Risicofactoren en rol van pathogenen bij acute infectieuze diarree in pups

****

**Begeleidster:** Drs. M.B.H.M. Duijvestijn

****

**Auteur:** Drs. M. Weij

****

**Algemene gegevens**

Titel onderzoek: Risicofactoren en rol van pathogenen bij acute infectieuze diarree in pups.

Student gegevens: Melissa Weij

Westmolenstraat 1

3111 BS Schiedam

E-mail: M.Weij@students.uu.nl

Begeleider gegevens: Drs. M.B.H.M. Duijvestijn

Afdeling Klinische Infectiologie, Departement I&I

Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde

Yalelaan 1, 3584 CL Utrecht (kamer 306)

E-mail: M.Duijvestijn@uu.nl

Plaats van uitvoering: Afdeling Klinische Infectiologie, Departement I&I, Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde

Aanvangsdatum: 15 juni 2012

Duur: 20 weken

**Bron:** Buldog 🡪 123RF**®** Labrador 🡪 Malou van Sanne v/d Meer

**Inhoudsopgave**

1. **Voorwoord**
2. **Abstract**
3. **Inleiding**
4. **Oorzaken van infectieuze diarree bij de hond**
   1. Viraal
      1. *Canine Parvo Virus*
      2. *Canine Corona Virus*
   2. Bacterieel
      1. *Salmonella spp.*
      2. *Campylobacter spp.*
      3. *Clostridium spp.*
      4. *Hemolytische E. coli*
   3. Parasitair
      1. *Toxocara Canis*
      2. *Giardia spp.*
      3. *Cystoisospora spp.*
      4. *Brillendoosjesgist*
5. **Onderzoeksvraag**
6. **Materiaal en Methode**
   1. Onderzoeksinleiding
   2. Onderzoeksontwerp
   3. Feces en gegevens verzameling
      1. *Opzet feces verzameling*
      2. *Enquêtes*
   4. Test methoden
      1. *Virologie*
      2. *Bacteriologie*
      3. *parasitologie*
   5. Statistische technieken
7. **Resultaten**
   1. Respondenten
   2. Karakteristiek van de klinische diarree
      1. *Aspecten van de diarree*
      2. *Duur van de diarree*
      3. *Antibiotica gift*
   3. Univariabele analyse
   4. Pathogenen resultaten
   5. Risicofactoren resultaten

**Blz. 5.**

**Blz. 6.**

**Blz. 7.**

**Blz. 9.**

Blz. 9.

*Blz. 9.*

*Blz. 10.*

Blz. 11.

*Blz. 11.*

*Blz. 12.*

*Blz. 13.*

*Blz. 14.*

Blz. 14.

*Blz. 15.*

*Blz. 15.*

*Blz. 16.*

*Blz. 17.*

**Blz. 17.**

**Blz. 17.**

Blz. 17.

Blz. 18.

Blz. 18.

*Blz. 18.*

*Blz. 19.*

Blz. 20.

*Blz. 20.*

*Blz. 21.*

*Blz. 21.*

Blz. 22.

**Blz. 23.**

Blz. 23.

Blz. 23.

*Blz. 25.*

*Blz. 25.*

*Blz. 25.*

Blz. 27.

Blz. 28.

Blz. 31.

1. **Discussie**
   1. Statistische analyse
      1. *Respondenten*
      2. *Enquête*
      3. *Karakteristiek van de klinische diarree*
      4. *Antibiotica gift*
      5. *Univariabele analyse*
      6. *Pathogenen resultaten*
      7. *Risicofactoren resultaten*
2. **Conclusie**
3. **Referenties**
4. **Bijlage**
   1. Enquêtes
      1. *Dierenarts*
      2. *Eigenaar*
   2. Telefonische follow-up vragen
      1. *Zieke pup*
      2. *Gezonde pup*
   3. Protocollen VMDC
      1. *Virologie*
      2. *Bacteriologie*
      3. *Parasitologie*
   4. Resultaten
      1. *Pathogenen* 
         1. *Blok 1: Kwantitatieve pathogeen resultaten*
         2. *Blok 2: CPV resultaten*
         3. *Blok 3: Pathogeen combinaties*
      2. *Risicofactoren*
         1. *Blok 4: Broodfokker resultaten*
         2. *Blok 5: Poep eten resultaten*

**Blz. 33.**

Blz. 33.

*Blz. 33.*

*Blz. 34.*

*Blz. 35.*

*Blz. 36.*

*Blz. 37.*

*Blz. 38.*

*Blz. 42.*

**Blz. 43.**

**Blz. 44.**

**Blz. 46.**

Blz. 46.

*Blz. 46.*

*Blz. 52.*

Blz. 60.

*Blz. 60.*

*Blz. 61.*

Blz. 62.

*Blz. 62.*

*Blz. 63.*

*Blz. 66.*

Blz. 69.

*Blz. 69.*

*Blz. 69.*

*Blz. 71.*

*Blz. 72.*

*Blz. 73.*

*Blz. 73.*

*Blz. 74.*

1. **Voorwoord**

Voor mijn onderzoekstage heb ik geparticipeerd in een lopend onderzoek op de afdeling Klinische Infectiologie, Departement Infectieziekten en Immunologie van de Faculteit Diergeneeskunde (Universiteit Utrecht). Het betreft een lopend onderzoek naar infectieuze oorzaken van acute diarree wat is begonnen in juli 2009 waarbij eind 2011 gestopt is met het veldonderzoek. Van 15 juni tot 14 oktober heb ik mij gericht op het verzamelen, invoeren organiseren en analyseren van het databestand. Ik wil mijn begeleidster Drs. M.B.H.M. Duijvestijn heel erg bedanken voor het vertrouwen dat ze in me had om mij me gang te laten gaan in deze stapels gegevens en haar netwerk. Ze heeft me heel goed geholpen om me vast te laten houden aan de rode draad van het onderzoek, ook al konden we het af en toe niet weerstaan om af te wijken naar interessante details. Gelukkig kan ik zeggen dat ik me nooit verdwaald heb gevoeld in de gegevens. Waar ik Mirjam persoonlijk voor wil bedanken is het kritisch redigeren van mijn teksten en nog belangrijker het begrip en de ondersteuning die ze me heeft geboden in vooral de laatste maand, wanneer de laatste loodjes het zwaarst werden en de privé omstandigheden verre van optimaal werden. “Bedankt!”

De moeilijkste stap in dit onderzoek was het analyseren van de gegevens en het ontdekken van interacties tussen pathogenen, en mogelijke risicofactoren. Hier wil ik weer graag Drs. M.B.H.M. Duijvestijn voor bedanken, omdat ze heeft meegedacht en me niet heeft laten verdwalen in interessante details, mij in contact heeft gebracht met mensen die mij konden helpen en het belangrijkste, mij scherp heeft gehouden bij het interpreteren van de resultaten. Tevens wil ik Marian Bos en Harm Ploeger bedanken voor de nuttige tips over hoe ik deze statistische verwerking het beste kon aanpakken, het helpen van correct interpreteren en opschrijven van de gevonden resultaten, mails die razend snel werden behandeld en dat ik altijd binnen mocht vallen met vragen.

Ook de sfeer onderling op de afdeling was erg toegankelijk, vriendelijk en motiverend. Ik heb er een hele leuke tijd gehad!

1. **Abstract**

Probleemstelling: Gekeken is naar de rol van risicofactoren en de rol van pathogenen bij infectieuze acute diarree bij pups, een probleem wat met een zekere regelmaat wordt gezien in de praktijk. In Nederland zijn geen of slechts sterk verouderde gegevens bekend omtrent prevalentie van acute infectieuze diarree bij pups en de verschillende (niet) infectieuze verwekkers die daarbij een rol spelen. Uit de literatuur is bekend dat er binnen landen grote verschillen kunnen bestaan in voorkomen van specifieke pathogenen. De gegevens uit andere landen zijn dus niet per definitie bruikbaar voor de situatie in Nederland. Om meer zicht op de infectieuze oorzaken van diarree bij pups te krijgen is deze studie opgezet. Hiervoor zijn uit de literatuur veel voorkomende pathogenen (*Canine Coronavirus, Canine Parvovirus, Campylobacter spp., Salmonella spp., Clostridium spp., Hemolytische E. coli, Toxocara Canis, Giardia spp., Cystoisospora spp., Brillendoosjesgist)* en risicofactoren (zoals voeding, contact met andere dieren, antibioticagebruik, leefomgeving)bij acute diarree in dit onderzoek gebruikt.

Onderzoeksvraag: “Wat is de rol van potentiële pathogenen bij acute diarree bij pups”. Met subvraag: “Zijn er correlaties tussen de verschillende pathogenen aantoonbaar, en zijn er risicofactoren die een rol spelen bij infectieuze acute diarree bij pups?”.

Materiaal en methode: Er zijn 169 feces monsters en bijbehorende enquêtes van dierenarts en eigenaar zijn verzameld tussen juli 2009 en november 2011, passend binnen de inclusie criteria van <1 jaar en <10 dagen diarree zonder in de maand voorafgaande braak/diarreeklachten te hebben gehad. Gezonde controle pups mochten deelnemen mits ze in de maand voorafgaand geen braak/diarreeklachten hadden gehad. Voor detecteren en kwantificeren van de virale pathogenen is gebruik gemaakt van real time PCR, voor het. De bacteriën zijn gekweekt op 1 of meer verschillende agar platen die voldoen aan de specifieke eisen van de betreffende bacteriën. Van alle monsters werd een grampreparaat gemaakt waarin de verhouding gram+/gram- en aanwezigheid van *Campylobacter*-achtige bacteriën en S*pirocheten* werd bekeken. Voor de parasitologie en gisten is gebruik gemaakt van de CSF methode met ZnSO4, waarna preparaten onder de microscoop bekeken zijn op wormeieren en (oö)cysten. Voor de verwerking van de data is gebruik gemaakt van SPSS.

Resultaten: In deze studie is naar voren gekomen dat, *Canine Parvovirus* (p=0.027) en *Canine Coronavirus* (p=0.001) significant aanwezig zijn bij pups met diarree. Tevens zijn zij in combinatie ook significant (p=0.001) naar voren gekomen bij de pups met diarree. De combinatie *Canine Parvovirus* en *Cystoisospora spp.* lijkt ook significant (p= 0.003) vaker voor te komen. Pups met diarree significant (p=0.001) vaker meerdere soorten pathogenen tegelijkertijd per fecesmonster, wat op kan lopen tot 5 soorten pathogenen per feces. *Campylobacter spp.* werd zowel bij de gezonde (22%) als de pups met diarree (58%) gevonden. Niet veel voorkomende pathogenen in deze studie waren *Salmonella spp. (0.5%), Hemolytische E. coli (5.3%), Toxocara canis (4.7%). Ook Giardia spp. (8.3%) en Brillendoosjesgisten (9.5%)* kwamen voor, maar waren niet gecorreleerd met het veroorzaken van diarree*.* Bij de risicofactoren is er een grotere kans, dat pups met diarree die bij een broodfokker vandaan komen gediagnosticeerd worden met *Canine Parvovirus* (p=0.002) en *Canine Coronavirus* (p=0.001). Opvallend in dit onderzoek is wel het hoge gebruik van antibiotica bij 37 (32.7%) pups van de diarree groep.

Conclusie: Deze veldstudie presenteert een uitgebreid overzicht van veel voorkomende pathogenen en risicofactoren bij pups (<1jaar) met acute (<10dagen) infectieuze diarree in Nederland. Waarbij in dit onderzoek *Canine Parvovirus* en *Canine Coronavirus* sterk naar voren komen bij de pathogenen ook in de combinatie met de afkomst van een pup bij een broodfokker. Voor *CPV* is dat in overeenstemming met de literatuur, voor *CCoV* zagen wij veel meer positieve dieren en ook een veel duidelijkere correlatie als verwekker van klinische klachten. Multivariabele analyse zou meer informatie kunnen bieden in dit onderzoek.

1. **Inleiding**

In 2009 is er op de afdeling Klinische Infectiologie een onderzoek opgestart naar risicofactoren en de rol van pathogenen bij acute diarree bij pups. Dit omdat er in Nederland geen of slechts sterk verouderde gegevens bekend zijn omtrent prevalentie van acute infectieuze diarree en de verschillende (niet) infectieuze verwekkers die daarbij een rol spelen. Uit vergelijking van de literatuur is bekend geworden, dat er binnen landen grote verschillen kunnen bestaan in voorkomen van specifieke pathogenen. De gegevens uit andere landen zijn dus niet per definitie bruikbaar voor de situatie in Nederland.

Dit in acht genomen zijn vergelijkbare studies over dit onderwerp uit verschillende landen gebruikt. In de meesten studies wordt vooral gekeken naar parasitaire, bacteriële of virale oorzaken die diarree kunnen veroorzaken. Hierbij wordt niet gekeken naar specifieke interacties die mogelijk kunnen voorkomen tussen de verschillende pathogenen. Vier literatuurstudies die het meest vergeleken kunnen worden met onze studie zijn gebruikt om de resultaten en conclusie kritisch te toetsen, 3 studies afkomstig uit Amerika (Hackett 2003, Sokolow 2005, Tupler 2012)en een uit United Kingdom (Stavisky 2011). Opvallende conclusies uit deze studies zijn dat, diarree meer geassocieerd kan worden met risicofactoren dan met specifieke pathogenen (Stavisky 2011), *Campylobacter* spp. en *C. perfringens* zowel in gezonde dieren als in dieren met diarree worden gevonden (Hackett 2003, Sokolow 2005, Stavisky 2011, Tupler 2012), de kans dat een hond met diarree ≥1 (entero)pathogenen heeft significant groter is dan bij controle dieren met normale feces (Tupler 2012), *CPV* en *CCoV* relatief weinig worden gevonden bij alle 4 de studies (waarbij doorgaans een ELISA-test is gebruikt, alleen Stavisky gebruikt PCR), en *Salmonella spp* niet vaak wordt gedetecteerd (Sokolow 2005, Tupler 2012). Uit eerdere studies (Batchelor 2008, Hackett 2003, Mochizuki 2001, Saevik 2012, Stavisky 2011) is wel naar voren gekomen dat jongere honden relatief vaker diarree krijgen vergeleken met volwassen honden, met een optimum bij de eerste levensmaand en na 12 weken (Overgaauw 2002). Dit kan gerelateerd worden aan immaturiteit van het afweerapparaat (Batchelor 2008, Overgaauw 2002), afnemende maternale immuniteit (Saevik 2012) en eerste kennismaking met diarreeverwekkers. Hierdoor kunnen in deze periode risicofactoren en pathogenen een grote bijdrage leveren aan het veroorzaken van infectieuze diarree bij pups.

