeld chronische protozair infecties van *Toxoplasma gondii* of *Encephalitozoon cuniculi* in weefsels zoals de hersenen of het oog. Bij de diagnose van canine leishmaniose worden serologische testen naast directe detectie gebruikt om de juiste interpretatie van de infectie en immunologische status van de dieren te ondersteunen, om de respons op de behandeling te monitoren en om te anticiperen op een mogelijke terugval.

Antigeenopsporing

Naar analogie van coproantigeentesten, die antigenen in feces detecteren (zie 1.2.13), houdt de serologische detectie van antigenen in dat delen van de parasiet (somatische antigenen) of door de parasiet geproduceerde excretoire/secretoire antigenen rechtstreeks in bloed of serum worden gedetecteerd. Zoals bij DNA-detectie levert dit direct bewijs van de aanwezigheid van de parasiet in de bloedsomloop en dus informatie over de huidige infectiestatus. *Dirofilaria immitis* en *Angiostrongylus vasorum* zijn bloedparasieten waarvan antigenen in de bloedsomloop serologisch kunnen worden gedetecteerd (zie tabel 4).

Tabel 4: Selectie van serologische testen die verkrijgbaar zijn voor de diagnose van parasieten of door vectoren overgedragen pathogenen van hond, kat en paard.

(Bronnen: www.megacor.at; www.laboklin.de; www.idexx.ch; uranovet.com en andere; niet volledig)

Test	Fabrikant	Gedetecteerde door vectoren overgedragen parasieten of bacteriën	Format	Gastheer soorten
Antigeen detectie testen				
Anigen Rapid CHW Ag 2.0	BioNote, Korea	<i>Dirofilaria immitis</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
DiroCHEK®	Zoetis, VS	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	hond
FASTest® HW Antigen	Megacor, Oostenrijk	<i>Dirofilaria immitis</i>	ELISA	hond
Angio Detect™ Test	IDEXX, VS	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
Speed Diro™	BVT-Virbac, Frankrijk	<i>Dirofilaria immitis</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
Uranotest® Dirofilaria	Uranovet, Spanje	<i>Dirofilaria immitis</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond, kat
WITNESS® Dirofilaria	Zoetis, VS	<i>Dirofilaria immitis</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
Antilichaam detectie testen				
ANAPLASMA-ELISA DOG	Afosa, Duitsland	<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	ELISA	honde
Anigen Rapid Leishmania Ab	BioNote, Korea	<i>Leishmania infantum</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
BABESIA-ELISA DOG	Afosa, Duitsland	<i>Babesia canis</i>	ELISA	hond
EHRlichia-ELISA DOG	Afosa, Duitsland	<i>Ehrlichia canis</i>	ELISA	hond
Diagnosteq	Universiteit van Liverpool, VK	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA	paard
EquiSal	Austin Davis Biologics, VK	<i>Anoplocephala perfoliata</i>	ELISA (met speeksel)	paard
LEISHMANIA-IgG ELISA DOG	Afosa, Duitsland	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	hond
SARCOPTES-ELISA 2001 DOG	Afosa, Duitsland	<i>Sarcoptes scabiei</i> var. <i>canis</i>	ELISA	hond
SNAP® <i>Leishmania</i>	IDEXX, VS	<i>Leishmania infantum</i>	ELISA	hond
Speed Leish K™	BVT-Virbac, Frankrijk	<i>Leishmania infantum</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
Uranotest® Ehrlichia-Anaplasma	Uranovet, Spanje	<i>Ehrlichia canis</i> , <i>Anaplasma platys</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
Uranotest® Ehrlichia	Uranovet, Spanje	<i>Ehrlichia canis</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
Uranotest® Leishmania	Uranovet, Spanje	<i>Leishmania infantum</i>	'Laterale flow'-immunochromatografie	hond
Gemengd antigeen (Ag)-antilichaam (Ab) detectie testen				
SNAP® 4Dx® Plus	IDEXX, VS	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Borrelia burgdorferi</i> (Ab) <i>Ehrlichia canis</i> (Ab) (<i>E. ewingii</i> , <i>E. chaffeensis</i>) <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (Ab), <i>A. platys</i> (Ab)	ELISA	hond
Uranotest® Quattro	Uranovet, Spanje	<i>Dirofilaria immitis</i> (Ag) <i>Leishmania infantum</i> (Ab) <i>Ehrlichia canis</i> (Ab), <i>A. platys</i> (Ab)	Immunochromatografie	hond

Antilichaam detectie

De detectie van specifieke antilichamen tegen parasieten in één enkel monster geeft aan of het dier eerder aan dit antigeen/deze parasiet is blootgesteld. Omdat de aanmaak van antilichamen vertraagd is, kunnen ze meestal pas 2-3 weken na de primaire infectie worden aangetoond. Antilichamen blijven ook aanwezig na eliminatie van het pathogeen, in veel gevallen weken tot maanden/jaren, met grote individuele en pathogeenspecifieke variaties. Er kunnen antilichamen aanwezig zijn afkomstig van andere bronnen dan infectie, zoals een eerdere vaccinatie (bv. tegen *Leishmania* of *Babesia*) of maternale antilichamen bij jonge dieren. Kruisreactiviteit met andere organismen of niet-specifieke reacties kunnen de specificiteit van serologische testen beperken.

Om foute resultaten te verminderen, kunnen serologische testen na een bepaalde periode (meestal 2-3 weken) worden herhaald om te zien of de waarden zijn veranderd. Als een dier dat eerder negatieve of lage waarden had een stijgende of positieve waarde heeft, kan dit worden geïnterpreteerd als een actieve/aanhoudende infectie; als de waarde daalt of negatief wordt, is de infectie beëindigd. Er zijn echter uitzonderingen op deze regel.

Om schommelingen in antilichamen te testen, kunnen ofwel kwantitatieve ELISA's (met waarden voor eenheid, score of concentratie) of semikwantitatieve IFA-testen (titers) worden gebruikt. Sneltesten in de kliniek zijn kwalitatief van aard en laten alleen zien of een dier serologisch positief of negatief is.

De methoden van antilichaamdetectie lijken op die van antigeendetectie, behalve dat het substraat voor detectie wordt omgekeerd. Aangezien de meeste methoden alleen door gespecialiseerde laboratoria met specifieke apparatuur worden uitgevoerd, worden deze methoden niet in detail beschreven in deze richtlijn, maar worden alleen de verschillende beschikbare praktijktesten besproken.

Doorgaans wordt antilichaamdetectie toegepast om de infectiestatus te evalueren voor extra-intestinale protozoa die chronische infecties veroorzaken, zoals *T. gondii*, *E. cuniculi* (kat en hond), *Neospora caninum* (hond), *Sarcocystis neurona* (paard) en diverse door vectoren overgedragen pathogenen, waaronder *Leishmania infantum*, *Babesia canis*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Dirofilaria immitis* (kat), *Angiostrongylus vasorum* (hond), *Babesia caballi* en *Theileria equi* (paard). Voor honden worden antilichamen tegen metacestoden, zoals alveolaire echinococcose, bepaald in gespecialiseerde laboratoria.

Bovendien kan infectie met *Anoplocephala perfoliata* bij paarden worden gediagnosticeerd door detectie van antilichamen in serum of in speeksel. Voor honden kan de directe detectie van sarcoptes schurft worden ondersteund door een serologische antilichaamtest.

Sommige laboratoria bieden 'reispakketten' voor honden aan met verschillende testen (serologie, PCR, antigeendetectie, test van Knott enz.) voor 'exotische' pathogenen. Men moet echter rekening houden met de verschillen in incubatietijd en het ontstaan van klinische ziektesymptomen. Hertesten kan in sommige gevallen nodig zijn.

Sommige landen hebben nationale eisen met betrekking tot het testen op equine piroplasmose.

Kwaliteitsborging bij serologische testmethoden

Zoals bij alle diagnostische testen hebben serologische testen verschillende niveaus van sensitiviteit en specificiteit. Er worden daarom altijd positieve en negatieve controles uitgevoerd. Veel laboratoria bieden achtergrondinformatie over de technische kwaliteit van hun testen en interpretatiehulpmiddelen, met name over interferentie met bijvoorbeeld vaccinatietiters, kruisreactiviteit met nauw verwante pathogenen en andere factoren waarmee rekening moet worden gehouden voor de interpretatie van testen.

Afhankelijk van het klinische beeld en de vereisten van de test wordt een serologische test soms gecombineerd met directe detectiemethoden of, als dit niet mogelijk is, met een ander indirect testsysteem voor antilichaamdetectie. De western blot-test wordt vaak gebruikt als referentietest voor humane infecties, maar vanwege kosten en tijdsgebrek is de toepassing ervan in de veterinaire diagnostiek meestal beperkt tot onderzoek, op enkele uitzonderingen na.