Uit andere studies zijn er al enkele risicofactoren naar voren gekomen, te weten:

* Het verblijf in een kennel/asiel/dierenziekenhuis (Hackett 2003, Sokolow 2005, Stavisky 2011, Tupler 2012)
* Voeren van zelf gekookt dieet (Stavisky 2011)
* Consumeren van paarden feces, wat een mogelijke reductie geeft in kolonisatie van *E.Coli, Salmonella spp., C. difficile* (Stavisky 2011)

Onze studie is vernieuwend omdat dit onderzoek zich exclusief richt op pups (<1 jaar), en zich richt op de Nederlandse situatie. De uitgebreide vragenlijsten die in deze studie zijn gebruikt geven naast pathogeen informatie ook informatie over leefomstandigheden en mogelijke risicofactoren

Men zal doorgaans niet direct de dierenarts consulteren, aangezien acute diarree vaak van zelflimiterende aard is (Hubbard 2007, Saevik 2012, Stavisky 2011). Indien de pups met diarree toch op consult komen, wordt er vaak symptomatisch behandeld. Regelmatig wordt antibiotica voorgeschreven en wordt de veroorzaker vaak niet achterhaald. Dit is in de praktijk vaak afdoende, aangezien diarree vaak zelflimiterend is. Sommige agentia hebben echter een intensievere aanpak nodig, wanneer maatregelen ter preventie dienen te worden overwogen, of er sprake is van verspreiding naar andere dieren is diagnostiek naar specifieke pathogenen wel degelijk zinvol.

Nu actueel in het nieuws het antibioticabeleid bij veeartsen zowel als gezelschapsdierenartsen onder druk staat, is het van groter belang om de specifieke oorzaak te achterhalen, zodat onnodig gebruik van antibiotica voorkomen wordt.

Naast veterinair is er ook nog een maatschappelijk belang, een aantal van de infectieuze pathogenen zijn potentiële zoönosen (a.o. *Salmonella* spp., *Campylobacte*r spp., *Toxocara canis,* *Giardia* spp.) (Batchelor 2008, Hackett 2003). De dierenarts heeft een adviserende rol naar de eigenaar toe in het voorkomen/verkleinen van transmissie van dergelijke pathogenen van dier op mens.

Onderzoeksvragen in dit onderzoek zijn:

“Wat is de rol van potentieel pathogenen bij acute diarree bij pups”.

“Zijn er correlaties tussen de verschillende pathogenen aantoonbaar en zijn er risicofactoren die een rol spelen bij infectieuze acute diarree bij pups?”.

Uiteindelijk zal deze studie gezelschapsdierenartsen meer tools in handen geven om beslissingen omtrent diagnostiek, preventie, en behandeling te nemen bij pups met acute infectieuze diarree, waardoor pups sneller en beter worden behandeld, en wellicht doelgerichter en met minder gebruik van antibiotica.

**4. Oorzaken van infectieuze diarree bij de hond**

Wanneer een pup met diarreeklachten bij de dierenarts wordt aangeboden dient de dierenarts zowel infectieuze oorzaken te overwegen, als na te denken over niet-infectieuze oorzaken (voerveranderingen, stress, etc.). Binnen infectieuze oorzaken zijn er bacteriële, parasitaire, virale, gistinfecties mogelijk aan te wijzen.

De pathogenen die in dit veldonderzoek geassocieerd worden met diarree worden hieronder kort beschreven.

**4.1. Viraal**

***4.1.1. Canine Parvo Virus***

*CPV* behoort tot de familie van de *Parvoviridae*, welke bestaat uit 2 subfamilies: de *Parvovirinae* en de *Densovirinae* die voornamelijk voorkomen bij vertebraten en insecten. In het latijn staat parvus voor klein, deze naam is aan het virus gegeven omdat het een heel klein virus is met een diameter van 25 nm. Het is een naakt, enkelstrengs DNA virus wat omgeven wordt door een capside, die uit 3 structurele eiwitten bestaat (VP-1,VP-2, VP-3). De verschillende *parvovirussen* verschillen naast antigene determinanten ook in gastheerspectrum en zijn meestal vrij gastheerspecifiek (Decaro 2012, Goddard 2010). Verwante virussen zijn *Feline Panleukopenie virus (FPV), Mink Enteritis virus (MEV) en Raccoon Parvo virus (RPV)* (Decaro 2012). Virusreplicatie vindt plaats in de kern van sneldelende cellen en komt dus voornamelijk voor in het lymfoide weefsel, myocardcellen, precursorcellen van het beenmerg en meest voorkomend, in het darmweefsel. De voorkeursplaats in het darmweefsel is in de crypten van de dunne darm. Gevolg is dat de villi turnover wordt verstoord en collaps van de villi ontstaat met als gevolg sterk afgenomen absorptie capaciteit (Decaro 2012).

**Transmissie:**

Transmissie kan zowel via de feco-orale route als via de oro-nasale route, waarbij de pups in aanraking komen met braaksel dat is gecontamineerd met feces. De incubatietijd is variabel, gemiddeld tussen de 2-7 dagen en het dier blijft waarschijnlijk 3 tot 4 weken uitscheider na klinische of subklinische infectie. De mortaliteit kan oplopen tot 70% (Decaro 2012 Goddard 2010). Het *CPV* is zeer stabiel buiten de gastheer en is resistent voor lage of hoge PH, temperatuurswisselingen en de meeste desinfectantia (Decaro 2012).

**Diagnose:**

Een infectie met *CPV* kan leiden tot aspecifieke klinische verschijnselen, zoals anorexie, depressie, lethargie en koorts. Meer specifieke verschijnselen zijn dunne darm diarree, variërend van muceus tot hemorrhagisch, braken en mogelijk anemie (Decaro 2012). Door het verlies van grote hoeveelheden vloeistof en eiwitten ontstaat er al snel een situatie van dehydratie en hypovolemische shock. Eventueel kan ook invaginatie van de dunne darm worden waargenomen (Goddard 2010).

Serologisch is er een significante daling van leukocyten waar te nemen met een lymfopenie. Er zijn diverse sneltesten voor *CPV* op de markt, welke gebaseerd zijn op een immunochromatografie en ELISA principe. Degelijke testen zijn doorgaans goed bruikbaar, maar niet zo gevoelig. Een meer sensitieve detectie is door middel van real-time PCR van de feces.

**Therapie en preventie:**

Doorgaans worden dieren met een *CPV* infectie symptomatisch behandeld. Waarbij opheffen van de dehydratie, remmen van diarree en braken en eventueel voorkomen van secundaire bacteriële infecties op de voorgrond staat. Het is belangrijk pups met *CPV* enteritis te behandelen met breedspectrum bacteriocide antibiotica, aangezien een intacte intestinale barrière ontbreekt en vanwege ernstige leukopenie (Goddard 2010). Er is een specifiek antiviraal middel geregistreerd voor toepassing bij *CPV* infecties: Virbagen Omega®. Dit product bevat omega interferon en moet worden toegepast in de acute fase van de infectie.

Preventie begint met het drinken van colostrum van een gevaccineerde teef, waarna bij afnemende maternale immuniteit het dier gevaccineerd wordt met een MLV vaccin. Bij fokkers en kennels is het belangrijk om de infectiedruk laag te houden. Veel reinigings- en desinfecteermiddelen slagen er niet in *CPV* te inactiveren. Natrium hypochloriet is bij correct gebruik en verdunning effectief in het elimineren van *CPV* uit de omgeving (Decaro 2012, Goddard 2010 ). Daarnaast lijk kaliumperoxymonosulfaat (Virkons®) ook *parvocide* bij correct gebruik.

***4.1.2. Canine Corona Virus***

*CCoV* behoort tot de familie van de *Coronaviridae* uit de orde van *Nidovirales*. Het is een groot, positief, enkelstrengs RNA virus met een envelop. De virussen zijn voornamelijk verantwoordelijk voor ziekte in het maagdarmstelsel en de respiratietractus van zoogdieren en vogels. *CCoV* bestaat uit 2 subgroepen, waarbij subgroep 1 het meest verwant is aan *FCoV*. De envelop bestaat uit 3 structurele eiwitten (E,M,S), waarbij de S en M eiwitten een belangrijke rol spelen in het opwekken van de immuun respons (Pratelli 2006, Decaro 2008). De infectie is in het algemeen zelflimiterend en geeft vaak alleen een milde of asymptomatische vorm van enteritis (Buonavoglia 2006). De morbiditeit is erg hoog en de mortaliteit is laag, echter in combinatie met een infectie van *CPV, Canine Adenovirus en Canine Distemper virus* is een verhoging van de mortaliteit waargenomen (Pratelli 2006, Decaro 2008). Er is een variant van *CCoV type 2, het Pantroop Canine Corona Virus (PCCoV)* wat verantwoordelijk is voor acute systemische ziekteverschijnselen en sterfte (Zicola 2012).

De replicatie vindt plaats in de enterocyten aan de top van de villi, dit zorgt voor lysis van enterocyten, desquamatie en verkorting van de villi met als gevolg sterk afgenomen absorptie capaciteit (Pratelli 2006). Het *PCCV* virus kan daarnaast ook in organen repliceren (Zicola 2012).

**Transmissie:**

Het virus wordt overgedragen via de feco-orale route. De incubatietijd varieert van 3-7 dagen. De virusuitscheiding start gemiddeld 6-9 dagen post infectie en kan variërend tot 6 maanden infectie aanhouden. Hoewel *CCoV* zeer besmettelijk is heeft het een lage stabiliteit in de omgeving. Transmissie vindt dus voornamelijk van dier op dier plaats via zieke dieren of carrier dieren. Predisponerende factoren voor *CCoV* problemen zijn overbevolking, hoge infectiedruk, jonge leeftijd, slechte hygiëne en stress (Pratelli 2006).

**Diagnose:**

Pups die geïnfecteerd zijn met het *CCoV* ontwikkelen vaak een mild en asymptomatisch ziektebeeld. Dit kan bestaan uit koorts, depressie, verminderde eetlust maar ook anorexia, braken en diarree welke van muceus tot waterdun kan variëren en waarbij eventueel enkele dagen bloedbijmenging kan optreden. Dit kan gevolgd worden door dehydratatie en een lymfopenie (Pratelli 2006).

Serologisch kan een ELISA gebruikt worden waarmee de antilichamen tegen het M-eiwit worden gedetecteerd. Ook zijn er sneltesten gebaseerd op immunochromatografie op de markt, die aanwezigheid van het *CCoV* antigeen in de feces detecteren. Dergelijke testen zijn doorgaans niet erg gevoelig. Een meer sensitieve en specifieke methode is de reverse transcriptase PCR (Pratelli 2006, Decaro 2008).

**Therapie en preventie:**

Aangezien *CCoV* vaak in milde klinische klachten resulteert en van zelflimiterende aard is, zal therapie alleen symptomatisch zijn. In ernstigere gevallen (bij dehydratatie en bloederige diarree) zal vloeistof therapie en eventueel preventief antibiotica worden gegeven. Aangezien het *CCoV* zeer besmettelijk is, is het belangrijk geïnfecteerde dieren/uitscheiders te isoleren. Goede hygiëne is van groot belang zeker bij een uitbraak, daarentegen is het *CCoV* in de omgeving makkelijk inactief te maken met alle gangbare desinfectantia (Pratelli 2006).

**4.2. Bacterieel**

***4.2.1. Salmonella spp.***

*Salmonella* bestaat uit een grote variatie aan serotypen, waarbij 53 serotypen zijn gevonden bij de hond (Morse 1976)*. Salmonella* soorten zijn gram negatieve facultatief intracellulaire (Carter 2000) anaerobe motiele bacteriën van de familie *Enterobacteriaceae* (Marks 2011). Ze invaderen in de mucosa van het maagdarmstelsel waarbij ze de voorkeur geven aan het ileum, cecum en colon. In de mucosa invaderen ze macrofagen, die voor het induceren zorgen van toxine gemedieërde schade (Carter 2000). Ze kunnen ook door de mucosale barrière heen breken en onderliggende weefsels en organen invaderen, het produceren van endotoxinen is een belangrijke virulente factor waardoor septicaemia kan ontstaan met mogelijk de dood als gevolg (Carter 2000).

**Transmissie:**

Dit kan via zowel direct als indirect contact met dieren/mensen die besmet zijn met *Salmonella* (Carter 2000). De bron bij honden en katten ligt meestal in het eten van ongekookt vlees en beenderen, rauwe eieren (Marks 2011) of het jagen op ongedierte: knaagdieren, vogels en reptielen (Carter 2000). Daarnaast worden niet gezuiverd water, feces en braaksel van andere dieren/mensen ook als besmettingsbron gezien. *Salmonella* is tevens een zoönose, die vaker aangrijpt op jonge kinderen en ouderen (Carter 2000). Honden en katten die leiden aan immunosuppressie, een andere virale infectie hebben, jong zijn en waarbij de infectie druk hoog is zijn gevoeliger voor het ontwikkelen van een *Salmonella* infectie (Carter 2000, Morse 1976).

Bij dragerdieren kan *Salmonella* in de mesenteriale en jejunale lymfeknopen voorkomen (Morse 1976). Dergelijke dieren zijn niet infectieus, maar kunnen door triggers, waaronder stress (Morse 1976), weer infectieus worden wanneer de bacteriën de lymfeknopen verlaten en zo weer uitscheider kunnen worden. Triggers hiervoor zijn het ontstaan van immunosuppressie (stress, corticosteroïden gift), diabetes, antibioticabehandeling, dysbacteriosis, chirurgische ingrepen, andere infecties, ouderdom en uitdroging (Carter 2000).

**Diagnose**:

De incubatietijd van *Salmonella* infecties is gemiddeld 3 a 5 dagen maar kan in specifieke omstandigheden sneller verlopen (Marks 2011). Klinische symptomen van Salmonella infectie komen vaker voor in de vorm van acute enterocolitis, dit blijft vaak gelimiteerd tot alleen mucosale invasie, met waterige diarree met mogelijke bloedbijmenging, braken, koorts, lethargie, anorexia, abdominale pijn en dehydratatie (Carter 2000, Morse 1976).

Laboratorium diagnostiek kan op verschillende wijzen worden uitgevoerd. Een gangbare techniek is ophoping gedurende 24 uur in een bouillon verrijkt met Seleniet bij 37°C (Marks 2011). Vervolgens wordt het monster op een selectief medium bijvoorbeeld een gemodificeerde briljant groen agar uitgeplaat en op 37°C voor ten minste 18 uur geincubeerd. Verdachte kolonies dienen te worden bevestigd door gebruik te maken van specifieke agglutinerende sera of enzymatische reacties. Ook PCR diagnostiek is goed mogelijk, zowel op feces als op kolonies (Carter 2000, Marks 2011).

**Therapie en preventie:**

Alleen bij dieren met een sepsisbeeld of ernstige bloederige diarree is antibiotica geïndiceerd (Carter 2000). Bij een milde gastro-enteritis kan worden volstaan met een ondersteunende therapie.

Aangezien *Salmonella* een zoönose is, is het noodzakelijk om vooral bij jonge kinderen, ouderen, zwangeren en mensen met verminderde weerstand rekening te houden met een verhoogd infectie risico (Carter 2000, Marks 2011).

***4.2.2. Campylobacter spp.***

Tot heden zijn er van de genus *Campylobacter* 37 (sub)soorten ontdekt. De meest voor komende *Campylobacters* van huisdieren zijn *C. jejuni*, *C upsaliensis* en *C. helveticus (Marks 2011)*. Niet elke Campylobacter species wordt geassocieerd met diarree: *C. coli, C. concisus, C. fetus, C. gracilis, C. helveticus, C. jejuni, C. lari, C. mucosalis, C. showae, C. sputorum and C. upsaliensis* worden significant vaker gezien bij dieren met klinische diarree klachten (Chaban 2010).

Het zijn gram negatieve spiraalvormige, micro-aerofiele bacteriën van 0.2-0.8 µm breed en 0.5-5 µm lang. Afhankelijk van het soort kunnen ze aan 1 of beide polen een flagel bezitten (Butzler 2004, Griffiths 1990, Marks 2011). De motiliteit van de bacterie kan daarom ook gekarakteriseerd worden als een ‘kurkentrekkersbeweging’ (Griffiths 1990). De meesten *Campylobacter* soorten zijn thermofiel en vertonen een optimale groei tussen de 37 en 42°C. Ze zijn door hun micro-aerofiele karakter gevoelig voor de buitenlucht, een optimale zuurstofspanning voor groei is 5-10% zuurstof met verhoogde C02-spanning van ongeveer 10% (Griffiths 1990).

In veel onderzoeken komt naar voren dat *Campylobacter* zowel als commensaal als pathogeen kan voorkomen bij honden en katten (Burnens 1992, Marks 2011). *Campylobacter* koloniseert zich vooral in de dunne darmen. De bacteriën maken gebruik van een sterke adhesie aan de epitheelcellen, waarna ze entero- en cytotoxines gaan produceren die verantwoordelijk kunnen zijn voor de symptomen (Griffiths 1990). De infectie is vaak van zelf-limiterende aard. Er is een verhoogde prevalentie waargenomen bij honden <1 jaar en bij dieren in stressvolle omstandigheden (Griffiths 1990).

**Transmissie:**

Transmissie vindt plaats zowel via direct als indirect contact, de meest voorkomende besmettingen zijn voedsel-gerelateerd. Bronnen van besmetting voor honden zijn onder andere niet voldoende verhit voer, rauwe eieren, onbehandelde melk en het eten van feces van andere geïnfecteerde dieren (Burnens 1992, Griffiths 1990).

**Diagnose:**

*Campylobacter* kan zowel subklinische als klinische verschijnselen geven. De incubatie is gemiddeld 2-5 dagen (Butzler 2004). Klinische symptomen ontstaan vaker bij dieren <1 jaar (Burnens 1992, Marks 2011, Skirrow 1981) en bestaan voornamelijk uit brijige tot waterige diarree, waarbij slijm- en bloedbijmenging kan voorkomen. Een acute infectie wordt vaak vergezeld van algehele malaise, anorexie, misselijkheid, abdominale krampen, en koorts (Butzler 2004, Marks 2011). Door de zelf-limiterende aard duurt deze infectie gemiddeld tussen de 2-7 dagen (Griffiths 1990).

Om een *Campylobacter* infectie vast te stellen is het mogelijk een grampreparaat van een fecesuitstrijkje te maken en vervolgens te bekijken of er *Campylobacter like organisms* (CLO’s) te zien zijn (Marks 2011). Daarnaast worden de bacteriën gekweekt op selectieve media bijvoorbeeld de CCDA (Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar) bij 37 graden en 42°C onder micro-aerofiele omstandigheden (Griffiths 1990). Verdachte kolonies kunnen vervolgens weer door middel van gramkleuring bevestigd worden.

**Therapie en preventie:**

Gezien de zelf limiterende aard van *Campylobacteriose* is antibiotica therapie doorgaans niet noodzakelijk, ondersteunende therapie is doorgaans afdoende (Skirrow 1981). Bij infecties waarbij bloederige diarree met koorts wordt gezien is antibiotica wel aan te raden, waarbij 2 groepen worden geadviseerd, fluoroquinolonen en de macroliden. Helaas is echter al uit verscheidene onderzoeken de resistentie van enkele soorten aangetoond tegen verschillende fluoroquinolonen. Daarbij kan het gebruik van fluoroquinolonen bij jonge dieren een negatief effect hebben op de ontwikkeling van het kraakbeen (Marks 2011).

*Campylobacter* is in de omgeving fragiel en gevoelig voor verhitting, invriezing, uitdroging, zuur, licht en zuurstof spanning boven de 10% (zoals in buitenlucht) (Griffiths 1990, Skirrow 1981)

*Campylobacter* is een zoönose (Butzler 2004). Huisdieren, met name jonge honden en katten kunnen fungeren als besmettingsbron voor mensen (Griffiths 1990, Marks 2011). *Campylobacter* infecties worden bij mensen overigens maar zelden door contact met huisdieren verklaard. Transmissie via voedsel is humaan de voornaamste route van besmetting (Butzler 2004, Griffiths 1990).

***4.2.3.Clostridium spp.***

*Clostridium perfringens* is een gram positieve strikt anaerobe, spoorvormige, bacterie die is ingedeeld in 5 biotypen: At/m E. Deze types hebben 1 tot 4 toxische genen (α,β,ι,ε), die verschillende toxines kunnen produceren waaronder *C. perfringens* enterotoxine (CPE) (Marks 2011). *C. perfringens* behoort tot de natuurlijke intestinale darmflora van de hond en zal daarom in 80% van de gevallen gekweekt worden bij zowel honden met als zonder diarree. De rol van *CPE* is enigszins onduidelijk in *C. perfringens* geassocieerde diarree, omdat deze ook in 5-14% van de honden gevonden wordt zonder diarree (Marks 2011, Tupler 2012). Wel lijkt er meer overeenkomst te zitten in *CPE* met acute hemorragische diarree (Marks 2011). *CPE* lijkt een verhoging te geven van het vloeistofgehalte in het lumen, ernstige desquamatie en afstomping van het villus epitheel en transmurale infiltratie van neutrofielen (Marks 2002)

*C. perfringens* is goed te onderscheiden van *Clostridium difficile.* Dit is ook een gram positieve strikt anaerobe spoorvormige, bacterie die toxines kan produceren (Marks 2002 & 2011). De sporen zijn zeer resistent en kunnen voor jaren overleven in de omgeving.

**Transmissie:**

*C. perfringens* behoort tot de natuurlijke darmflora (Marks 2002 & 2011) De opname gaat, zowel, indirect via opname van de sporen uit de omgeving of het voer als direct via de feco-orale route.

**Diagnose:**

Deze bacterie wordt niet geassocieerd met specifieke symptomen, koorts en diarree eventueel met bloedbijmenging kunnen worden gezien.

*Clostridium perfringens* kan via een kweek geïsoleerd worden, dit is echter niet voldoende voor de diagnose van ‘*Clostridium*’ gerelateerde diarree doordat vaak gelijke isolatie aantallen gevonden worden bij zowel de honden met als zonder diarree. Ook kan er naar de sporen worden gekeken via een fecaal uitstrijkje met een Grampreparaat. Een betere techniek is om de enterotoxines aan te tonen via een agglutinatietest of ELISA. Deze testen lijken niet erg betrouwbaar voor gebruik bij de hond. De ELISA is meer betrouwbaar in combinatie met een PCR voor bepaling van de toxine genen.

**Therapie en preventie:**

De diarree is van zelf-limiterende aard en ondersteunende vloeistof therapie afhankelijk van de symptomen lijkt voldoende. Alleen bij acute hemorragische diarree en systemische ziekteverschijnselen wordt antibiotica aangeraden. Antibiotica die gebruikt kunnen worden zijn: ampicilline, metronidazol, macroliden en tetracyclinen. Hier dient echter voorzichtig mee om te worden gedaan omdat er al een resistentie tegen tetracyclinen is ontdekt in eerdere studies (Marks 2011).

***4.2.4. Hemolytische E. coli***

*E.coli* is een pleomorf, gram negatieve, niet sporen vormende bacterie, behorende tot de familie van de *Enterobacteriaceae* (Marks 2011). In de literatuur zijn 4 groepen van enteropathogenen beschreven: *enteropathogene (EPEC), verocytotoxigene (VTEC), Enterotoxogene (ETEC) en Enteroinvasieve (EIEC)*. Deze *E. coli* stammen zijn zowel geassocieerd met diarree bij de hond als mens (Beutin 1999). *E. coli* behoort tot de normale darmflora van de hond, maar kan zowel gastrointestinale als systemische infecties veroorzaken (Munnich 2008). Het aantreffen van *E. coli* in de feces is dus niet per se klinisch relevant. Er zijn in de literatuur associaties beschreven tussen het voorkomen van bepaalde types *E. coli* in de feces en klinische klachten bij de hond (Marks 2011).

De *VTEC* stammen kunnen een shiga-toxine produceren, welke geassocieerd wordt met bloederige diarree, enkele van deze stammen kunnen ook hemolysine produceren (Beutin 1999). Dit eiwit zorgt ervoor dat er poriën worden gevormd in de monomeer laag van de celmembranen van de gastheer. Hierdoor is er onder andere een erytrolyse en een ontstekingbeeld waar te nemen (Bhakdi 1988).

*E. coli* is een beruchte veroorzaker van septicaemie en sterfte bij jonge pups (Munnich 2008) met name neonatale sterfte is geassocieerd met deze verwekker. Ook bij wat oudere pups is E coli geassocieerd met diarree. Dit lijkt samen te hangen met specifieke *E. coli* stammen, welke virulentiefactoren bevatten die aanhechting en pathogeniteit faciliteren.

**Transmissie en diagnose:**

*E. coli* behoort tot de natuurlijke flora van de hond, zowel pathogene als niet-pathogene *E. coli* zal worden uitgescheiden in de omgeving. Niet elke pathogene *E. coli* zal bij een opname voor een infectie zorgen (Beutin 1999).

Voor detecteren van *hemolytische* *E. coli* wordt gebruik gemaakt van een anaerobe als aerobe bloedagar plaat. De prevalentie van hemolysine producerende *E. coli* in de feces is laag, tussen de 5-10% (Bhakdi 1988).

**Therapie en preventie:**

Ernstige klinische gevallen van diarree waarbij *E. coli* als oorzakelijk pathogeen wordt aangewezen kan worden behandeld met antibiotica Echter is al een 50% resistentie beschreven voor 1 of meer antibiotica en 43% resistentie is gezien bij fluoroquinolonen (Marks 2011). Sommige *E. coli* stammen worden beschouwd als overdraagbaar op mensen. Het is van groot belang om gereserveerd om te gaan met antibiotica om resistentie niet in de hand te werken. Het is daarom altijd aan te raden een therapie in te stellen op geleide van het ABG

**4.3. Parasitair**

***4.3.1. Toxocara Canis***

*Toxocara spp* behoren tot de nematoden, familie van de *Ascarididae* (Lee 2010). Deze bevat 2 soorten de *Toxocara canis* die voorkomt bij honden, vossen, knaagdieren en *Toxascaris leonina (Overgaauw 2002)*

**Transmissie route:**

Via de omgeving (o.a. bodem, park), horizontale (o.a. paratenische gastheer, verzorging pups) als verticale (intra-uteriene) transmissie is besmetting mogelijk. 4 a 5 weken na de infectie komen de eieren via de feces in de omgeving. Deze eieren zijn nog niet geëmbryoneerd en daardoor nog niet infectieus. Afhankelijk van de omstandigheden, klimaat en bodemtypen ontwikkelen de eieren zich tot een infectieus stadium (L1). Bij optimale omstandigheden kan dit rond de 3 tot 6 weken duren. Deze eieren kunnen tot een jaar na uitscheiding in de omgeving infectief blijven bij de juiste omstandigheden.

Migratieroute van de opgenomen larven voltrekt zich via 4 mogelijke routes (Lee 2010, Overgaauw 1997 & 2002):

* Tracheale migratie
* Somatische migratie
* Transplacentaire migratie
* Transmammaire migratie

**Diagnostiek:**

Symptomen van een *Toxocara canis* infectie kunnen bestaan uit diarree, braken, constipatie, hoesten en (mucopurulente) neusuitvloeiing (Lee 2010). De hondjes hebben vaak een verminderde glanzende vacht en een dik “wormenbuikje”.

Dit klinische ziektebeeld wordt vaker gezien bij pups mede doordat bij herhaaldelijke infectie van *Toxocara canis* immuniteitsopbouw kan ontstaan, waardoor bij adulte honden doorgaans geen patente infecties meer worden gezien (Overgaauw 1997).

Bij voorkeur vindt therapie plaats na diagnostisch aantonen van een infectie. Hiervoor kan de CSF methode worden gebruikt. Onder de microscoop kunnen eieren te zien zijn van rond de 50µm, ongeëmbryoneerd met een dikke gekartelde wand. De kleur kan verschillen van kleurloos tot geelbruin (Overgaauw 2002).



Figuur (1) Toxocara canis ei, bron van © University of Pennsylvania 2004

**Therapie en preventie:**

Aangezien *Toxocara canis* eieren zeer resistent zijn voor desinfectantia is het belangrijk om omgevingsbesmetting te voorkomen. Desinfectie van een besmette omgeving kan plaatsvinden door gebruikt te maken van stoomreiniging onder hoge druk (Overgaauw 2002). Dit zal de infectiedruk verlagen.

Daarnaast worden de klinische symptomen bestreden door goede anthelmintische behandeling. In Nederland zijn benzimidazolen, probenzimidazolen, pyrantel, levamisolen en nitroscanaten geregistreerd voor deze indicatie (Overgaauw 1997, 2002). *Toxocara canis* is een zoönose, daarom is het van belang deze periodieke ontwormingsbehandelingen en hygiëne te handhaven.