Indien van toepassing worden immunoglobulinen tijdens actieve, subacute infecties (IgM) onderscheiden van immunoglobulinen bij chronische infecties (IgG).

Om het succes van de behandeling in het geval van canine leishmaniose te evalueren, volstaat serologie niet altijd, omdat antilichamen verschillende maanden of jaren na de klinische genezing aanwezig kunnen blijven omdat de parasiet niet wordt geëlimineerd. Met andere laboratorium analyses kan de immunologische en gezondheidstoestand van de patiënt worden geëvalueerd. Met kwantitatieve PCR kan de parasietenlast in weefsels worden bepaald, wat nuttig kan zijn voor de follow-up tijdens de behandeling, hoewel deze aanpak grondig moet worden geëvalueerd.

2.2. Kwantitatieve methoden voor antilichaam detectie

2.2.1. Indirecte fluorescentie antilichaam test (IFAT)

De IFAT is gebaseerd op detectie van specifieke antilichamen, die binden aan antigenen (d.w.z. geïnactiveerde complete parasieten) die geïmmobiliseerd zijn op objectglasjes en vervolgens worden gedetecteerd door een secundair antilichaam. Dit antilichaam bindt aan het onveranderlijke gebied van het primaire (serum) antilichaam dat covalent verbonden is met een fluorofoor. Bij fluorescentielicht microscopie wordt deze op het gebonden antilichaam gedetecteerd bij de juiste golflengte. De techniek is zeer nauwkeurig en tijdrovend wanneer ze goed wordt uitgevoerd, maar vereist opleiding en expertise. Voor gezelschapsdieren wordt het echter nog veel gebruikt omdat het minder gevoelig is voor niet-specifieke reacties. Het nadeel van IFAT's is dat niet alle antigenen even toegankelijk zijn voor de antilichamen, dus de sensitiviteit kan laag zijn in vergelijking met andere testen. De resultaten worden in titers uitgedrukt en geven een semikwantitatief resultaat, wat nuttig kan zijn voor follow-up studies.

2.2.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

De enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) detecteert specifieke antigenen of antilichamen die zich binden aan een lysaat van natieve of recombinant antigenen) of antilichamen geabsorbeerd op een plastic oppervlak (indirecte ELISA). Het secundaire antilichaam is hier gelabeld met een enzym dat een kleurverandering veroorzaakt van een chromofoor substraat dat kan worden gekwantificeerd door de optische dichtheid te meten. Een uitgebreidere vorm is de sandwich-ELISA die het antigeen niet rechtstreeks aan het plastic oppervlak bindt, maar gebruik maakt van antilichamen op dit oppervlak om specifieke antigenen te binden. Deze methode is nuttig wanneer de directe koppeling van antigeenmengsels aan de vaste fase leidt tot een afname van de specificiteit van de test. Andere ELISA-methoden zijn ook mogelijk.

De ELISA is een meer gestandaardiseerde testmethode, verkrijgbaar in 96-wellplaten en vaak voorzien van controles, zodat pathogeenspecifieke kennis niet nodig is om de test uit te voeren. De resultaten worden uitgedrukt als absorptie waarden, testscores, concentraties of antilichaameenheden en in de meeste gevallen wordt slechts één verdunning van diagnostisch materiaal gebruikt voor specifieke antilichaamdetectie en lage verdunningen voor algemene antigeendetectie. Daarom is de intensiteit van de reactie niet altijd gecorreleerd met de hoeveelheid aanwezige antilichamen (bij sterke positieve reacties kan het systeem verzadigd zijn).

Aangezien ELISA-methoden meer gestandaardiseerd zijn dan IFAT's en de optische uitlezing minder subjectief is dan microscopie, hebben kwantitatieve ELISA's de voorkeur boven IFAT voor het meten van veranderingen in antilichaamtiter na verloop van tijd.

In bepaalde gevallen kunnen andere substraten dan bloed worden getest, zoals in het geval van *Anoplocephala perfoliata* in speeksel van paarden (EquiSal®).

2.3. Kwalitatieve methoden

2.3.1. Sneltest systemen

Enzymgebaseerde sneltesten (met antilichamen die covalent aan een enzym zijn gebonden en een wasstap gebruiken) of immunochromatografische testen (met antilichamen die aan colloïdaal goud zijn gebonden zonder wasstap) zijn beschikbaar voor de snelle point-of-care diagnostiek van verschillende infectieziekten. Zij worden geleverd door gespecialiseerde bedrijven die kwaliteitsborging van de testen handhaven en alle materialen leveren, inclusief de positieve en negatieve controles in de test. De testen zijn eenvoudig en snel uit te voeren en vereisen geen specifieke opleiding. Ze mogen echter niet worden gebruikt voor andere doeleinden en gasteren dan vermeld in de bijsluiter. De hoeveelheid antilichamen of antigeen is meestal niet nauwkeurig genoeg om een titerverandering te bepalen.

3. HUDONDERZOEK

3.1. Algemene informatie

Dit deel besprekt het aantonen van uitwendige parasieten die rechtstreeks problemen geven door hun aanwezigheid op de huid van hond, kat, paard en kleine gezelschapsdieren.

Vlooien, luizen, mijten en teken veroorzaken allemaal parasitaire ziekten, door directe invloed en/of door overdracht van pathogenen.

De diagnose van huidinfestatie door kleinere ectoparasieten zoals mijten en de differentiatie van soorten, vereisen meestal een of meer levensstadia van de parasiet. Het succes van de diagnose hangt af van de juiste verzameling van materiaal en, na eventuele verwerking, onderzoek met de microscoop, bij voorkeur met de condensor naar beneden en de lichtbron gedimd.

In het volgende hoofdstuk worden de meest gebruikte methoden om ectoparasieten aan te tonen beschreven.

3.2. Gebruik vlooienkam

Een 'vlooienkam' is een fijn getande kam die wordt gebruikt om debris uit de vacht van een dier te verzamelen.

Bij afwezigheid van de bijzonder beweeglijke vlooien kunnen vlooienfeces worden aangetoond door het dier te kammen en het verzamelde materiaal op vochtig wit papier, tissue of watten te leggen: de zwarte vlekken van vlooienfeces worden omgeven door een rode ring van onverteerd bloed.



Figuur 2: gebruik vlooienkam



Figuur 3: vlooienfeces die bloed bevatten na toevoeging van water

Kammen kan ook nuttig zijn om een infestatie met *Cheyletiella* en luizen aan te tonen. Het verzamelde debris kan in een petrischaaltje met een stereomicroscop worden onderzocht: mijten kunnen zichtbaar zijn tussen het debris ('wandelende roos'). Een andere manier om luizen of *Cheyletiella*-mijten te vinden, is door met plakband de schilfers van de kam te halen (zie 1.2.12) en de parasieten of hun eitjes onder de microscoop te bekijken.

3.3. Huidafkrabsels

Huidafkrabsels maken het mogelijk om de bovenste lagen (oppervlakkig) of alle lagen (diep) van de epidermis te bemonsteren om ectoparasieten te detecteren die ofwel op het huidoppervlak blijven of dieper verblijven, zoals in haarzakjes. De monsternamen worden uitgevoerd op de rand van huidlesies of op voorkeursplaatsen van ectoparasieten.

Afkrabsels gebeuren met het lemmet van een scalpel of een curette. Er moet minerale olie worden aangebracht op het lemmet van het scalpel en de huid om debris en parasieten vast te hechten aan het lemmet. Als knippen noodzakelijk is, mag alleen een schaar worden gebruikt en het verdient de voorkeur alleen onbeschadigde huid af te krabben.

Het monster wordt verstuurd in een transparant plastic buisje met grote opening, dat stevig kan worden afgesloten.

Aanvankelijk kunnen het huidmateriaal en de wanden van de plastic houder worden onderzocht met behulp van een stereomicroscop of een vergrootglas, aangezien mijten en andere geleedpotigen de neiging hebben om uit het huidmateriaal te migreren. Het verzamelde materiaal kan vervolgens microscopisch onderzocht worden bij 40-100x vergroting met een druppel minerale olie of glycerol.

Zowel oppervlakkige als diepe huidafkrabsels moeten bij voorkeur worden afgenomen van meerdere delen van het lichaam op de rand van verdachte huidlesies.