***4.3.2. Giardia duodenalis***

*Giardia duodenalis* behoort tot het genus *Giardia*. Het is een kleine eencellige, niet invasieve protozo met flagellen, die zich asexueel voortplant op het oppervlakte van het lumen van de dunne darm (Thompson 2000). *Giardia* wordt onderverdeeld in 7 assemblages (A-G), waarbij A en B geassocieerd wordt met humane infecties, C en D met huisdieren (hond-achtigen), E met landbouwhuisdieren en F en G voornamelijk met ratten en katten (Caccio 2008).

De pathogenese wordt in verschillende studies beschreven als onduidelijk. Bij *Giardia* infecties wordt villus atrofie en beschadiging van de microvilli waargenomen, hierdoor ontstaan maldigestie en malabsorptie (Overgaauw 2002, Thompson 2000).

**Transmissie:**

Transmissie vindt plaats via feco-orale route. Giardia heeft een directe levenscyclus welke begint bij het opnemen van cysten door fecaal besmet water en voer (Caccio 2008; Overgaauw 2002, Thompson 2000). De incubatietijd bedraagt 5-16 dagen. Aangezien cysten zeer stabiel zijn in de omgeving kunnen ze weken tot maanden overleven.

In de dunne darm komen de trofozoϊeten uit de cysten waarna deze zich hechten aan het epitheel, zich asexueel vermenigvuldigen en cysteren na enkele dagen. Uitscheiding van cysten bij besmette dieren is intermitterend en duurt gemiddeld 4 tot 5 weken (prepatent periode) maar kan oplopen tot 7 maanden. Cysten uitscheiding komt voornamelijk voor bij dieren <1jaar, oudere dieren lijken immuniteit op te bouwen.

**Diagnose:**

*Giardia* infecties worden zowel subklinisch als klinisch gezien. De symptomen van *Giardia* infecties variëren van asymptomatisch tot acute tot persisterende diarree, gewichtsverlies, dehydratatie, buikpijn, misselijkheid en braken. Voor het detecteren van cysten of trofozoϊeten in de feces zijn verschillende testen mogelijk. Een fecaal uitstrijkje om trofozoϊeten te kunnen zien is alleen mogelijk van zeer verse feces. Om de cysten te detecteren is CSF methode beter te gebruiken (Overgaauw 2002). Wel moet men zich realiseren dat er een intermitterende uitscheiding is dus meerdere dagen feces verzameling nodig is voor een betrouwbare detectie. Een makkelijkere en snellere manier is het gebruik van een *Giardia* Snap-test op basis van een ELISA. Deze testen zijn doorgaans zeer gevoelig.

**Therapie en preventie:**

De therapie bestaat uit het geven van fenbendazol of metronidazol (Hamnes 2007, Overgaauw 2002). Deze medicatie is niet 100% effectief in het elimineren van alle *Giardia* parasieten in de gastheer. De kans op herinfectie is daarnaast zeer groot, daarom is het belangrijk om de hond ook te wassen om zo de cysten die in de vacht zijn blijven hangen te verwijderen. Andere preventie mogelijkheden zijn om de omgeving zo droog mogelijk te houden, feces dagelijks te verwijderen en het dier niet van water te laten drinken dat mogelijk met besmette feces van dieren in aanraking is geweest (Overgaauw 2002).

***4.3.3. Cystoisospora spp.***

Het genus *Cystoisospora* bevat middelgrote oöcysten van 17-23µm (He 2012). De gesporuleerde oöcysten bevatten 2 sporocyten per oöcyst die elk weer bestaat uit 4 sporozoϊeten. Als de sporozoϊeten vrijkomen uit de oöcysten invaderen ze het darmepitheel, waarbij er ongeslachtelijk vermenigvuldiging (schizogonie) plaats vindt. Hierna vindt geslachtelijk voortplanting (gametogonie) plaats tot zygoten. Deze ontwikkelen zich tot oöcysten die uitgescheiden worden via de feces (Junker 2000, Overgaauw 2002, He 2012).

**Transmissie:**

De transmissie verloopt via een indirecte route. De cysten sporuleren in de omgeving of in de tussengastheer die vervolgens door de eindgastheer (hond) wordt geconsumeerd. De sporogonie duurt ongeveer 1 tot 4 dagen afhankelijk van omgevingsfactoren, oöcysten zijn zeer resistent in de omgeving en kunnen maandenlang overleven (Junker 2000, Overgaauw red. 2002). De prepatente periode duurt zo’n 8 tot 11 dagen waarbij een uitloop mogelijk is tot 28 dagen. Uitscheiding van oöcysten wordt vooral gezien bij jonge dieren, mogelijk is er sprake van een immuniteitsopbouw of leeftijdsresistentie bij adulte dieren (Daugschies 2000, Overgaauw 2002).

**Diagnose:**

*Cystoisospora spp.* infecties kunnen symptoomloos blijven, of milde tot ernstige diarree verschijnselen geven. De diarree wordt vaker gezien bij jonge dieren (Daugschies 2000, Overgaauw 2002, He 2012). Andere symptomen die gezien kunnen worden zijn braken, anorexie, dehydratatie, groeivertraging en eventueel pupsterfte.

De oöcysten kunnen worden aangetoond met een CSF methode gebruik makend van ZnSO4. Dit dient wel meerdere dagen achtereenvolgend uitgevoerd te worden vanwege de intermitterende uitscheiding. Tevens is het ook mogelijk om via PCR de species te specificeren (He 2012).

**Therapie en preventie:**

Indien ernstige verschijnselen worden gezien kan een behandeling met een trimethoprim sulfa (TMP’S) combinatie of een behandeling met andere coccidiostatica zoals clazuril (niet geregistreerd voor deze aandoening) (Junker 2000) of toltrazuril (Daugschies 2000). Heel belangrijk is een goede omgevingshygiëne om hiermee de infectiedruk laag te houden. De oöcysten van *Cystoisospora* *spp.* zijn zeer omgevingsresistent. Reinigen dient gedaan te worden met stoom of heet water met zeep, waarna desinfectantia zoals quaternaire ammoniumverbindingen een verdere reductie van het aantal oöcysten in de omgeving kunnen bewerkstelligen (Junker 2000).

***4.3.4. Brillendoosjesgisten***

In literatuur is melding gemaakt van het voorkomen van bepaalde morfologisch specifieke gisten in de feces van honden met diarree genaamd *Cyniclomyces guttulatus* of *brillendoosjesgist*. Deze gisten komen van nature voor in de maagdarmtractus van konijnen en knaagdieren, en worden ook regelmatig in feces van honden aangetroffen (Flausino 2012). Honden kunnen zich waarschijnlijk infecteren met deze gist door opnemen via besmette vegetatie of via eten van konijnenfeces.

Zowel bij honden met diarree als bij klinisch gezonde honden wordt de gist regelmatig aangetroffen. In de literatuur wordt wel gesuggereerd dat massale uitscheiding van deze gist geassocieerd is met diarree (Flausino 2012).

Over de pathogenese en verspreiding van deze gist is maar weinig bekend. Ook over transmissie tussen honden is veel nog niet onderzocht. Vooralsnog lijkt individuele besmetting het meest voor de hand liggend via konijnenfeces, voorkomend als passant van de hond.

De gist is door zijn kenmerkende morfologie eenvoudig te herkennen in een parasitologisch fecesonderzoek van preparaten die via de CSF methode zijn verkregen (Flausino 2012). Vergelijkbaar met de wijze waarop wormeieren of cysten semikwantitatief zijn bepaald worden ook de *Brillendoosgisten* qua aantallen genoteerd als “enkele” “matig” en “veel tot zeer veel”

1. **Onderzoeksvraag**

Dit onderzoek is breed opgezet en meerdere onderzoeksvragen zijn in de loop van het onderzoek naar boven gekomen. De belangrijkste onderzoeksvraag is:

“Wat is de rol van potentiële pathogenen in het veroorzaken van acute diarree bij pups”,

Met als subvragen:

“Zijn er correlaties tussen de verschillende pathogenen aantoonbaar en zijn er risicofactoren die een rol spelen bij het optreden van infectieuze acute diarree bij pups?”.

**6. Materiaal en methode**

**6.1. Onderzoeksinleiding**

Om de risicofactoren en de rol van pathogenen te bekijken bij acute infectieuze diarree is gebruik gemaakt van een veldstudie met een case- control opzet. Hierbij is getracht zoveel mogelijk naast een monster van een pup met diarree per praktijk een matching control pup zonder diarreeklachten bij dezelfde dierenartsenpraktijk te verzamelen. Aangezien er in Nederland nog weinig wetenschappelijke artikelen bestaan over deze risicofactoren en de rol van pathogenen op acute infectieuze diarree is gekozen voor een landelijke opzet. Dit door middel van het verzamelen van feces en het laten invullen van een enquête door zowel dierenarts als eigenaar. De monsters zijn door de afdeling Klinische Infectiologie, Departement I&I, Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, geanalyseerd, en zijn beschreven in dit literatuurwerk.

**6.2. Onderzoeksontwerp**

Voor dit onderzoek is gekozen voor honden die door de dierenarts daadwerkelijk geconsulteerd werden met de klinische symptomen van diarree. Als er klinische diarree was geconstateerd is er getracht door de vragen in de enquête meer inzicht te verkrijgen in de aard van de diarree en de ernst van eventuele symptomen. Dezelfde vragen zijn (ter vergelijking) zowel aan de eigenaar als dierenarts gevraagd, tevens zijn er vragen gesteld met betrekking tot de woon- en leefomstandigheden en medische achtergrond van de pup. Voor de controle groep is gevraagd aan de dierenartsen of ze naast een pup met diarree ook feces van een gezonde pup wilde insturen om de case- control ratio op 1:1 te krijgen. Deze controle groep kon om verschillende reden een consult aan de dierenarts brengen, zoals preventieve zorg (vaccinatie, neutralisatie) of ziekte van welke aard dan ook, uitgezonderd ziekte met klinische verschijnselen van diarree.

Als inclusie criteria voor honden met diarree is gekozen voor een leeftijd jonger dan 1 jaar met acute diarree, die korter dan 10 dagen geleden is ontstaan. Voor de controle groep is gekozen voor inclusie criteria waarbij de honden ook jonger dan 1 jaar moesten zijn en er in de voorgaande 3 weken geen sprake was geweest van braken/diarree klachten.

Er is gewezen op het zo snel en vers mogelijk insturen, per post, van de feces die in het VMDC direct bacteriologisch, parasitologisch en virologisch is onderzocht, waarvan een deel is ingevroren voor later PCR onderzoek. Resultaten zijn samen gebracht met de enquêtes van zowel dierenarts en eigenaar, gecontroleerd op inclusie criteria en volledigheid, nagebeld voor ontbrekende informatie en follow up en samengevoegd in een overzichtelijk en werkzaam bestand.

**6.3. Gegevens en feces verzameling**

***6.3.1 Opzet feces verzameling***

Om zoveel mogelijk deelnemers te genereren met een wijde geografische verspreiding in Nederland, is gekozen om praktijken te informeren door middel van nascholingslezingen voor dierenartsen Daarnaast is gebruik gemaakt van het cliëntenbestand van het VMDC en van praktijken uit het eigen netwerk.

Om de aangeschreven praktijken te stimuleren monsters in te sturen werd de microbiologische diagnostiek gratis uitgevoerd op de feces. Praktijken die interesse hadden konden hiervan blijk geven door middel van bellen, mailen of faxen met het VMDC of met de onderzoeker. Zij kregen vervolgens 2 pakketten opgestuurd, een pakket voor de case en 1 pakket voor de controle. In dit pakket zaten:

* 2 fecespotjes
* 1 mediumswab ( amies charcoal)
* plastic wegwerppipet
* voorlichtingsbrochure eigenaar
* voorlichtingsbrochure dierenarts
* enquête eigenaar
* enquête dierenarts
* retourenvelop met verzend- en verpakkingsmateriaal

Met de start van dit onderzoek in juli 2009 tot en met november 2011 konden deze pakketten worden aangevraagd en retour gezonden. Er zat een limiet aan het aantal inzendingen per praktijk, namelijk 8 inzendingen van pups met diarree per praktijk om zo een mooie landelijke spreiding te verkrijgen en te voorkomen dat regionale infecties over gerepresenteerd zouden worden (Figuur 2 blz. 23).

Het verzamelen van de feces kon zowel tijdens het consult gebeuren als bij de eigenaar thuis. In de brochure staat beschreven dat de feces zeer vers moet zijn tijdens afname en snel moet worden opgestuurd. Alleen de toplaag van de feces mag gebruikt worden en de feces mag niet in contact zijn gekomen met feces van andere dieren, bijvoorbeeld op een uitlaatveldje. De potjes dienden maximaal 2/3 vol geschept te worden. Na het vullen van het fecespotje wordt de swab in de feces gestoken en weer terug in de swabhouder gebracht. In een aantal gevallen waren de pups zeer jong (nestje), en werd een mengmonster van meerdere pups gezamenlijk ingestuurd. Reden hiervoor was dat er uit de zeer jonge pups bij individuele bemonstering onvoldoende materiaal verkregen kon worden voor het onderzoek of dat feces gedeponeerd in het hok niet individueel te traceren waren. Aangezien de leefomstandigheden in een nestje bij zeer jonge pups sterk overeenkomstig zijn en de ziektelast waarschijnlijk vergelijkbaar was is gekozen om dergelijke mengmonsters wel mee te nemen in de studie. Het belang om ook van zeer jonge pups monsters in de studie op te nemen woog voor ons meer op tegen de mogelijk iets minder betrouwbare resultaten.

De materialen en vragenlijst werden in de daarvoor bestemde retourenvelop terug gestuurd naar het antwoordnummer van het VMDC van de faculteit diergeneeskunde te Utrecht.

Nadat de pakketten op het laboratorium waren ontvangen zijn deze direct ingeschreven, zijn de bepalingen ingezet en de enquêtes verzameld in mappen.

Inschrijven bestond uit het inschrijven van de patiënten in het computersysteem GLIMS van het VMDC, waarbij alle monsters (incl. enquêtes) per cliënt gecodeerd werden met een uniek patiëntnummer en corresponderende barcodesticker.

Uit de ingezonden feces werd direct 2 gram feces gehaald voor bacteriologisch onderzoeken 2 gram voor parasitologisch onderzoek. Van de overgebleven feces in de 2 fecespotjes werd 1 potje ingevroren op -20 graden, voor later onderzoek naar *C. difficile*, het andere potje werd verdund 1:5 met PBS0, waarna het werd afgedraaid en het supernatant in cryostat buisjes werd ingevroren op -80 graden voor later virologisch PCR onderzoek.

Het microbiologisch onderzoek werd uitgevoerd op de volgende pathogenen: *Salmonella spp., Campylobacter spp., Clostridium Perfringens (indien in overmaat aanwezig) en in een later stadium Clostridium difficile ( niet in dit verslag opgenomen). Escherichia coli (indien beta-haemolytisch en in overmaat), Toxocara canis, Cystoisospora spp., Giardia spp., Brillendoosjesgisten, CPV en CCoV.*

Alle monsters werden gedetailleerd gedocumenteerd in het logboek. Als bleek dat er nog geen enquêtes waren ontvangen of een praktijk nog geen case-control combinatie had opgestuurd werden deze nagemaild of –gebeld om te vragen hiervoor alsnog te zorgen.

Het resultaat rapport werd uit GLIMS uitgedraaid en in mappen bijeengebracht. De dierenartsenpraktijken kregen via fax, mail of de post de uitslag van de bacteriologische en parasitologische onderzoeken.

***6.3.2. Enquêtes***

De enquête van de dierenarts (bijlage 11.1.1.) bestaat uit 3 delen:

1. Algemeen gedeelte, met name naw (naam,adres,woonplaats) gegevens.
2. Gedeelte voor de gezonde pups (Controls) om in te vullen.
3. Gedeelte voor de pups met diarree om in te vullen.

Voor het opdelen is gekozen om de enquêtes per patiënt niet te lang te maken zodat de drempelwaarde voor het invullen laag blijft en om irrelevante vragen uit te sluiten, die mogelijk verwarrend zouden kunnen werken. De indeling eerst algemene gegevens en vervolgens specifieke vragen is gekozen om de nadruk niet teveel op het onderzoeksonderwerp diarree te leggen.

De enquête van de eigenaar (bijlage 11.1.2.) heeft een uitgebreider algemeen deel om zo een schets te kunnen maken van de woon- en leefsituatie waarin de pup zich bevindt, aangezien bij een veldstudie deze punten niet gestandaardiseerd kunnen worden en wel degelijk invloed kunnen hebben op het onderzoek. Ook kunnen risicofactoren voortkomend uit de leefomstandigheden van de pups worden onderzocht.

De enquête van de dierenarts, eigenaar en de resultaten zijn samengevoegd tot een dossier per patiënt en gecontroleerd of het voldeed aan de in/exclusie criteria en op volledigheid. Monsters waarbij bleek dat niet aan de inclusie criteria werd voldaan zijn uit de studie verwijderd. De dossiers zijn in mappen gebonden op alfabetische volgorde per dierenartsenpraktijk en daarna op VMDC registratie nummer, zodat deze efficiënt en compleet liggen voor telefonische follow up.

Twee Excel documenten zijn samengesteld, een met de belangrijkste zoekgegevens om de patiënt zo snel mogelijk te vinden in de geschriften en de andere in een groot basis Excel bestand waar alle vragen/antwoorden uit de enquêtes en resultaten in vermeld staan.

Om follow up te krijgen van de dieren is gekozen om na een periode van 0,5-2 jaar de dierenartsenpraktijk te bellen, en een aantal aanvullende vragen over de gezondheidstoestand van de pup te vragen. Slechts antwoord op vragen die in het computersysteem van de dierenartsenpraktijk waren opgenomen werden als betrouwbaar beschouwd en opgenomen. Indien enquêtes niet volledig waren ingevuld werd tijdens dit follow up gesprek deze vragen nogmaals gesteld, maar de antwoorden werden alleen opgenomen als de informatie in het computer systeem werd vermeld. Deze antwoorden werden ook apart van de andere gegevens opgeslagen en gemarkeerd als later verkregen data. Er is voor gekozen om pas later na te bellen omdat nabellen dan gecombineerd kon worden met de follow-up en zo geen extra belasting voor de dierenartsenpraktijk zou geven.

De antwoorden konden gegeven worden door de dierenarts of dierenartsassistente waarbij de patiëntenkaart leidraad was voor het verkrijgen van de gegevens. Hiervoor werd de patiëntenkaart over de telefoon voorgelezen van een maand voor het consult, tijdens het consult en tot op heden. Een gesprek van 5 patiënten duurde gemiddeld 30 minuten.

**6.4. diagnostische methoden**

In deze studie werd gebruik gemaakt van diagnostische gegevens die al eerder zijn uitgevoerd. Daarom voldoet voor dit onderzoek een korte omschrijving van de gebruikte diagnostische methoden. Alle monsters die binnen kwamen zijn eerst bacteriologisch en parasitologisch getest, waarna de feces werden verdund (1:5) met DPBSO zonder Ca/Mg en afgedraaid, waarna het supernatant werd ingevroren bij -80°C tot verdere verwerking.

***6.4.1. Virologie***

In het virologisch onderzoek werd getest op aanwezigheid van het *CPV* en het *CCoV*. In een eerder stadium werd een PCR ontworpen om de monsters uit de studie te analyseren. Deze PCR is voor analyse van de monsters op aanwezigheid van het *CPV* voor de interne controle aan alle monsters het *Feline Herpes Virus (FHV)* toegevoegd om te controleren of het opwerken van het DNA correct is verlopen. Bij het *CCoV* is voor de interne controle aan alle monsters *Feline Leukemie virus (FeLV)* stam F74 toegevoegd om te controleren of het opwerken van het RNA correct is verlopen. De standaard positieve controle van *CCoV* RNA is afkomstig uit de studie van Decaro (2004), het RNA is gebaseerd op de ORF5 van het M-gen van de Coronastam 45/93. Preparatie van het DNA van *CPV* werd uitgevoerd volgens de methode beschreven in Decaro (2005) en als positieve controle werd een vaccinstam Nobivac CPV® (Stam 154, Intervet) gebruikt.

Als negatieve controle is een monster genomen van een volwassen, klinisch gezonde hond welke negatief testte op *CCoV* en *CPV*. De gebruikte primers en probes zijn beschreven in Decaro (2004 en 2005). De primers zijn afkomstig van Invitrogen en de probe van *CPV* bij TIB Molbiol en van *CCoV* bij Applied Biosystems®. Er is gebruikt gemaakt van een real-time TaqMan RT-PCR (lightCycler Roche 480).

***6.4.2 Bacteriologie***

Van alle monsters werd een grampreparaat gemaakt waarin de verhouding gram+/gram- en aanwezigheid van *Campylobacter*-achtige bacteriën en *Spirocheten* werd bekeken volgens het protocol van het VMDC te Utrecht (bijlage 11.3.)

Het bacteriologisch onderzoek werd uitgevoerd specifiek gericht op de voornaamste bacteriële pathogenen bij de hond: *Salmonella* *spp*., *Campylobacter* *spp*., *Clostridum perfringens* en *hemolytische* *E. coli*. Voor onderzoek naar *Salmonella* *spp*. werd zowel direct geënt op een BGA ( biotrading) plaat (18-24 uur) als 1gram feces opgehoopt in 10ml seleniet bouillon( biotrading) waarna deze bouillon na 18-24 uur bebroedt (37°C) werd afgeënt op een BGA plaat en opnieuw bebroed (37°C) gedurende 18-24 uur. Verdachte rode kolonies werden door agglutinatie met specifieke salmonella agglutinerende sera en via een korte bonte rij bevestigd, vervolgens werd een antibioticum gevoeligheidsbepaling (ABG) uitgevoerd.

Voor onderzoek naar *Campylobacter* *spp.* werd geënt op 2 temperaturen op een selectief medium voor *Campylobacter*: CCDA, (Code: CM0739 Oxoid).

Een plaat werd bebroed op 37°C en 1 plaat op 42°C, gedurende 48 uur onder micro-aerofiele omstandigheden. Bij geen groei werd nog eens 2x 24 uur bebroed. Verdachte heldere, oxidase positieve, kleine kolonies werden bevestigd via een gram preparaat.

Voor onderzoek naar *Clostridium perfringens* werd geënt op een Columbia schapenbloed agar (biotrading) welke strikt anaeroob werd bebroed. Als de karakteristieke kolonies in overmaat aanwezig waren, werden deze bevestigd door gebruik te maken van een gram preparaat en omgekeerde CAMP reactie, vervolgens werd ook een ABG uitgevoerd.

Voor onderzoek naar *hemolytische E. coli* werden 3 platen geënt, een schapenbloed agar aeroob, schapenbloed agar anaeroob en een MacConkey plaat (alleen via Biotrading) volgens de methode voor losliggende kolonies. Deze werden bebroed op 37°C voor 18-24 uur en karakteristieke kolonies op de MacConkey agar werden gedetermineerd door middel van een korte bonte rij. Ook hier werd een ABG uitgevoerd.

***6.4.3. Parasitologie***

Voor parasitologisch feces onderzoek is gekozen voor de CSF methode. Er werd 1 gram feces afgewogen en door middel van de vortex gemengd met 14 ml kraanwater. De inhoud werd gezeefd en verdund met 105 ml water voordat het in een centrifugebuisje werd overgegoten. Deze suspensie werd 1 minuut gecentrifugeerd met 4000 omwentelingen per minuut. Het supernatant werd afgezogen en het centrifugebuisje werd aangevuld met ZnSO4 tot er een bolle meniscus zichtbaar werd en deze werd afgedekt met een dekglaasje. Vervolgens werd 4 minuten gecentrifugeerd op 3000 omwentelingen per minuut. Het dekglaasje werd afgenomen en horizontaal verplaatst naar een voorwerp glaasje. Bij het centrifugebuisje werd nog 1 a 2 druppels ZnSO4 toegevoegd tot weer een bolle meniscus zichtbaar werd. Vervolgens werd weer een dekglaasje geplaatst en na enkele minuten afgenomen volgens eerder beschreven methode. Beide preparaten werden microscopisch bekeken beginnende met 10x 10 vergroting voor de grotere wormeieren. Kleine wormeieren en (oö)cysten werden identificeerbaar bij 40x 10 vergroting. De eieren en (oö)cysten werden geteld en opgedeeld in een schaal van 0=geen aanwezig, 1=weinig, 2=matig, 3=veel tot zeer veel.

**Het berekenen van het routine e.p.g. gaat als volgt:**

(1 gram feces + 14 ml water) + 105 ml water

Epg = ⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯ = verdunningsfactor 10 x nt

12 ml (volume centrifugebuis)

**bij 1 gram feces**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Aantal getelde eieren =* nt** | ***Weergave in Glims (labsysteem)*** | ***interpretatie*** |
| 1-10 | + | enkele tot 100 epg |
| 11-20 | >+ | meerdere tot 200 epg |
| 21-100 | +++ | veel tot 1000 epg |
| >100 | ++++ | zeer veel > 1000 epg |

In deze studie zijn de categorieën veel en zeer veel samengevoegd tot 1 categorie

**6.5. Data verwerking en statistische technieken**

Voor de statistische berekeningen is SPSS (IBM® SPSS® Statistics 2011 for Windows, Version 20.0) gebruikt. Voor overzichten, draaitabellen en eenvoudige grafieken is Excel (Microsoft office Excel 2003 en 2007 in Windows) gebruikt. Er is gekozen bij de meeste variabelen voor een nominale verdeling (0= nee en 1= ja) en in enkele gevallen een ratio of intervalschaal verdeling (bijv. leeftijd in dagen) of een ordinale verdeling.

Eerst is er een groot overzicht gemaakt in Excel waarbij gekeken is of het aantal monsters voldoende groot was voor analyse.

Aangezien de case-control ratio niet 1:1 was hebben we vervolgens een aantal parameters in beide groepen vergeleken.

Zo werd gecontroleerd of leeftijdsverdeling en geslachtsverdeling in beide groepen vergelijkbaar was, dus of de case-control groep qua samenstelling overeen kwamen.

Vervolgens werd voor verdere analyse een keuze gemaakt uit alle variabelen die in ons onderzoek zijn gemeten. De keuze werd bepaald aan de hand van univariabele vergelijkingen (significante overkomsten/verschillen of correlaties), op basis van eerdere literatuur en/of op basis van aannemelijkheid van een verband tussen twee variabelen. Overige variabelen zijn wel genoteerd maar bewaard voor latere data-analyse.

De geselecteerde variabelen (tabel 4, blz. 27 ) zijn geplaatst in een correlatie tabel, met de volgende selectieprocedure: er is op significante correlaties tussen 2 variabelen geselecteerd met een *p≤ 0.1*. Hierbij is gekeken naar correlaties binnen de totale populatie, maar ook is gekeken naar zowel de case en control als op zichzelf staande groepen en voor sommige variabelen is vergeleken tussen alleen het geslacht.

Daarna is bij de nominale variabelen via *kruistabellen* in SPSS gekeken naar significante relaties met behulp van *Pearson Chi-Square* of een *Fisher’s Exact Test*. De laatste test is gebruikt als Max. 20% van de Expected Counts ≤ 5 waren. In beide testen is een significantie met een *p≤*0.05 aangehouden. Om de sterkte en richting van gevonden verbanden te kunnen bepalen is gebruik gemaakt van *Odds Ratio (* met een 95% confidentie interval), en *Phi* en *Contingency Coëfficiënt. Phi* voor de richting en *Contingency Coëfficiënt* voor de mate van samenhang*.* Bij de vergelijkingen tussen een intervalschaal en nominale variabelen is gekozen voor een logistische regressie analyse.

Bruikbare informatie is samengebracht in de onderstaande tabellen (1 t/m 6), overige berekeningen zijn uitgeprint en opgeslagen.

**7. Resultaten**

**7.1. Respondenten**

In totaal zijn er 60 aanmeldingen van praktijken gekomen die geïnteresseerd waren, waarvan daadwerkelijk 54 (90.0% / 3.7% in NL (van totaal aantal geregistreerde praktijken bij CBS)) praktijken/klinieken pakketten teruggestuurd hebben. 195 pups zijn als kandidaten voor de studie voorgesteld. Na selectie op basis van de inclusie criteria zijn 49 praktijken daadwerkelijk meegenomen in het onderzoek, 5 praktijken bleken monsters te hebben ingestuurd die niet aan de inclusie criteria voldeden.

In figuur 2 wordt zichtbaar hoe de herkomst van de deelnemende pups verdeeld was over het land.

Er waren 26 praktijken die een case-control set monsters opstuurden. In totaal waren er 50 (58.8%) setjes uit deze 26 praktijken afkomstig. 17 (28.1%) praktijken hebben alleen maar feces van pups met diarree in gestuurd en 6 (13.3%) praktijken alleen maar feces van pups zonder diarree. Bij 1 case-control set monsters kwamen de monsters van de pup met diarree en de controle monsters uit het zelfde huishouden.