Voor **hond en kat** worden afkrabsels geadviseerd voor de diagnose van schurft (bv. *Sarcoptes scabiei*, *Notoedres cati*), demodicose (*Demodex* spp.), cheyletiellose (*Cheyletiella* spp.) of mijtinfestatie (larven van *Trombicula autumnalis*). Vooral:

- Bij verdenking van *Demodex canis* infectie wordt begonnen met een trichogram (zie 3.5.): als er *Demodex*-mijten aanwezig zijn en deze vastzitten aan de haartjes, is het niet meer nodig om een huidafkrabsel uit te voeren.
- Voor *S. scabiei* bij honden worden diepe huidafkrabsels afgenomen van de ellebogen, oorranden en laterale spronggewrichten. Omdat meer dan 50% van de afkrabsels bij honden met sarcoptesschurft negatief is, worden ter verhoging van de sensitiviteit 6-10 monsters genomen van verschillende verdachte plekken op het dier. Ook zijn er ELISA's die antilichamen tegen *S. scabiei* aantonen, waardoor de diagnose wordt verbeterd (zie tabel 4).
- Voor *Demodex gato* bij katten kan dezelfde procedure worden gevolgd als voor afkrabsels van *S. scabiei* bij honden.
- Voor de detectie van *Cheyletiella*-mijten kunnen de rug en de oren worden afgekrabd; de aanbevolen techniek is echter de plakbandmethode (zie 3.4.).
- Huidafkrabsels kunnen ook endoparasieten in de huid aantonen, zoals larven van de nematoden *Pelodera*, *Uncinaria*, *Ancylostoma* of promastigotenstadia van *Leishmania*. Af en toe zijn ook *Dirofilaria immitis* te vinden. Verdere biomoleculaire differentiatie moet worden uitgevoerd ter bevestiging van de soorten.

Huidafkrabsels kunnen ook worden gebruikt om mijten bij **kleine gezelschapsdieren** te detecteren.

Diepe huidafkrabsels worden uitgevoerd voor het detecteren van folliculaire *Demodex*-mijten die diep in de haarfollikels leven. Daarvoor moeten kale plekken in de haargroeirichting worden afgekrabd met een lemmet of curette, vochtig gemaakt met minerale olie, tot er capillair bloed verschijnt. De huid moet voor of tijdens het afkrabben worden samengeknepen om extrusie van *Demodex*-mijten uit de haarfollikels te bevorderen.

Met het beoordelen van het aantal en de vitaliteit van de verschillende levensstadia kan de respons op de behandeling worden beoordeeld. Gezonde honden hebben vaak een laag aantal *Demodex*, maar klinisch aangetaste dieren hebben meestal veel mijten en heeft een directe diagnose een hoge sensitiviteit. Diepe afkrabsels kunnen echter ook fout-negatieve resultaten geven voor *Demodex*, vooral bij moeilijk af te krabben plekken (ogen, interdigitale ruimtes) en bij sommige rassen (bobtail, Schotse terriër, sharpei). In deze gevallen kan een trichogram (zie 3.5.) nuttiger zijn voor voldoende diagnostisch materiaal. Recent is aangetoond dat het gebruik van de plakbandmethode (zie 3.4.) en het samenknijpen van de huid een hoger diagnostisch succespercentage heeft dan diepe afkrabsels voor *Demodex*; deze procedure is ook minder pijnlijk voor honden en katten.

Bij **paarden** kunnen diepe huidafkrabsels worden gebruikt om zowel *Demodex* als stadia van nematoden op te sporen (*Pelodera*, *Strongyloides* en *Habronema*).

Oppervlakkige huidafkrabsels

Bij **honden** kunnen voor de meer oppervlakkig aanwezige, kortlijvige *Demodex*-mijten oppervlakkige huidafkrabsels worden uitgevoerd, als alternatief voor de plakbandmethode (zie 3.4.) en een trichogram (zie 3.5.).

Bij **paarden** kunnen oppervlakkige huidafkrabsels worden gebruikt voor de identificatie van *Chorioptes*-, *Psoroptes*- en *Sarcoptes*-mijten, larven van *Trombicula* en voedermijten (*Pediculoides ventricosus*, *Pyemotes tritici*, *Acarus farinae*).

Oppervlakkige huidafkrabsels (evenals de plakbandmethode) zijn ook nuttig om luizen aan te tonen.

Verwerking van huidmateriaal met een kaliumhydroxideoplossing (KOH) of lactofenol

Het afgekrabde materiaal kan worden gemengd met 10% KOH-oplossing of lactofenol gedurende ten minste 2-3 uur, vaak een hele nacht, bij kamertemperatuur. eventueel kan de KOH-oplossing worden opgewarmd, waardoor de procedure korter wordt. De KOH-oplossing en lactofenol macereren de keratinestoffen van de huid waardoor de chitineuze exoskeletten van geleedpotigen intact blijven. De suspensie kan worden onderzocht in een petrischaaltje of voorwerpglasje onder een (stereo)microscop bij 40-100x vergroting en nauwkeurige identificatie kan plaatsvinden op een glaasje. Potentieel te identificeren geleedpotigen zijn: bijtende en zuigende luizen, mijten (*Cheyletiella*, *Trombicula*, *Demodex*, *Sarcoptes*, *Notoedres*).

3.4. Plakbandmethode

Een directe impressietechniek (ook acetaattape-impressie methode genoemd) maakt gebruik van transparante plakband (ongeveer 1 cm breed en 4 cm lang) om debris van het oppervlak van de huid en de vacht te verzamelen, zoals beschreven in 1.2.12. De kleefzijde van de plakband wordt meerdere malen op de huid gedrukt. Vervolgens wordt deze (met de kleefzijde naar beneden) op een glaasje gedrukt. De plakband dient als dekglasje (vergroting: 40/100x).

Meestal worden verschillende monsters genomen op verschillende delen van de huid. Deze techniek is vooral nuttig voor *Cheyletiella*- en kortlijvige *Demodex*-mijten omdat een groter oppervlak snel kan worden bemonsterd.

Bij **paarden** kan de plakbandmethode worden gebruikt om *Chorioptes equi*, *Dermanyssus gallinae* en luizen op te sporen. Voor *Demodex*-mijten in haarzakjes kan de plakbandmethode worden gebruikt als alternatief voor diepe huidafkrabsels, met samenknijpen van de huid, waarna de plakband op een voorwerpglasje wordt beoordeeld.

3.5. Trichogram

Een trichogram is het microscopische onderzoek van een plukje haar. Positieve monsters kunnen huidafkrabsels vervangen op plekken die moeilijk af te krabben zijn, zoals de oogleden, de perioculaire zone, de snuit of de poten, of wanneer de lesies zeer pijnlijk zijn. Met een pincet worden haartjes krachtig in de haargroeirichting uitgetrokken. Indien mogelijk wordt de huid voor en tijdens de monsterneming samengeknepen. Ten minste 40 (idealiter 50-100) haren worden op een voorwerpglasje geplaatst met minerale olie en beoordeeld met kleine vergroting. Bij een vermoedelijke *Demodex*-infectie wordt begonnen met een trichogram: als er mijten vastzitten aan de haartjes, is het niet meer nodig om een huidafkrabsel uit te voeren.

3.6. Detectie van mijten in oorsmeer

Het verzamelen van oorsmeer bij **honden en katten** levert vaak uitstekende resultaten op bij dieren met *Otodectes cynotis*. Oormijten worden vaak gezien bij otoscopisch onderzoek met de kenmerkende overvloedige, donkerbruine debris. Dit kan worden verzameld met een wattenstaafje (indien wasachtig) of curette (indien gedroogd en korstig) en microscopisch worden beoordeeld na verkleining met een scalpelmesje en menging met minerale olie.

Dezelfde methode kan worden gebruikt om *Psoroptes cuniculi* in **konijnen** oren te detecteren. Vanwege de hoeveelheid debris is kaliumhydroxide (KOH) of lactofenol nodig om in het monster de mijten los te weken.

3.7. Biomoleculaire technieken

Zoals bij endoparasieten, kunnen in gevallen waar door de morfologie van de geleedpotigen identificatie lastig is, DNA-technieken worden toegepast (zie punt 4.5). De levende geleedpotigen worden dan bewaard in 70% alcohol of ingevroren.

4. DIVERSEN

4.1. Bloeduitstrijkje

4.1.1. Algemene informatie

Verse uitstrijkjes van bloedmonsters, verzameld met een antistollingsmiddel, kunnen worden gebruikt om een aantal parasitaire infecties te diagnosticeren. Hoewel er zelden parasieten aanwezig zijn in het bloed, vooral bij chronische infecties, kan een bloeduitstrijkje een makkelijke, snelle en goedkope diagnostische methode zijn.

Benodigde materialen:

- twee glaasjes, schoongemaakt met alcohol
- bloedmonster in een antistollingsmiddel

Procedure:

1. Breng een kleine druppel bloed aan op het uiteinde van een voorwerpglaasje.
2. Plaats het uiteinde van het andere glaasje op het eerste zodat het korte uiteinde van het glaasje zich net onder de druppel bloed bevindt.
3. Houd het tweede glaasje onder een hoek van 30°.
4. Beweeg het tweede glaasje zodat de rand net de druppel bloed raakt; door de capillaire werking zal een dunne lijn bloed zich langs de rand van het glaasje verspreiden.
5. Sleep het uitstrijkglaasje snel in één vloeiende beweging over de volledige lengte van het monsterglaasje (het uitstrijkje moet eindigen in een “vlam” vlak voor de rand).
6. Aan de lucht drogen en kleuren (Diff Quick).

Aan de lucht gedroogde glaasjes worden 5-10 minuten gefixeerd in methanol en gekleurd met Giemsa, Diff-Quick, Hemocolor of andere in de handel verkrijgbare kant-en-klare oplossingen om protozoa te herkennen. Let op: gekleurde artefacten van slecht bewaarde kleuroplossingen kunnen leiden tot fout-positieve resultaten.

4.1.2. Pathogenen waarneembaar in bloeduitstrijkjes

Piroplasma

De protozoa bevinden zich in de rode bloedcellen. Perifeer capillair bloed uit de oorschelp of staartpunt, of een buffycoatpreparaat (zie 4.2.), kunnen hogere aantallen geparasiteerde cellen opleveren waardoor een snelle diagnose van de acute ziekte mogelijk is als een ziek dier wordt aangeboden. In chronische gevallen is de parasitemie gewoonlijk laag. Op basis van de grootte van de merozoïeten in de rode bloedcellen kunnen grote (>3 µm) en kleine (<3 µm) soorten *Babesia* of *Theileria* onderscheiden worden (zie tabel 5), maar een moleculaire methode is nodig voor een betrouwbare differentiatie aangezien grote *Babesia*-soorten er kunnen uitzien als atypische kleine vormen. Verschillende *Babesia*-soorten kunnen van elkaar onderscheiden worden op basis van het aantal merozoïeten, de hoek ertussen en de positie in de rode bloedcel (zie tabel 5). De anamnese (endemische gebieden bezocht, tekeninfestatie), klinische verschijnselen en verder onderzoek, zoals seroconversie en DNA-detectie (zie 4.5.), kunnen de diagnose ondersteunen.

Sommige landen hebben nationale eisen voor de invoer van paarden en het testen op equine piroplasmose.

Tabel 5: Diagnostische kenmerken voor de morfometrische identificatie van piroplasma-agentia bij honden, katten en paarden.

Zie voor meer informatie over pathogeniciteit, vectoren en voorkomen Richtlijn 5 van ESCCAP: Bestrijding van door vectoren overgedragen aandoeningen bij hond en kat.

Piroplasma bij honden			
	Grootte (merozoïeten)	Positie in de erythrocyt	Hoek/andere
<i>Babesia canis</i>	groot	centraal	scherpe hoek
<i>B. vogeli</i>	groot	centraal	scherpe hoek
<i>B. rossi</i>	groot	centraal	scherpe hoek
<i>B. gibsoni</i> en <i>gibsoni</i> -achtig	klein	centraal	-
<i>B. conradae</i>	klein	centraal	-
<i>B. vulpes</i> *	klein	centraal	-
Piroplasma bij katten			
<i>B. felis</i>	klein	centraal	Maltezer kruis
<i>Babesia</i> spp.	groot	centraal	-
<i>Cytauxzoon</i> spp.	klein	variabel	staaf- of komvormig
Piroplasma bij paarden			
<i>B. caballi</i>	groot	centraal	scherpe hoek
<i>Theileria equi</i>	klein	variabel	pleomorf (1-4 merozoïeten, inclusief Maltezer kruis)

* *Babesia vulpes* omvat de eerder gebruikte termen *Theileria/Babesia annae* en *Babesia microti*-achtig.

Hepatozoon spp.

Hepatozoon spp. zijn door vectoren overgedragen (door orale inname van geïnfecteerde teken) protozoa. In Europese regio's met een warm klimaat is *Hepatozoon canis* een veel voorkomende parasiet bij hondachtigen, terwijl *Hepatozoon americanum* voorkomt in de VS. *Hepatozoon felis* en *H. silvestris* zijn zeldzaam bij de kat. In zeldzame gevallen kan *H. canis* ook worden aangetroffen bij katten. Gamonten worden voornamelijk gezien in neutrofiele granulocyten als typische baksteenvormige structuren in bloeduitstrijkjes.

Larven (microfilariae) van *Dirofilaria* en andere filaria nematoden

Microfilariae van pathogene (*D. immitis*, *D. repens*) en apathogene filaria nematoden kunnen worden gezien in bloeduitstrijkjes en worden verder gedifferentieerd (zie 4.4.).

Rickettsiae (Anaplasmataceae)

Ehrlichia spp. zijn door vectoren overgedragen, Gram-negatieve, obligaat intracellulaire bacteriën. In Europa is *Ehrlichia canis* het etiologische agens van canine monocytair ehrlichiose (CME). Deze infecteert vooral monocytën waarbij de typische, maar zelden waargenomen microkolonies (morulae) zich ontwikkelen. *Candidatus Neoehrlichia mikurensis* is het etiologische agens van neoehrlichiose bij honden. Verder zijn *Ehrlichia* spp. (*E. chaffeensis*, *E. ewingii*) endemisch in de tropen en zelden gevonden in Europa. *Ehrlichia canis* of een nauw verwante soort is beschreven bij katten, maar heeft geen veterinaire relevantie.

Anaplasma spp. zijn door vectoren overgedragen, Gram-negatieve, obligaat intracellulaire bacteriën. In Europa zijn *A. platys* gemeld bij gedomesticeerde honden en *A. phagocytophilum* bij o.a. honden, katten, paarden. Ze infecteren respectievelijk bloedplaatjes (*A. platys*) of overwegend neutrofiële granulocyten (*A. phagocytophilum*) en ontwikkelen zich tot typische microkolonies (morulae) die in het acute stadium worden gezien met de lichtmicroscop.

Mycoplasma spp. (syn. *Haemobartonella* spp.) zijn kleine Gram-negatieve bacteriën die zich hechten aan het oppervlak van rode bloedcellen, bv. *Mycoplasma haemocanis* en *M. haemofelis*, bij respectievelijk hond en kat. Andere, minder pathogene soorten zijn beschreven, voornamelijk bij katten: *Candidatus Mycoplasma haemominutum* en *Candidatus Mycoplasma turicensis*, maar ook bij honden: *Candidatus Mycoplasma haematoparvum*. DNA-detectiemethoden ondersteunen de detectie en maken differentiatie mogelijk.

4.2. Buffycoat methode

Hiervoor wordt een microhematocrietbuisje gevuld met EDTA-bloed, aan één kant afgesloten en 5 minuten gecentrifugeerd. Trypanosomen en microfilariae hopen zich op in de zone tussen de buffy coat en het plasma. Leukocyten zijn geconcentreerd voor *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* spp. of *Hepatozoon* spp. Aangezien *Babesia* spp. reticulocyten infecteert in plaats van rijpe rode bloedcellen, is de detectie ervan in de buffy coat gevoeliger dan in volbloed. Voor microscopisch onderzoek wordt het hematocrietbuisje met een kleine glassnijder ingekrast ter hoogte van de buffy coat en gebroken zodat de buffycoatlaag en het plasma kunnen worden overgebracht op een glaasje. Er wordt een druppel fysiologische zoutoplossing toegevoegd of er wordt gekleurd uitstrijkje om de parasieten te vinden.

4.3. Dunne naald aspiratie

4.3.1. Algemene informatie

Sommige protozoa en door vectoren overgedragen pathogenen zijn obligaat intracellulaire agentia van lymfocyten/monocyten/macrofagen. Aspiratie van hematopoëtische weefsels (bv. lymfeklieren, beenmerg, milt) kan dus belangrijk zijn voor zowel de morfologische identificatie ervan door uitstrijkjes en/of voor biomoleculair onderzoek (zie 4.5.). Dunne naald aspiraten uit inwendige organen, bv. de lever, kunnen ook worden gebruikt voor de diagnose van infecties met metacestoden van *Echinococcus* spp. (alveolaire en cystische echinokokkose). Als de milt hiervoor wordt gebruikt, moet het aspiraats zonder negatieve druk worden uitgevoerd om bloedingen te voorkomen.