Figuur (2) Geografische verspreiding van de woonplaats van deelnemende pups

Bij het sorteren van de geretourneerde enquêtes en monsters is eerst gekeken of deze binnen de inclusie criteria vielen. Indien de antwoorden van de eigenaar op vergelijkbare vragen verschilden van de antwoorden van de dierenarts, werd de dierenartsenquête als leidend aangehouden.

Van het totaal van 195 geretourneerde enquêtes zijn er 158 ( 81.0%) direct goedgekeurd, bij 11 (5.6%) enquêtes is de duur van diarree van de dierenarts als waarheid genomen aangezien deze verschilde met die van de eigenaar, 17 (8.7%) dieren hadden volgens de enquête langer dan 10 dagen diarree en 9 (4.6%) kandidaten werden te oud bevonden.

Van de 169 uiteindelijk geselecteerde monsters zijn er 113 (66.9%) pups met diarree en 56 (33.1%) gezonde controle dieren. Dit geeft een respectievelijke verhouding case: control van 2:1. De reden dat de gezonde controle dieren de dierenarts consulteerden bestonden voornamelijk uit bezoek voor de preventieve vaccinaties en algemeen lichamelijk onderzoek.

Vervolgens werd onderzocht of er leeftijdsverschil was binnen de case groep en de controle groep, om te bekijken of de groepen wel op basis van leeftijdsverdeling vergeleken mochten worden. Een jaar is hiervoor in 4 gelijke kwartalen opgedeeld en vergeleken werd hoe de leeftijdsverdeling van de dieren was over het jaar. 85 (50.3%) monsters waren afkomstig van pups van 0-12 weken. Er zijn geen monsters ontvangen van dieren < 4weken oud. Met toename van de leeftijd nam het insturen van monsters af (tabel 1a figuur 3a).

Tabel (1a) figuur (3a)

****Tabel (1b) figuur (3b)

Uit tabel 1a en figuur 3a blijkt dat er geen significante verschillen waren in leeftijdsopbouw tussen de case en de controle groep. Vervolgens werd de verhouding reu/teef bekeken in de case en controle groep, en werd bekeken of de verhouding diarree/geen diarree in relatie met het geslacht gelijk verdeeld was over de groepen, zie tabel 1b en figuur 3b. Er waren 72 (42.6%) teefjes en 90 (53.3% )reutjes in totaal aanwezig. De verhouding reu/teef verschilde niet significant in de case-control groep en 7 (4.1%) nestjes/groepjes (bestaande uit een gecombineerd monster). Bij de teven hadden er 46 (40.7%) diarree tegen 26 (46.4%) in de controle groep, bij de reuen hadden er 60 (53.1%) diarree tegen 30 (53.6%) in de controle groep,. De 7 ingestuurde nestjes/groepjes (mengmonster) hadden allen (100%) diarree (tabel 1b).

**7.2 Karakteristiek van de klinische diarree**

***7.2.1 Aspect van de diarree***

De vraag ‘hoe ziet/zag de diarree eruit’, uit de enquête van de dierenartsen, is in de enquête onderverdeeld in kenmerken waarop gescoord kon worden. Van de 169 hadden 59 (34.9%) dierenartsen niets ingevuld, waarvan 56 bij de controle dieren, want deze vraag werd alleen gesteld in geval van diarree. Bij 3 van de dieren met diarree is bij deze vraag niets ingevuld. Meerdere items konden tegelijk gescoord worden, 65 (59.1%) van de pups vertoonde brijige diarree, 67 (60.9%) waterdun, 45 (43.6%) met bloedbijmenging, 31 (28.2%) met slijm bijmenging en 1 (0.9%) pup had zwarte uitziende feces.

***7.2.2. Duur van de diarree***

Het aantal dagen diarree mocht, volgens de inclusie criteria, niet langer bedragen dan 10 dagen. De vraag over duur van de klachten is uiteraard alleen bij de 113 pups met diarree ingevuld. Van de 113 dierenartsenquêtes over pups met diarree waren er 10 (9.3%) niet voor deze vraag ingevuld, waarna in de follow up 4 (3.7%) pups wel in deze lijst opgenomen konden worden, 2 met een duur van 1-5 dagen en 2 met een duur van 6-10 dagen. Van de andere 6 (5.6%) zijn er 2 waarbij de eigenaar wel de vraag had ingevuld, met een langere duur dan 10 dagen, 3 vragen waren bij zowel dierenarts als eigenaar niets hadden ingevuld en 1 dier wat volgens de eigenaar net binnen de inclusie criteria zou zijn gevallen. Van de over gebleven 107 enquêtes zijn 76 (71.0%) pups met een duur van de diarree van 1-5 dagen en 31 (29.0%) met een duur van de diarree van 6-10 dagen (figuur 4).

Figuur (4) duur diarree in dagen

Om de ernst van de klachten bij pups met diarree te kunnen beoordelen zijn ook vragen gesteld om een inschatting te maken in welke mate de pup een zieke indruk maakte gedurende de diarree.

Van de groep met diarree (113) vertoonde 55 (48.7%) pups een algehele malaise, 55 (48.7%) hadden gebraakt, 58 (51.3%) hadden verminderde eetlust, 3 (2.7%) hadden neurologische verschijnselen en 17 (15.0%) hadden koorts.

***7.2.3. Antibiotica gift***

In de enquête van de dierenarts zijn ook 2 vragen gesteld over het gebruik van antibiotica. Bij het deel voor de gezonde pup, ‘Heeft de pup in de afgelopen maand antibiotica gekregen, zo ja welk merk?’. Bij de vragen over de behandeling ‘Werd de hond ten tijde van de monstername behandeld met antibiotica, zo ja naam van werkzame stof’.

Van 4 (2.4%) honden zijn geen gegevens over antibioticagebruik ingevuld. Van de 165 overgebleven pups in de studie kregen er 42 (24.9%) antibiotica in de voorafgaande maand toegediend, waarvan 5 (8.9%) gezonde pups in de voorafgaande maand antibiotica kregen en 51 (91.1%) gezonde pups geen antibiotica kregen. Van de pups met diarree kregen er 72 (63.7%) geen antibiotica en 37 (32.7%) wel.

Er is, zoals gezien kan worden in de tabel 2, een duidelijke verband tussen antibiotica gift in de voorafgaande maand en diarree klachten.

Ook is er gekeken naar het verband tussen antibiotica gift ‘voor’ samen met ‘ten tijde van’ monstername en het voorkomen van de diverse bacteriële pathogenen. Hieruit komt alleen duidelijk naar voren dat bij het geven van antibiotica voor de monstername een reductie van pups met *Campylobacter* excretie waarneembaar is.

Aangezien er 30 pups waren die metronidazol hebben gekregen is er ook gekeken naar de invloed die dit kan hebben op het voorkomen van *Giardia*, echter hier is geen significante invloed waargenomen.

Virologisch is er een opvallend verband tussen het gebruik van antibiotica ‘voor’ samen met ’ten tijde van’ monstername en het positief testen op *CPV*. Hetzelfde geldt voor *CCoV* Verschillen in de totaal aantallen zijn afkomstig van het wel of niet invullen van de antibiotica vraag in de enquête in combinatie met de mogelijkheid dat er geen pathogeen uitslag bekend was.

Tabel (2) Antibioticagift icm pathogeen

Tabel (3) Antibioticagebruik

**7.3. Univariabele analyses (tabel)**

****Tabel (4) univariabele tabel

*Vervolg tabel*

****Tabel (4) vervolg univariabele tabel

***7.4. Pathogenen resultaten***

Uit tabel 4 blijkt dat bij pups met acute diarree die waren ingezonden voor deze studie in 14.2% *(16/169)/100%)* geen infectieuze oorzaak is aangetroffen. Opvallend is dat bij 67.8% *(38/169)/100%)* van de ‘gezonde’ dieren wel pathogenen in de feces zijn aangetroffen. De aanwezigheid van een potentieel pathogeen in de feces is niet altijd gecorreleerd met het krijgen van klinische diarree klachten. Wel komt er significant (p<0.001) naar voren dat bij dieren met diarree oplopend percentueel meerdere pathogenen gedetecteerd worden dan bij dieren zonder diarree, hier loopt het percentueel juist af bij meerdere pathogenen. Veelvuldig werd uit de uitslagen zichtbaar dat bij een pup meerdere potentiële pathogenen tegelijkertijd in de feces aanwezig konden zijn. Zowel bij gezonde pups als bij pups met diarree waren er dieren die tegelijkertijd meerdere pathogenen in de feces uitscheidden. In tabel 4 is te zien dat bij de gezonde dieren maximaal 3 verschillende pathogenen tegelijkertijd in de feces werden gevonden uit de groep dieren met acute diarree werd tot Max. 5 pathogenen tegelijkertijd in de feces aangetroffen. Bij aanwezigheid van 4 of 5 pathogenen was dus altijd sprake van diarree.

Vervolgens is in tabel 4 de correlatie tussen acute diarree en specifieke pathogenen beschreven. Deze tabel laat zien hoe vaak de door ons onderzochte potentieel pathogenen voorkomen, zowel bij pups met diarree als bij gezonde controle pups. Als we de bacteriële pathogenen bekijken zien we dat er slechts 1 dier *Salmonella* positief is bevonden, dit dier had diarree. Dieren met een overmaat aan *C. Perfringens* hadden vaker diarree, maar niet significant vaker (p>0.05) ook dieren waarin *hemolytische* *E. coli* werd geïsoleerd hadden vaker diarree, maar ook dit was niet significant (p>0.05) bevonden. Het voorkomen van *Campylobacter spp.* lijkt daarbij percentueel evenveel vertegenwoordigd in zowel de controle groep als de pups met diarree. Naast het wel of niet gedetecteerd hebben van *Campylobacter* spp is er ook nog gebruik gemaakt in een andere kruistabel van een meer kwantitatieve beschrijving van de resultaten. Hier is echter ook geen significantie in te ontdekken (bijlage blok 1 blz. 69).

Als we de parasitaire pathogenen bekijken valt op dat aanwezigheid van *Toxocara canis* en *Giardi*a *spp.* niet gecorreleerd is met de klacht acute diarree. *Cystoisospora* *spp.* lijkt wel geassocieerd met diarree, maar dit verband is niet significant in ons onderzoek.

Zoals in deze univariabele tabel (4) te zien is, zijn onder de pathogenen in dit onderzoek alleen *CPV* (p<0.027) en *CCoV* (p<0.001) significant gecorreleerd met voorkomen van acute diarree bij pups.

****Tabel (5) Pathogeen resultaten

Vervolgens is er gekeken of combinaties van pathogenen relatief vaker voorkwamen. Bij zowel de pups met diarree als de gezonde controle dieren (totaal 81 (47.9%) in dit onderzocht.

Een combinatie van *CPV* en *CCoV* (n=16 p<0.008) kwam significant vaker samen voor. *CPV* en *Cystoisospora* *spp*. (n=10 P<0.03) kwamen significant vaker samen voor en *Giardia* *spp.* en *Brillendoosjesgisten* (n=4 p<0.033) werden ook significant vaker samen aangetroffen (tabel 5, bijlage blok 3 blz. 72). Daarnaast lijken *hemolytische* *E. coli* en *Toxocara canis* (n=3 p<0.006) significant vaker voor te komen, maar in deze laatste 2 berekeningen zijn de aantallen wel erg laag.

Uit alle pathogenen zijn *CPV* en *CCoV* naar voren gekomen als duidelijk significant geassocieerd met acute diarree. Bij deze pathogenen zijn vervolgens risicofactoren nader onderzocht. *CPV* is gevonden bij 5 dieren (8.9%) van de controle groep en bij 26 dieren (23.0%) van de groep met diarree. Bij deze 5 pups van de controle groep (zonder diarree) is *CPV* via PCR aangetoond. Van deze 5 dieren was er 1 afkomstig van een zogenaamde broodfokker. Alle 5 dieren liepen buiten waar ze contact hadden met andere honden, alle 5 pups deden mee met een puppycursus. De dieren waren voor hun leeftijd adequaat gevaccineerd en reden van bezoek aan de dierenarts was ook de periodieke vaccinatie. Het betrof dieren met een PCR ct waarde >30, de hoeveelheid *CPV* excretie was dus matig tot laag met een gemiddelde ct waarde van 36,28.

In de enquête is een vraag bij de dierenarts opgenomen of het vermoeden bestaat dat een pup bij een zogenaamde broodfokker afkomstig is. Deze term is niet gedefinieerd in van Dalen, groot woordenboek der Nederlandse Taal. In de hondenwereld is deze term wel gangbaar en wij hebben met deze term bedoeld: een fokker die meerdere nesten van meerdere verschillende rassen op commerciële basis verkoopt. Bij 32 (18.9%) van de 169 dieren had de dierenarts het vermoeden dat een pup bij een dergelijke fokker was afgenomen. De hypothese dat *CPV* vaker voorkomt bij dieren die bij een broodfokker vandaan komen is in dit onderzoek significant bevestigd (p<0.02), van de 32 pups die vermoedelijk bij dergelijke fokkers vandaan zijn gekomen, zijn er 23 (74.2%) honden die diarree hebben en 9 (29.0%) zonder. Van de 9 pups zonder diarree die bij een broodfokker vandaan zijn gekomen, is er 1 (11.1%) via PCR positief getest op *CPV*, van de 23 pups met diarree zijn er 11 (47.8%) positief gevonden via PCR op *CPV*.

Andere pathogenen zoals *CCoV* (p<0.001) *en Cystoisospora* (p=0.004) geven in deze studie ook een significantie correlatie met deze herkomst te zien (tabel 5)

Klinische symptomen die significant gezien werden bij CPV positieve dieren zijn:

* Verminderde eetlust (n=102 p<0.001),
* Algehele malaise (n=107 p<0.001),
* Braken (n=109 p<0.016)
* Bloedbijmenging in de diarree (n=118 p<0.035) (bijlage blok 2).

Bloedbijmenging wordt in meerdere studies beschreven als een symptoom van infecties bij acute diarree geassocieerd met *Salmonella spp*., *Campylobacter* *spp*., *C. Perferingens* en *Cystoisospora* *spp*. *Giardia spp.* en *Toxocara* worden in de literatuur vrijwel niet geassocieerd met bloederige diarree. In dit onderzoek is gekeken naar de correlatie van bloedbijmenging bij de feces met het voorkomen van en aantal verschillende soorten agentia in feces monster. Hieruit bleek dat van de 45 (39.8%) dieren met bloedbijmenging in de groep van de pups met diarree er 5 (11.1%) pups waren die bloed in de diarree hadden zonder dat er een enkele pathogeen is gevonden en 40 (88.9%) waar 1 of meer pathogenen zijn gevonden.