Benodigde materialen:

- spuit 15 ml;
- naald diktemaat 22-20;
- objectglaasjes.

Procedure:

1. Steek de naald in het weefsel en creëer een negatieve druk in de spuit door de zuiger terug te trekken tot 5-10 ml.
2. Handhaaf deze negatieve druk, richt de naald in verschillende richtingen zonder de punt van de naald uit het weefsel te verwijderen.
3. Laat de zuiger van de spuit voorzichtig los en verwijder de naald uit het weefsel (verwijder de naald niet uit het weefsel zonder eerst de zuiger los te laten, aangezien anders het verzamelde materiaal in de spuit wordt opgezogen).
4. Maak de spuit los van de naald en vul deze met lucht.
5. Sluit de spuit weer aan op de naald en gebruik de lucht om het monster uit de naald te blazen op een of meerdere objectglaasjes.
6. Strijk uit, droog en kleur zoals bij bloeditstrijkjes (zie 4.1.).

4.3.2. Pathogenen waarneembaar in dunne naald aspiraten

Leishmania infantum

Lymfeklieraspiraten, vooral van dieren met lymfadenopathie, zijn het handigst, terwijl beenmerg- en miltmonsters invasiever zijn, maar geïndiceerd kunnen zijn voor geïnfecteerde, klinisch gezonde honden.

Amastigoten, met de typische 'T'-vormige nucleus/kinetoplast structuur, zijn zichtbaar in het cytoplasma van monocyt/macrofagen en ook vrijliggend in het uitgesmeerde materiaal.

In gevallen waarbij kreupelheid aanwezig is, kunnen amastigoten worden waargenomen in dunne naald aspiraten van synoviaal vocht.

Aspiraten van huidlesies zijn ook goed bruikbaar om een amastigoteninfectie in macrofagen van *Leishmania* op te sporen door cytologie.

Ehrlichia canis

De sensitiviteit van microscopische detectie kan hoger zijn bij dunne naald aspiraten van lymfeklieren, beenmerg of milt of in buffycoat preparaten in vergelijking met bloeditstrijkjes, maar momenteel is DNA-detectie met PCR de aanbevolen diagnostische methode.

4.4. Detectie en identificatie van microfilariae

4.4.1. Algemene informatie

De diagnose van een filaria nematodeninfectie bij gezelschapsdieren kan worden uitgevoerd door de isolatie en morfologische identificatie van circulerende microfilariae. Bloedmonsters worden na concentratie onderzocht met de Knott test of met een filtermethode (commerciële testkit: Difil-Test®). Bloeditstrijkjes zijn ongeschikt voor soort identificatie en hebben een zeer lage sensitiviteit.

Let op: het aantal circulerende microfilariae correleert niet noodzakelijk met het aantal volwassen wormen. Sterk microfilareemische honden kunnen daarom weinig volwassen wormen hebben. Het tijdstip van bloedafname kan ook de sensitiviteit voor het opsporen van microfilariae beïnvloeden: voor zowel *D. repens* als *D. immitis* is een trend van sterkere microfilaremie tijdens de nachtelijke uren beschreven.

Microfilariae kunnen worden onderscheiden door hun afmetingen, met zure fosfatase kleuring of, bij twijfelgevallen, met biomoleculaire methoden die de diagnose van soorten mogelijk maken door DNA-isolatie van volbloed en concentratie van microfilariae door centrifugatie. Er zijn enkele beperkingen voor de morfologische identificatie van circulerende microfilariae. Dit zijn onder andere de invloed van verschillende fixatietechnieken op de grootte van de larven, slechte kleuring met de zuurvaste techniek van larven in een monster, en co-infecties met een onevenredig aantal larven van verschillende soorten. Soortspecifieke (real-time) PCR heeft de voorkeur voor soorten differentiatie.

Hoewel een hartworminfectie (*D. immitis*) betrouwbaar kan worden gediagnosticeerd met serologie, wordt toch altijd geadviseerd om te testen op circulerende microfilariae.

Bij katten die niet microfilaremisch of negatief zijn bij antigeendetectie, maar een klinisch beeld vertonen dat overeenkomt met dirofilariose, is antilichaamdetectie een alternatief om de infectie aan te tonen.

4.4.2. Knott test

Deze methode concentreert de aanwezige microfilaria in 1 ml EDTA-bloed door centrifugatie. Deze worden vervolgens gekleurd met methyleenblauw.

Er wordt 1 ml EDTA-bloed verdund in 9 ml formaline 2% en gedurende enkele minuten geschud. Daarna wordt er 5 minuten gecentrifugeerd op 390 x g. Het supernatant wordt verwijderd en er wordt één druppel methyleenblauw 1% toegevoegd aan het sediment voor morfometrische analyses of onderzocht op zure fosfatase-activiteit, hoewel de gebruikelijke identificatieprocedure voor microfilariae momenteel biomoleculair is (zie 4.4.1.). Bij 40x vergroting wordt gezocht naar larven en bij 100x vergroting voor de morfologische kenmerken. Voor maximale sensitiviteit moet het hele sediment worden bekeken.

4.4.3. Aangepaste Knott test

Levende microfilariae kunnen sneller op beweeglijkheid worden gedetecteerd met de aangepaste Knott test. Hiervoor worden vier druppels saponine 2%-oplossing en 5 ml aqua dest toegevoegd aan 1 ml EDTA-bloed om de rode bloedcellen te vernietigen. De suspensie wordt microscopisch onderzocht, zoals hierboven. De beweeglijke levende larven worden gemakkelijk gezien (40x vergroting).

4.4.4. Filtratiemethode (Difil-Test®)

Deze commerciële kit concentreert microfilariae uit 1 ml EDTA-bloed op een filter met een oppervlak zo groot als een dekglasje. Met deze techniek zijn de microfilariae doorgaans recht in plaats van een gekrulde of gegolfde vorm.

De kit bevat een lysis oplossing, kleurstof, filters en een cartridge. Kort samengevat ziet de procedure er als volgt uit:

- De filter wordt op de bodem van de filtercartridge geplaatst en de cartridge wordt bevestigd.
- Er wordt 1 ml bloed toegevoegd aan 9 ml lysis oplossing in een grote spuit en gemengd. De gehemolyseerde bloedoplossing wordt door de filter gedrukt door deze te bevestigen aan de opening van de filtercartridge.
- De filter wordt gespoeld door een gelijk volume water door de opening op de filtercartridge te drukken.
- de filtercartridge wordt geopend, de filter verwijderd en op een objectglasje geplaatst.
- Op de filter wordt een druppel van de bijgeleverde kleurstof aangebracht.
- Na plaatsing van een dekglasje over de filter om de kleurstof te verspreiden, kan het monster bekeken worden.

4.4.5. Zure fosfatase kleuring

Er zijn verschillende onderscheidende kenmerken die de microfilariae van *D. immitis* onderscheiden van *D. repens* (en van apathogene filaria nematoden). Dit is vooral belangrijk in gebieden waar zowel *D. immitis* als *D. repens* aanwezig zijn (zie Richtlijn 5 van ESCCAP: Bestrijding van door vectoren overgedragen aandoeningen bij hond en kat).

De microfilariae van verschillende filaria nematoden kunnen worden onderscheiden door de patronen van de zure fosfatasekleuring (zie tabel 6):

- microfilariae van *D. immitis* vertonen twee plekken (excretoire en anale poriën);
- microfilariae van *D. repens* hebben slechts één plek (anale porie);
- microfilariae van *Acanthocheilonema dracunculoides* vertonen drie gebieden van enzymatische activiteit (anale porie, intern lichaam, excretoire porie); en
- microfilariae van *A. reconditum* vertonen een diffuus lichtrood patroon.

Er zijn commerciële kits beschikbaar die in een laboratorium kunnen worden uitgevoerd. De kleuringsmethodes worden echter geleidelijk vervangen door DNA-isolatie van geconcentreerde microfilariae.

4.4.6. Metingen microfilariae

Als alternatief kunnen metingen van microfilariae helpen om ze te onderscheiden: hiervoor moet de gemiddelde lengte gebaseerd zijn op de grootte van 10 larven (zie ook Richtlijn 5 van ESCCAP: Bestrijding van door vectoren overgedragen aandoeningen bij hond en kat). Let op: de voorbereiding (met name de fixatietechniek) kan de lengte en kenmerken van de microfilariae aanzienlijk wijzigen.