Of een enkele pathogeen of juist combinatie van meerdere pathogenen oorzakelijk is blijft lastig. Bij *CPV*, in dit onderzoek (tabel 5), hebben maar liefst 15 (14% met p=0.035) pups van 26 pup die diarree hebben met *CPV* bloedbijmenging en bij 6 (6% met (fisher’s exact) p=0.06) pups is *hemolytische* *E. coli* gevonden. Er lijkt dus ook een correlatie tussen het voorkomen van *hemolytische E. coli* en bloedbijmenging bij de feces.

In de studies van Pratelli 2006 en Decaro 2008 wordt beschreven dat *CCoV* op zichzelf een lage mortaliteit heeft, echter in combinatie met *Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus en CPV* is daar een significant verhoging van mortaliteit waargenomen. In dit onderzoek is onderzocht of een menginfectie van *CPV* en *CCoV* gecorreleerd is aan een verhoogd overlijdensrisico. Hieruit is ook een sterke significantie (p=0.001) gekomen tussen deze menginfectie en overlijden in de groep van pups met diarree. Van pups met *CCoV* zijn er 8 (21.6%) overleden (p=0.016), waarvan 6 (75.0%) in combinatie waren met *CPV* en allen hebben voorafgaande symptomen van algehele malaise, verminderde eetlust, koorts en braken. Van de 2 *CCoV* positieve dieren die waren overleden maar geen menginfectie hadden met CPV, hadden geen van beide dieren ernstige klinische symptomen. Wel is er in de feces bij de ene ‘veel tot zeer veel’ *Campylobacter* *spp.* gevonden en bij de ander zijn ’meerdere’ *Cystoisospora* spp en ‘veel tot zeer veel’ *Brillendoosjesgisten* gevonden.

Dit brengt ons op het een volgend pathogeen die in dit onderzoek ook veel aanbod komt, namelijk *CCoV*. Van de 163 pups waar de PCR resultaten van bekend zijn, zijn er 6 (3.7%) pups in de controle groep waarbij *CCoV* is gevonden en in de groep van de pups met diarree zijn er 40 (24.5%) gevonden. In de enquête zijn een aantal mogelijke symptomen uitgevraagd die bij bepaalde pathogenen kunnen voorkomen zo ook bij *CCoV*, zoals diarree, braken, verminderde eetlust en koorts. Eerder is al genoemd dat de klacht diarree significant (p=0.001) gecorreleerd is met *CCoV*. De klachten braken met een significantie van p=0.004, verminderde eetlust met een significantie van p=0.001, zijn ook gecorreleerd met aanwezigheid van *CCoV*. De klacht koorts valt net buiten de significantie met p=0.065. Wel lijkt een verband met koorts aannemelijk zeker in combinatie met de beschreven literatuur hierover. In dit onderzoek kan wellicht sprake zijn van een confouder, omdat *CCoV* vaak gevonden wordt met *CPV*. Ook *CPV* kan deze symptomen veroorzaken.

Zoals al eerder is beschreven bij *CPV* is er ook bij *CCoV* een verband tussen de zogenaamde broodfokkers en *CCoV* (bijlage blok 4 blz. ). Van de 32 pups die bij zo’n fokker vandaan komen zijn er 17 (53.1%) die *CCoV* in de feces uitscheiden, waarvan er 1 uit de controle groep komt. Van de deze pups met diarree hebben er 10 (62.5%) een combinatie met *CPV*. Opvallende bevinding is dat 6 (18.8%) pups van de 32 die bij een broodfokker vandaan zijn gekomen zijn overleden, waarvan 1 binnen is gekomen als ‘gezonde’ controle en waarbij uit de follow-up gebleken is dat deze pup vrij snel later alsnog is overleden, geëuthanaseerd na een ernstige epilepsie aanval.

**7.5. Risicofactoren resultaten**

In de enquêtes, van zowel eigenaar als dierenarts, zijn vragen gesteld om meer duidelijkheid te verschaffen over de pup zelf, zijn leefomgeving en de voeding van de pups. Er zijn fecesmonsters binnengekomen van diverse uiteenlopende rassen en kruisingen, hierdoor is een onderscheid in ras en gewicht niet te maken. Wel is er gekeken of er een significant verschil is aan te merken tussen het krijgen van diarree en rashonden of kruisingen. Deze correlatie is echter met een p=0.600 zeker niet aanwezig. Ook is gekeken naar de correlatie tussen het geslacht en het voorkomen van diarree, deze is echter ook niet significant p=0.714. Interessant zijn de 32 pups die verkregen zijn van een zogenaamde broodfokker, in de gehele populatie is geen duidelijk verband (p=0.232) tussen het hebben van een pup met diarree en het afkomstig zijn van een broodfokker. Als we meer gedetailleerd naar de gegevens kijken zien we dat van de 32 er 9 (28.1%) behoren tot de controle groep en 23 (71.9%) tot de groep van de pups met diarree. Zoals eerder al genoemd is bij de paragraaf over de pathogenen zijn er 6 pups (1 control en 5 pups met diarree) overleden die bij een broodfokker vandaan kwamen. De correlatie tussen afkomstig zijn van een broodfokker en kans op overlijden is dus wel aanwezig met een p=0.009.

Verder is er ook gekeken naar de vaccinatiehistorie, wat moeilijk te interpreteren is vanwege het feit dat er pups meedoen van elke leeftijd onder een jaar. De jongste pups met een leeftijd voor 6 weken hebben nog geen entingen gehad en de oudere pups al alle 3 de vaccinaties hebben gekregen. Daarom is er gekeken of er volgens entschema in Nederland (6,9,12 weken) is gevaccineerd met een standaard afwijking van een week. Hier is geen significantie (p= 0.309) uit gekomen. Er is dus geen correlatie tussen het voorkomen van diarree en het niet-gevaccineerd zijn volgens entschema.

Tabel (6) Risicofactoren resultaten icm met pathogenen

Ook is gekeken naar de voeding die de pups hebben gekregen en of dit van invloed kan zijn op het krijgen van diarree. Onderscheid is gemaakt in het voeren van commerciële brokken, met de pot mee eten of rauw voer eten. Hier zijn geen significante verbanden naar boven gekomen en zoals in de univariabele tabel 4 is te zien, heeft het eten van rauw voer zelfs een negatieve Pearson correlatie. Naast de voeding die door de mens wordt verstrekt is er ook gekeken naar de ‘vreemde’ dingen die worden gegeten door de pup. Hieruit blijkt het eten van poep veel voor te komen. Het eten van poep is echter net niet significant (p=0.158) en heeft een negatieve Pearson correlatie. Honden blijken zeer frequent poep te eten, van verschillende diersoorten afkomstig. Na uitwerken van de verschillende soorten feces die zijn geconsumeerd is naar voren gekomen dat enkele pathogenen significant bij een diersoort of groep naar voren komen. Zo lijkt *Giardia* significant vaker voor te komen bij ‘gezonde’ honden die poep eten van andere honden (p=0.039) en bij pups die poep eten van landbouwhuisdieren (voornamelijk bestaande uit koeien en een enkele schapenfeces) (p=0.012 ). Maar ook is *Giardia* significant (p=0.049) bij het eten van hondenpoep bij de pups met diarree. Zelfs het eten van vogelpoep lijkt een verband te hebben met het vinden van *Brillendoosjesgist*, een significantie van p=0.025.

**8. Discussie**

**8.1 Statistische analyse**

***8.1.1. Respondenten***

Dierenartspraktijken werden attent gemaakt op dit onderzoek via eigen netwerken, het klantenbestand van het VMDC te Utrecht, en via nascholingslezingen. Zeker met de PAO (post academisch onderwijs ) lezing zijn veel dierenartsen bereikt. De geografische verspreiding (figuur 2 blz. 23), door middel van de postcodes van de deelnemende pups, vertoonde een concentratie in het westen en midden van Nederland. Het is mogelijk dat de PAO-lezing voor mensen buiten deze regio’s niet bekend was of dat de afstand voor bijwonen van deze lezing een beperkende factor was. Tevens zien we ook dat meer dierenartsen vanuit de steden mee hebben gedaan. Dit kan komen doordat het aanbod van jonge honden die op consult komen groter is in de steden dan erbuiten of omdat het gratis onderzoek in de steden met meer variërende koopkracht of concurrentie aantrekkelijker is. Er bestaat een kans dat meer dierenartsen hadden meegewerkt als er meer landelijke reclame voor was gemaakt, via brochures, KNMvD (Koninklijke Nederlandse Maatschappij voor Diergeneeskunde) website en soort gelijke acties.

Het insturen van zowel een pup met diarree als een controle (gezonde) pup is een voor dierenartsen een moeilijke klus gebleken. Hoewel er na gemaild is naar de praktijken om te vragen of ze alsnog feces van een gezonde pup wilden insturen is dit niet naar verwachting beantwoord. Er zijn slechts 50 (58.8%) case-control setjes opgestuurd door 26 praktijken. Een verklaring hiervoor kan zijn dat het insturen van feces van een pup met diarree voor gratis microbiologisch onderzoek meer profijt geeft voor een dierenarts en dus participatie stimuleert, waarbij juist het insturen van feces van een gezonde hond meer werkdruk bezorgt voor dierenarts en eigenaar. Hieruit kunnen we niet concluderen dat er meer pups met diarree aangeboden worden op een praktijk dan pups die niets mankeren. Veel pups in Nederland komen het eerste levensjaar toch met regelmaat op consult voor vaccinaties (op 6,9,12 weken leeftijd), ontwormen (vaak in combinatie met vaccinatiebezoek), eventueel voor castratie/sterilisatie en andere zaken. Sommige praktijken leken voornamelijk te participeren om gratis diagnostiek te kunnen laten uitvoeren. Deze praktijken zijn helaas niet uit te sluiten, echter had er wel meer controle kunnen zijn op het overmaat aan insturen van alleen feces van pups met diarree, zodat deze praktijken eerder aangesproken hadden kunnen worden.

Dit brengt ons echter op het volgende aandachtspunt. Het is in 9 (4.7%) van de gevallen waargenomen dat de dierenarts bij het invullen van de diarreeklachten <10 dagen heeft ingevuld en de eigenaar >10 dagen. Dit kan komen door miscommunicatie tussen dierenarts en eigenaar. Een andere mogelijkheid is dat de dierenartsen geld wilden uitsparen met het gratis microbiologisch onderzoek en de inclusie criteria wat creatief hebben benaderd.

Bij het geslacht is een relatief constante verdeling te zien per geslacht en gezondheidstoestand. Er zijn iets meer reuen dan teven ingestuurd met een ratio van 1,25:1. Deze ratio bleef voor de reuen en teven gelijk als we de groepen opsplitsten in de case en controle groepen, de nestjes bestonden voor 100% uit cases. Er zijn in totaal dus kennelijk meer reuen dan teven voor deze studie ingestuurd. Uit eerder onderzoek van Stavisky 2011 bleek een significante beschermende correlatie tussen het zijn van een teef en het risico van diarree. Bij ons onderzoek is geen significantie (p=0.71) waargenomen tussen het geslacht en de klacht diarree (univariabele tabel 4 blz. 27).

***8.1.2. Enquêtes***

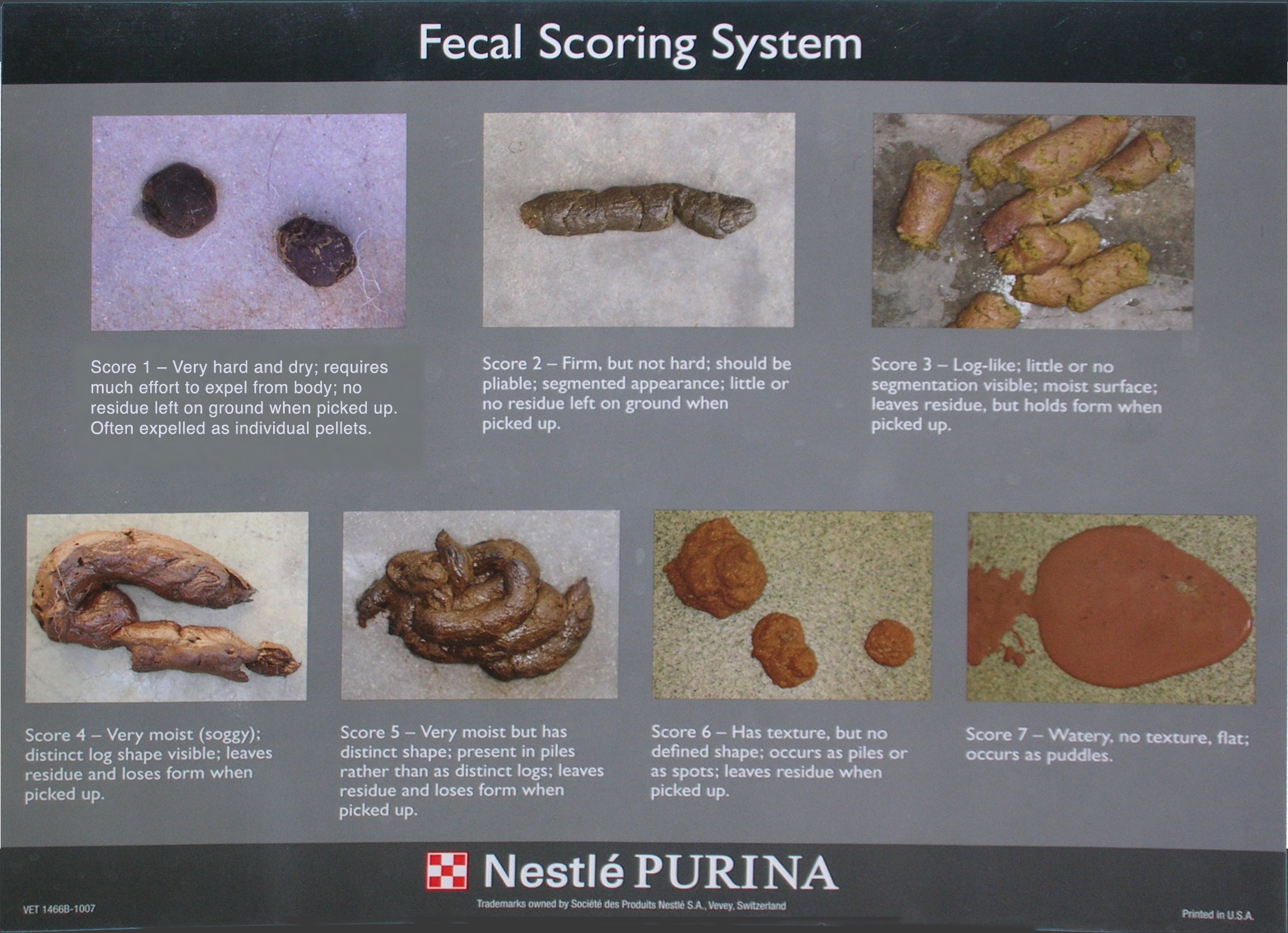
Wat ons vooral is opgevallen bij de ingevulde enquêtes die geretourneerd zijn, dat sommige vragen niet door iedereen volledig hetzelfde zijn geïnterpreteerd. Een goed voorbeeld is het aankruisen van het vakje zieke pup of gezonde pup. Mensen verschillen van mening over de term ziek, 14 (8.3%) mensen is van mening dat wanneer de hond (licht) diarree heeft maar verder niet ziek oogt deze behoord tot de gezonde groep. Beter had gekozen kunnen worden voor de vraag: ‘pup met diarree’ en ‘pup zonder diarree’ en dieren zijn op basis van die vraag opgesplitst in de case-control groep. Er is gekozen voor veel gesloten vragen waarop slechts met ja en nee kan worden geantwoord. Toch bleek dat enkele vragen open werden gelaten. Voor sommige mensen is het blijkbaar niet altijd mogelijk een vraag met ja of nee te beantwoorden. Mogelijk was het verstandig geweest om een extra vakje te maken met onbekend/ niet van toepassing/anders (met mogelijkheid tot uitleg).