Tabel 6: Morfologische differentiatie van microfilariae¹ volgens lengte, breedte en vorm

Soort	Lengte (μ)	Breedte (μ)	Kenmerken
<i>Dirofilaria immitis</i>	301,77 ± 6,29 290-330	5-7	Geen schede, puntige kop, rechte staart met een puntig uiteinde. APh-S: twee actieve plekken rond de anale en de excretoire poriën.
<i>D. repens</i>	369,44 ± 10,76 300-370	6-8	Geen schede, stompe kop, scherpe draadvormige staart, vaak eindigend als een parapluhandvat. APh-S: één plek rond de anale porie.
<i>Acanthocheilonema reconditum</i>	264,83 ± 5,47 260-283	4	Geen schede, stompe kop met een prominente kophaak, staartknop geknikt en gebogen. APh-S: activiteit in het hele lichaam.
<i>A. dracunculoides</i>	259,43 ± 6,69 190-247	4.6.5	Schede, stompe kop, scherp en verlengd staartuiteinde. APh-S: drie plekken met een extra plek in het middellijf.

¹ Microfilariae (n=10) gemeten na concentratie met de test van Knott; bij gebruik van de Difil®-test zijn de lengtes korter. APh-S: zure fosfatasekleuring.

4.5. Biomoleculaire detectie- en differentiatiemethoden: polymerasekettingreactie (PCR) en de loop-mediated isothermal amplification (LAMP)

4.5.1. Algemene informatie

De polymerasekettingreactie (PCR) is een populaire en krachtige laboratoriummethode voor de diagnose van vele aandoeningen. Ze is specifiek en afhankelijk van het testsubstraat en infectiestadium is ze ook zeer gevoelig en kan ze helpen bij het diagnosticeren van actieve infecties bij verdachte klinische symptomen. Het is geïndiceerd voor pathogenen die door vectoren worden overgedragen en parasieten die gevoelige detectie en/of differentiatie vereisen buiten het bereik van de morfologie.

Als PCR's worden gebruikt voor diagnostische en niet voor differentiatie doeleinden, zal de sensitiviteit onder andere afhangen van het kopienummer van het doelgen.

PCR wordt alleenuitgevoerd in gespecialiseerde laboratoria. Nauwkeurige resultaten hangen af van een correcte verzameling, bewaring en verzending van monsters. Het gebruik van twee verschillende PCR-protocollen kan de sensitiviteit en specificiteit verhogen.

De algemene richtlijnen omvatten:

- Aangezien PCR zeer gevoelig is, moet kruisbesmetting van monsters worden vermeden. Monsters worden genomen met en bewaard in benodigdheden voor eenmalig gebruik.
- Monsters worden gekoeld (4 °C) bewaard en met ice packs verstuurd of continu bevroren bij -20 °C of kouder.
- Monsters moeten uiterlijk 3 dagen na afname in het laboratorium aankomen.

Loop-gemedieerde isothermische versterking (LAMP) is een techniek met één enkele buis voor de versterking van DNA. Door zijn eenvoud en lage kosten wordt LAMP gebruikt om bepaalde pathogenen op te sporen, hetzij als eenvoudige screeningtest in het veld, hetzij als een 'point of care'-test. Reagentia/kits zijn in de handel verkrijgbaar bij sommige bedrijven. In tegenstelling tot PCR-technologie, waarbij de reactie wordt uitgevoerd met een reeks wisselende temperatuurstappen of cycli, wordt isothermische versterking uitgevoerd bij een constante temperatuur en vereist ze geen thermische cyclus. LAMP is resistenter gebleken dan PCR voor remmers in complexe monsters zoals bloed of feces, mogelijk door het gebruik van een ander DNA-polymerase (meestal Bst – *Bacillus stearothermophilus* – DNA-polymerase in plaats van Taq-polymerase zoals bij PCR).

DNA-extractie kan worden uitgevoerd op vrijwel elk substraat, maar bloed- en weefselaspiraten zijn de meest geanalyseerde monsters.

Bloed:

Door vectoren overgedragen pathogenen zoals *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Bartonella* en *Babesia* kunnen worden gediagnosticeerd door hun DNA in perifeer bloed te identificeren. De PCR wordt ook gebruikt voor het opsporen en differentiëren van filarioïden soorten die microfilariae in het bloed produceren.

Er zijn veel PCR-protocollen voor bloed en elk laboratorium heeft zijn eigen voorschrift inclusief het anticoagulans om te gebruiken. De meeste geven de voorkeur aan EDTA, maar controleer dit met het gekozen laboratorium. Een maximum van 0,5-1 ml bloed volstaat meestal.

Weefselaspiraten:

Leishmania infantum en *Ehrlichia* spp. zijn aanwezig in lymfoïde organen en dunne naald aspiraten kunnen worden gebruikt voor PCR-testen. Voor *Leishmania* kunnen ook huidbiopten voor PCR worden genomen. Na aspiratie wordt het aspiraat op een filterpapier of wattenstaafje gebracht, dat vervolgens bij 4°C bewaard wordt in een steriel testbuisje. Het uitstrijken van materiaal op objectglaasjes blijkt minder gevoelig te zijn.

Parasieten:

Er kunnen gevallen zijn waarin moleculaire identificatie van individuele parasieten noodzakelijk is (wormen, geleedpotigen). Deze moeten worden bewaard in 70% ethanol en verzonden in afgesloten buisjes.

Feces:

Fecesmonsters worden ook direct gebruikt voor DNA-detectie van parasitaire stadia. Zo wordt bijvoorbeeld detectie van *Tritrichomonas foetus* in kattenfeces aanbevolen boven ophoping (zie 1.2.13.). Momenteel wordt copro-PCR gebruikt voor *E. multilocularis*, verschillende coccidiën (zoals *Toxoplasma/Hammondia*), *Cryptosporidium* en *Giardia*.

Voor parasieten die een onderscheid vereisen tussen soorten of genotypes wat morfologisch lastig is, bv. voor *Giardia duodenalis*, *Cryptosporidium* spp., oöcysten van *Toxoplasma/Hammondia*, ascariden- of taenia-eitjes, kan genotypering (in feces of geïsoleerde parasieten) nuttig zijn om zoönotische soorten of genotypes te bepalen. Bij een laag aantal parasitaire stadia of wanneer DNA-extractie moeilijk is (d.w.z. voor taenia- of ascariden-eitjes, zie hieronder), worden parasitaire stadia in feces idealiter eerder geconcentreerd. Zo kan de flotatie- en zeefmethode worden gebruikt (zie hieronder).

Flotatie en zeefmethode:

Wormeitjes kunnen uit fecesmonsters worden verzameld door de combinatie van flotatie in een zinkchloride oplossing, gevolgd door zeven met afnemende maaswijdte (21–200 µm). Daarom kunnen eitjes (met name taenia-eitjes en *Toxocara*-eitjes voor differentiatie) met behulp van de juiste maasgrootte op de laatste zeef worden geconcentreerd, zodat DNA-isolatie mogelijk is.

4.5.2. Specifieke informatie

In principe kunnen alle relevante parasieten worden gedetecteerd of bevestigd met PCR of andere genetische methoden. Verschillende apparaten met gelijktijdige automatische detectie van infectieuze agentia zijn reeds op de markt, maar nog niet gevalideerd in de diergeneeskunde.

In de literatuur kunnen, afhankelijk van de parasiet, de volgende opties beschikbaar zijn:

- specifieke primers voor verschillende parasietsoorten die alleen het beoogde geslacht en/of de soort repliceren;
- multiplex PCR combineert verschillende (specifieke) primers;
- traditionele PCR vs. realtime-PCR; en
- LAMP.

Wanneer een PCR-product wordt verkregen, kan het worden geïdentificeerd op basis van grootte ervan met gel-elektroforese (met of zonder voorafgaande fragmentatie door restrictie-enzymen), of door de nucleotidesequenties te vergelijken met beschikbare gensequenties.

Interpretatie:

Alle PCR-resultaten worden geïnterpreteerd als onderdelen van een combinatie van klinische criteria en andere diagnostische testen.

Enkele voorbeelden, zonder volledig te zijn:

Protozoa

Leishmania infantum

PCR kan zowel worden gebruikt voor de diagnose van infectie als voor de controle van honden die worden behandeld voor leishmaniose. Verschillende laboratoria bieden ook kwantitatieve PCR's aan (real-time enz.) die de hoeveelheid parasiet en de toename/afname kunnen bepalen. Deze zijn ook nuttig om de respons op de behandeling te controleren.

Hoewel weefselaspiraten (lymfeklieren, milt, beenmerg) of huidmonsters (huidlesies) de voorkeursmonsters zijn voor *L. infantum*, zullen laboratoria ook bloedanalyses uitvoeren. Er bestaat wat bezorgdheid over fout-negatieve resultaten (geen witte cellen in het bloed waarin de parasiet leeft) als gevolg van de lage sensitiviteit, hoewel de sensitiviteit van realtime-PCR's gericht op multicopy genen goed lijkt te zijn. Niet-invasieve monsters zoals conjunctivale uitstrijkjes worden nu ook geadviseerd. Daarvoor moeten beide ogen worden bemonsterd en de uitstrijkjes voldoende cellen bevatten.

Babesia

Het is aangetoond dat PCR een hogere sensitiviteit heeft dan onderzoek van een bloeduitstrijkje, vooral bij chronisch geïnfecteerde honden. Fout-negatieve resultaten kunnen echter niet volledig worden uitgesloten. Identificatie van soorten en subsoorten kan belangrijk zijn in termen van behandelingsopties (grote vs. kleine *Babesia*) en prognose.

Toxoplasma gondii

Toxoplasma gondii-oöcysten die worden uitgescheiden door katten kunnen morfologisch nauwelijks worden onderscheiden van apathogene *Hammondia hammondi*. Samen met serologisch onderzoek op specifieke antilichamen in het serum van katten en tussengastheren, kan PCR worden uitgevoerd op oöcysten of *T. gondii* weefselcysten in vlees. Bij honden en/of katten met neurologische aandoeningen die lijken op toxoplasmose kan PCR op cerebrospinaal vocht of kamerwater worden uitgevoerd.

Neospora caninum

Oöcysten van *N. caninum* worden gedurende zeer korte perioden en met lage dichtheid uitgescheiden in hondenfeces. Net als bij *T. gondii*/*H. hammondi* zijn de oöcysten van *N. caninum* nauwelijks te onderscheiden van *Hammondia heydorni* (voorkomend in feces van honden of vossen) en *T. gondii*/*H. hammondi* (in geval van coprofagie van kattenfeces). Daarom is een PCR-analyse geïndiceerd voor de identificatie ervan.

Bij klinisch verdachte honden zijn een serologisch onderzoek samen met spierbipten, liquor en/of cerebrospinaal vocht met PCR diagnostische opties.

Giardia

Klassieke testen voor *Giardia*-infecties zijn gewoonlijk niet soortspecifiek. Als ter verduidelijking van het zoönotische potentieel de assemblage moet worden bepaald, kunnen multilocus PCR en sequencing worden uitgevoerd.

Tritrichomonas

Een PCR, waarbij *T. foetus* in kattenfeces wordt onderscheiden van andere trichomonaden, overtreft een parasietenkweek (InPouch™, zie 1.2.13.) en de nadelen ervan (temperatuurgevoelig, tijd).

Bacteriën overgedragen door geleedpotige vectoren

Bartonella

Hoewel de gouden standaard voor de diagnose van bartonellose bloedcultuur is, kan dit tijdrovend en duur zijn. Het is ook mogelijk om *Bartonella*-DNA op te sporen in bloed, weefsel, cerebrospinaal vocht of glasvocht in het oog. Een combinatie van opkweken gevolgd door PCR-amplificatie resulteert in verhoogde sensitiviteit.

Ehrlichia/Anaplasma

Een positieve PCR bevestigt meestal de aanwezigheid van door teken overgedragen bacteriën. Een negatieve PCR sluit de aanwezigheid van een infectie echter niet uit.

Net als bij bloedcytologie lijkt de sensitiviteit voor *Ehrlichia*-PCR groter te zijn in aspiraten van de lymfeklieren, de milt, het beenmerg of in de buffy coat.

Wormen

Lintwormeieren

In *Echinococcus* endemische gebieden moet *Echinococcus* spp. worden onderscheiden van andere taenia-eitjes i.v.m. zoönotische overdracht. Eitjes kunnen worden geïsoleerd door flotatie, de plakbandtechniek op het perianale gebied of door flotatie en zeven van feces, uitgaande van biologische veiligheidsregels (apparatuur in gespecialiseerde laboratoria). PCR wordt uitgevoerd met specifieke primers, met multiplex PCR gericht op verschillende taeniasoorten, of door brede worm-PCR, gevolgd door sequencing.

Toxocara

Ongeveer een derde van de honden die positief zijn op *Toxocara*, scheidt *Toxocara cati* eitjes uit (na coprofagie). Deze kunnen onderscheiden worden van *T. canis* eitjes door metingen van de eitjes of, betrouwbaarder, door PCR.

Longwormen

Aelurostrongylus abstrusus is de meest voorkomende longworm bij katten. In sommige landen kunnen echter andere longwormen zoals *Troglostrongylus* spp. en *Oslerus rostratus* aanwezig zijn en is expertise vereist voor de morfologische differentiatie van L1. Als alternatief kan PCR worden uitgevoerd op L1 uit feces of door onderzoek van trachea-uitstrijkjes of bronchoalveolaire lavage (lagere sensitiviteit).

De L1 van de meest voorkomende longwormen bij honden, *A. vasorum* en *C. vulpis*, zijn morfologisch gemakkelijk te onderscheiden. In enkele gevallen kan het echter nuttig zijn om biomoleculaire methoden te gebruiken voor bevestiging.

Capillaria

Honden, katten en andere zoogdieren kunnen verschillende *Capillaria*-soorten hebben met verschillende levenscycli. Ze hebben niet allemaal een definitieve taxonomie. PCR kan helpen om de soort te identificeren.

Filaria nematoden

Soortspecifieke (real-time) PCR op EDTA-bloed is de voorkeursmethode voor soorten differentiatie van microfilariae (zie 4.4.1.), hoewel morfologische analyse en zure fosfatasekleuring nog gebruikt worden.

Afwijkende wormen

Wanneer afwijkende wormen morfologisch niet te onderscheiden zijn of worden geëxtraheerd uit histologisch gefixeerde monsters, dan kan PCR worden uitgevoerd, ook op histologische kleuring of huidafkrabsels.

Geleedpotigen

In gevallen waarin de morfologie van geleedpotigen lastig is, kunnen op DNA gebaseerde technieken worden toegepast.

Dermatofyten

Een in de handel verkrijgbare test omvat real-time-PCRs voor *Microsporum* spp., *M. canis* en *Trichophyton* spp. en voert deze met hoge sensitiviteit en specificiteit uit. Huidafkrabsels en/of haartjes worden verzameld en naar het laboratorium gestuurd. De resultaten zijn binnen enkele dagen bekend.

4.6. AANTONEN VAN DERMATOFYTEN

4.6.1. Algemene informatie

Dermatofytose wordt gediagnosticeerd door een combinatie van elkaar aanvullende testen, waaronder de Woodse lamp (alleen bij hond en kat), direct haaronderzoek om actieve infectie aan te tonen, een schimmelkweek ter identificatie van de betrokken schimmelsoorten en om de respons op de therapie te controleren, en soms huidbiopsie voor nodulaire of atypische presentaties. Het aantonen van dermatofyten met PCR is in Europa mogelijk bij hond en kat (zie 4.5.2.).

4.6.2. Direct haaronderzoek

Dermatofytose kan worden aangetoond door microscopisch onderzoek van haren. De monstername techniek en de deskundigheid van de onderzoeker hebben echter een sterke invloed op de sensitiviteit. Bovendien zijn fout-negatieve trichogrammen (zie 3.5.) mogelijk, ondanks optimale monstername en onderzoek. Daarom is alleen een positief trichogram zinvol. Kaliumhydroxide (KOH) of minerale olie met of zonder kleurstof (bv. lactofenol katoenblauw) kan worden gebruikt om schimmels beter te zien. Haren, geïnfecteerd met dermatofyten, vertonen meestal vergrote en gezwollen structuren met een ruw en onregelmatig oppervlak. Het haaroppervlak vertoont doorgaans clusters of ketens van schimmelsporen (arthroconidia) (2–4 µm voor *Microsporum canis*).

4.6.3. Onderzoek met Woodse lamp

Onderzoek van de vacht met een ultraviolette lamp (Woodse lamp) is een goede screeningsmethode voor dermatofytose bij hond en kat. Wanneer ze aan het uv-licht worden blootgesteld, lichten de haren met dermatofyten, zoals *M. canis*, groen op. Haren geïnfecteerd met andere dermatofytensoorten fluoresceren nooit en sommige topicale medicijnen kunnen fluorescentie maskeren. Negatieve resultaten na het onderzoek met een Woodse lamp sluiten dermatofytose dus niet uit. Fluorescentie wordt ook bevestigd door microscopisch onderzoek van haren (ook al is de herkenning van geïnfecteerde haartjes niet altijd gemakkelijk en kan een ervaren oog nodig zijn) (zie 4.6.2.).

4.6.4. Schimmelkweek

Een schimmelkweek blijft de meest betrouwbare methode voor het aantonen van dermatofytose bij hond en kat. Het monster kan bestaan uit huidafkrabsels, haarplukken (onder de Woodse lamp) of door de vacht te borstelen met een steriele tandenborstel of stofdoek. Verschillende media (zoals Sabouraud-platen) zijn geschikt voor schimmelkweken. Kolonies van dermatofytensoorten zoals *M. canis* kunnen zich in enkele dagen ontwikkelen. Dermatofytestestmedia (DTM) worden regelmatig gebruikt in de diergeneeskunde. Er is echter zeer weinig gekeken naar de prestaties van dergelijke media met monsters van dieren. Het gebruik van DTM alleen, zonder microscopische identificatie van macroconidia, wordt niet aanbevolen voor de diagnose van dermatofytose bij dieren. Idealiter worden monsters naar een laboratorium met veterinaire mycologie expertise gestuurd. In het laboratorium wordt een specifieke identificatie uitgevoerd door microscopisch onderzoek van de schimmelkolonies. Het aantal kolonies kan helpen om een onderscheid te maken tussen dragers en besmette dieren. Dragens zijn het gevolg van besmetting uit/via de omgeving en gaan meestal gepaard met een beperkt aantal dermatofytenkolonies in de kweek. Infectie leidt tot een enorme productie van schimmelsporen (arthroconidia) en gaat meestal gepaard met een zeer hoog aantal dermatofytenkolonies in de kweek.

BIJLAGE 1 – ACHTERGRONDINFORMATIE

ESCCAP (European Scientific Counsel Companion Animal Parasites) is een onafhankelijke, non-profit organisatie met als doel het ontwikkelen van richtlijnen op basis van actuele wetenschappelijke informatie om de juiste behandeling en preventie van parasieten bij gezelschapsdieren te bevorderen. Met juiste adviezen kan het ziekterisico en de overdracht van parasieten tussen dier en mens geminimaliseerd worden. ESCCAP streeft naar een Europa waar parasieten niet langer een probleem vormen voor de gezondheid en het welzijn van huisdieren en mensen.

Er is een grote verscheidenheid aan parasieten en hun relatieve belang in Europa. De ESCCAP-richtlijnen geven een overzicht met de nadruk op de belangrijkste verschillen tussen parasieten in de verschillende delen van Europa, met waar nodig specifieke aanbevelingen over de te nemen bestrijdingsmaatregelen.

ESCCAP is van mening dat:

- Dierenartsen en huisdiereigenaren maatregelen moeten nemen om huisdieren te beschermen tegen parasitaire infestaties.
- Dierenartsen en eigenaren dienen maatregelen te nemen om de huisdierpopulatie te beschermen tegen risico's die gepaard gaan met reizen en de gevolgen door veranderingen in lokale epidemiologische situaties door im- of export van niet-endemische parasieten.
- Dierenartsen, eigenaren en huisartsen moeten samenwerken om de risico's gerelateerd aan de overdracht van parasitaire zoönosen te verminderen.
- Dierenartsen moeten eigenaren informeren over de risico's van parasitaire infestaties en de maatregelen die kunnen worden genomen om deze risico's te minimaliseren.
- Dierenartsen moeten eigenaren over parasieten informeren en hoe ze verantwoord hiermee omgaan. Niet alleen voor de eigen gezondheid, maar ook die van andere huisdieren en mensen in hun omgeving
- De dierenarts dient, waar nodig, de juiste diagnostische testen te gebruiken om infestaties met parasieten aan te tonen om zo het beste advies te geven.

Om deze doelstellingen te bereiken, produceert het ESCCAP:

- Gedetailleerde richtlijnen voor dierenartsen en dierenarts-parasitologen.
- Vertalingen, korte versies, aanpassingen en samenvattingen van richtlijnen, afgestemd op de verschillende situaties in Europese landen en gebieden.

Alle versies van de richtlijnen zijn te vinden op www.esccap.org.

Disclaimer:

Er is uiterste zorgvuldigheid besteed aan de juistheid van de informatie in deze richtlijn op basis van kennis en ervaring van de auteurs. Auteurs en uitgever nemen echter geen verantwoording voor gevolgen door een verkeerde interpretatie van de verstrekte informatie, noch kunnen hieraan rechten worden ontleend. ESCCAP benadrukt dat nationale, regionale en lokale regelgeving altijd eerst in acht genomen moet worden alvorens adviezen van de ESCCAP op te volgen. Doseringen en indicaties moeten beschouwd worden als een richtlijn. De dierenarts dient de bijsluiter van lokaal geregistreerde middelen te raadplegen.

VERKLARENDE WOORDENLIJST

Sensitiviteit	Het percentage werkelijk-positieve monsters (beoordeeld met van een ‘gouden standaard’ test) of de kans dat een besmet dier door de test als positief wordt bevonden.
Sensitiviteit [%]	$\frac{\text{Werkelijk-positieve monsters}}{(\text{werkelijk-positieve monsters} + \text{fout-negatieve monsters})} \times 100.$
Specificiteit	Het percentage werkelijk-negatieve monsters (beoordeeld met een ‘gouden standaard’ test) of de kans dat een niet-geïnfecteerd dier door de test als negatief wordt bevonden.
Specificiteit [%]	$\frac{\text{Werkelijk-negatieve monsters}}{(\text{werkelijk-negatieve monsters} + \text{fout-positieve monsters})} \times 100.$
Directe detectiemethoden	De aanwezigheid van het pathogeen zelf opsporen, hetzij door visualisatie (bv. door microscopie), door detectie van genetisch materiaal (bv. PCR of LAMP) of door detectie van moleculen die specifiek zijn voor de parasiet (bv. antigeen, meestal samengesteld uit eiwitten in verschillende variaties).
Indirecte detectiemethoden	Serologische methoden die eerder contact met parasieten bepalen door detectie van specifieke antilichamen die zijn geïnduceerd door infectie. Aangezien antilichamen meestal enige tijd na de eerste infectie worden aangemaakt en aanwezig blijven na het verdwijnen van de parasiet, wijzen ze niet noodzakelijk op de aanwezigheid van actieve infecties. Antilichaamdetectie kan worden uitgevoerd met verschillende methoden zoals de Western blot-test, directe of indirecte immunofluorescentietesten, ELISA, ‘laterale flow’-assays enz. Er wordt gebruik gemaakt van gelabelde secundaire antilichamen. Veel van deze testen maken een kwantificering van antilichaamniveaus (titers) mogelijk, bijvoorbeeld voor follow-up onderzoek tijdens de duur van de infectie of behandeling.

AFKORTINGEN

CME	Canine monocytair ehrlichiose
DFA	Directe immunofluorescentietest
DTM	Dermatofytentestmedium
EIA	Enzymimmunoassay
ELISA	'Enzyme linked immunosorbent'-assay
EPG	Aantal eitjes per gram
FECRT	Test voor de afname van het aantal eitjes in de feces
ICT	Immunochromatografische dipsticktest
IFAT	Indirecte immunofluorescentie antilichaamtest
KOH	Kaliumhydroxideoplossing
L1	Eerste stadium larven
L3	Derde stadium larven
LAMP	Loop gemedieerde isothermische versterking
LPG	Larven per gram
MIFC	Merthiolaat-jodium formaldehyde concentratie
OPG	Aantal oöcysten per gram
PCR	polymerasekettingreactie
SAF	Natriumacetaat-azijnzuur-formaline
SAFC	Natriumacetaat-azijnzuurformaline concentratie

NUTTIGE LINKS

Hoe te meten met een microscoop:

www.youtube.com/watch?v=_CkcYrns-6I
www.youtube.com/watch?v=_eu9OrNM_wY
www.youtube.com/watch?v=GdRLPAo_j1Y
parasitology.cvm.ncsu.edu/vmp930/m_keys.html

De aangepaste McMaster-eitellingstechniek:

youtu.be/rkSGe-L4Sec

Afbeeldingen van parasitaire stadia zijn te vinden op de volgende pagina's:

www.parasite.org.au/para-site/contents/toc.html
www.ksvdl.org/resources/news/diagnostic_insights_for_technicians/august2019/common-intestinal-parasites-pt1.html
www.ncvetp.org/parasite-image-database.html
quizlet.com/64375340/parasites-in-veterinary-medicine-flash-cards/



ISBN: 978-1-913757-53-3

Stichting ESCCAP Benelux
Postbus 539, 1200 AM Hilversum

Tel: +31 (0)35 6255188
info@esccap.eu
www.esccap.eu



4

Parasitologische diagnostiek bij kat, hond en paard

ESCCAP Richtlijn 04 Eerste Druk – November 2022