De indeling van de enquête bleek ook nog verwarring te geven. Deze bestond uit een algemeen deel, een deel met vragen alleen voor gezonde pups en een deel met vragen alleen voor pups met diarree. De verwijzing stond boven de vragen in een groter lettertype en dik gedrukt, maar toch werden veel vragen door iedereen ingevuld. Dit geeft de indruk dat zowel de eigenaren als de dierenartsen de enquêtes niet nauwkeurig genoeg gelezen hebben. Nadeel van enquêtes is dat je afhankelijk bent van een momentopname, beïnvloedbaarheid en de bereidwilligheid van de respondenten.

Een tegenstrijdig punt werd gevonden in de inclusie criteria bij de controle groep. In de publieksfolder werd vermeld dat controle pups de voorgaande 3 weken geen diarree en/of braakklachten mochten hebben gehad. Nu werd echter in de enquêtes gevraagd naar diarree en braakklachten van de afgelopen maand, dit kan verwarring en een andere interpretatie tot gevolg gehad. Hieruit kan niet met duidelijkheid worden gezien of de inclusie criteria zijn gevolgd vanuit de brochure of die van de enquêtes. Hierdoor zijn deze cijfers wellicht minder representatief in deze studie. Wij hebben in de verwerking de gegevens die vermeld werden in de dierenartsenenquêtes, bij de vraag: ‘heeft de pup afgelopen maand braak/diarree klachten gehad? aangehouden. Er is dus gekozen voor het langste interval, en de meest rechtstreekse vraag.

Achteraf is gebleken dat er andere factoren meer gedetailleerd nagevraagd hadden moeten worden. Een van deze factoren is bloedbijmenging, dit item kon worden ingevuld bij aspect van de diarree. Opvallend was dat 43,6% van de dierenartsen in de enquête melding maakte van bloed bij de feces, veel meer dan wij van te voren hadden verwacht. In deze vraag is niet te bepalen hoeveel bloed bij de diarree zat, een druppel of een plas. Dit is wel bepalend voor de interpretaties van deze bevindingen.

Een andere factor is die gedetailleerder uitgevraagd had kunnen worden, is de consistentie van de diarree. Hierbij is alleen gevraagd naar brijig en waterdun. In vergelijkende literatuur wordt gebruik gemaakt van de Waltham Feces Scoring System, maar er zijn ook andere die een zelfde soort systeem weergeven, zoals Purina fecal Scoring System.



Figuur (4) Purina Fecal Scoring system bron van Foodhill Pet Hospital

Vragen over de voeding moesten duidelijkheid geven of bepaalde voeding mogelijk een risicofactor was voor het krijgen van diarree. Bij elke vraag waren enkele opties aan te vinken, waarbij de opties ‘anders’ vaak is aangevinkt en uitleg is ingevuld. Dit is naar mijn weten ook niet anders mogelijk doordat er zo’n grote variëteit van verschillende producten op de markt is, die niet in een paar algemene groepen verdeeld kunnen worden. Wel had de vraagstelling in sommige gevallen nog specifieker gesteld kunnen worden: bijvoorbeeld de vraag of de hond wel eens poep van andere dieren eet had een tijdfactor kunnen bevatten (heeft de hond de afgelopen maand poep van andere dieren gegeten) Bij vragen over ‘eten’, ‘snacks’ en ‘rauw vlees’ is het niet duidelijk in de groep van pups met diarree of ze deze voedingsmiddelen nog steeds gevoerd kregen terwijl de dieren diarree hadden en werd het gegeven met een interval (1x per week, 1x per dag ingevoegd kunnen worden). Voedingsveranderingen kunnen immers ook een rol spelen bij het verkrijgen van diarree

***8.1.3. Karakteristiek van de klinische diarree***

Zoals al eerder in de discussie van de enquête is beschreven, zijn de vragen over de consistentie van de diarree niet gedetailleerd genoeg geweest. Daarnaast is in onze studie gekozen om de vraag over consistentie van de diarree te combineren met een vraag over bloed-, slijmbijmenging en ook een eventuele zwarte kleur. Voor de studie was het achteraf belangrijk om onderscheid te maken tussen een druppel bloed of een plasje bloedbijmenging. Bij dit laatste aspect zal eerder gedacht worden aan een *CPV* infectie (Decaro 2012) of wellicht een *hemolytische E. coli* infectie. Van de 113 pups die met diarree door de dierenarts zijn ingestuurd bleken 45 pups de vraag “is er sprake van bloedbijmenging” met ja te hebben ingevuld. Bij 40% van de diarreegevallen was er dus sprake van bloedbijmenging in enige wijze. Dit is opmerkelijk veel, helaas is er geen literatuur gevonden die dit kan bevestigen noch kan ontkennen. Niet infectieuze oorzaken van bloed bij de diarree zouden kunnen zijn: het eten corpora aliena, kleine beschadigingen van de maag/darm wand, ontstekingsreactie, enz.

De duur van de diarree mocht niet langer dan 10 dagen bedragen om binnen de inclusie criteria te vallen. Zoals te zien is in figuur 4 blz. 25 gaat het merendeel van de pup eigenaren al na een paar dagen diarree klachten naar de dierenarts. Dit lijkt verstandig want gezien de jonge leeftijd van het dier, en het risico dat pups met diarree snel gedehydrateerd raken is een afwachtend beleid doorgaans bij jonge dieren niet aan te raden. Bij een pup verloopt de kennismaking met een pathogeen doorgaans nog als primaire infectie en zal een infectie naar verwachting niet mild verlopen zoals bij volwassen dieren.

Niet elke eigenaar zal direct met zijn hond naar de dierenarts gaan. Hier speelt de ervaring van de eigenaar mee; is dit zijn/haar eerste hond of niet, vinden ze een kleine verandering van de consistentie al zorgwekkend? Ook is opvallend dat er na 7 dagen een piek ontstaat, een mogelijke verklaring is dat mensen niet precies weten hoelang het al duurt en het afronden tot een week.

Bij 4 kandidaten zijn de gegevens verzameld via de follow up omdat de enquête niet of onvolledig was ingevuld. 3 dierenartsen hebben helemaal niets ingevuld, hier bleek echter dat zij vergeten waren de hele achterkant van deze bladzijde in te vullen. Follow up informatie is gehaald uit de gegevens die in het computersysteem aanwezig waren op de dag van het consult, en is dus betrouwbare geregistreerde informatie die derhalve in de analyse is meegenomen. Om een inschatting te kunnen maken van de impact van de diarree op de pup zijn vragen gesteld aan zowel de dierenarts als de eigenaar. Verschillen tussen eigenaar en dierenarts kunnen voortkomen uit de korte tijd die een dierenarts heeft om een anamnese af te nemen tijdens een consult, waarbij de eigenaar zich meer zal herinneren als deze even de tijd neemt voor de enquête. Miscommunicatie kan ook niet uit worden gesloten. Opvallend is dat ongeveer de helft van de pups met diarree een zieke indruk/malaise maakt en een verminderde eetlust had. Braken, wat in eerdere studie wel als significant gecorreleerd met diarree naar voren is gekomen, blijkt in dit onderzoek niet significant gerelateerd met diarree.

***8.1.4. Antibiotica gift***

De vraagstelling omtrent antibioticagift was tweeledig: bij het deel voor de gezonde pup: ‘Heeft de pup in de afgelopen maand antibiotica gekregen, zo ja welk merk?’ Bij de vragen over de behandeling ‘Werd de hond ten tijde van de monstername behandeld met antibiotica, zo ja naam van werkzame stof’. De 1ste vraag is door de groep met diarree ook meerdere keren ingevuld, omdat er boven staat algemene vragen over de gezondheid van de pup (zie bijlage dierenartsenenquête blz.46) Dit is nogal tegenstrijdig hierdoor is het aannemelijk dat verwarring ontstaat voor de respondenten. Bij de tweede vraag is het woord ‘ten tijde’ ongelukkig gekozen, dit kan namelijk geïnterpreteerd worden als voor de monstername en als na de monstername. De feces hoefden namelijk niet verzameld te worden op consult, eigenaren mochten het ook thuis opvangen en doorsturen naar het VMDC in de retourenvelop. Uit de follow up bleek ook niet in elk systeem van de dierenartsenpraktijk goed te staan of dit voor of na de monstername was gegeven. Hierdoor kan er weinig betrouwbaars vermeldt worden over de antibioticagift in combinatie met de pathogenen. Wel kan gezegd worden dat 37 (32.7%) pups uit de groep van diarree antibiotica kregen, dit lijkt dit aan de hoge kant, hoewel er niet gezegd wordt of de antibiotica curatief of preventief is toegediend. Preventief kan gedacht worden aan een pup, waarbij men beducht is op een secundaire bacteriële infectie (voorbeeld bij *CPV* infecties).

Curatief gebruik van antibiotica bij acute diarree zonder diagnostische onderbouwing lijkt in de praktijk vrij gangbaar. Rondom de monstername wordt immers 37.2% van de pups met diarree met antibiotica behandeld, hoewel in dit onderzoek niet precies te duiden is op welk moment deze antibiotica zijn voorgeschreven. Bij het gebruik van antibiotica curatief kunnen enkele vraagtekens geplaatst worden. Antibiotica kunnen zowel voor parasitaire infecties als bacteriële infecties worden voorgeschreven. Zo wordt TMPS wel voorgeschreven als coccidiostatisch middel, en heeft metronidazol een effectiviteit tegen *Giardia*. Daarnaast hebben antibiotica uiteraard een antibacteriële activiteit.

Er zijn een aantal combinaties van antibiotica in de praktijk gebruikt, die meer of minder voor de hand liggend zijn. Zo is bijvoorbeeld amoxycilline en clavulaanzuur, een geregistreerde combinatie. Deze combinatie kan een versterkende werking geven van de amoxycilline omdat de clavulaanzuur de ß-lactamase inactiveert. De combinatie van amoxycilline met metronidazol, eventueel aangevuld met clavulaanzuur, kan ook verklaard worden doordat dit een spectrumverbreding geeft met bestrijding van zowel aerobe als anaerobe bacteriën. Stomorgyl® is een geregistreerde combinatie van metronidazol en spiramycine, een bacteriocide en een bacteriostatisch antibioticum met een synergistische werking. TMPS met metronidazol wordt ook beschreven als spectrumverbredend, waarschijnlijk is de toevoeging van spiramycine geen bewuste keuze geweest, maar inherent aan het gebruik van het combinatiepreparaat stomorgyl. In plaats van Stomorgyl® had echter ook alleen metronidazol (Metrazol® )gebruikt kunnen worden. Macroliden (zoals Spiramycine ) zijn bacteriostatisch en dienen niet gecombineerd te worden met degeneratief bacteriocide middelen, zoals amoxycilline.

In Nederlands bestaat er wel een verordening, Verordening (EU) nr. 37/2010, voor antibiotica bij voedselproducerende dieren, maar niet bij huisdieren. De Werkgroep Veterinair Antibioticum Beleid van de KNMvD geeft wel richtlijnen aan in een formularium voor hond en kat. Hierbij staat metronidazol eventueel in combinatie met spiramycine als 1ste keus middel bij diarree bij de hond. Fluoroquinolonen mogen in deze indicatie alleen gegeven worden als dit via bacteriologisch onderzoek met ABG in aanmerking komt; het product is 3de keus. Aangezien in 4 gevallen fluoroquinolonen voor de monsterafname waren gegeven bestaat het vermoeden dat bij deze dieren geen ABG heeft plaatsgevonden en hierdoor het geven van dit antibioticum wellicht niet een gefundeerde keuze is geweest. Dit geldt ook voor Cefovecin® (cephalsporine). De andere antibiotica uit de tabel 3 (blz. 26) behoren tot de 2de keus middelen.

In het belang van het actuele antibiotica beleid is dit een interessant onderwerp om verder in te verdiepen met een ander onderzoek.

***8.1.5. Univariabele analyse tabel***

Hier zijn eerst alle variabelen samen gebracht in SPSS waarbij alle binominale variabelen in een correlatietabel tegenover elkaar zijn uitgezet. Hierbij zijn de correlaties met P<0.1 gemarkeerd als mogelijk significant gecorreleerd. Later is bij deze correlaties de biologische plausibiliteit onderzocht (univariabele tabel dik gedrukt) en in meer detail uitgewerkt bij de variabelen die mogelijk logisch te verklaren oorzakelijke verbanden konden hebben. Hier is een meer selectieve significantie (p=0.05) in acht genomen. Als we de univariabele tabel 4 kritisch bekijken zien we 3 opvallende resultaten die niet verder zijn opgewerkt of beschreven. Dit zijn ‘ziekteklachten afgelopen maand’, ‘braken afgelopen maand’ en ‘krijgen van snacks’. De eerste 2 variabelen waarbij gevraagd is naar ziekteklachten en braken zijn dubbel te interpreteren, omdat niet gevraagd is naar welke ziekteklachten dit dier heeft gehad en voor braken bij de control groep een afwijkende periode had (enquêtes vs. inclusie criteria). Volgens de inclusie criteria zijn pups met diarree die langer dan 10 dagen stand hield er uitgehaald. Bij de controle groep mochten de pups 3 weken voorafgaand geen braken of diarreeklachten hebben gehad. Zoals we lezen kunnen hier interpretatiefouten worden gemaakt. Wellicht tellen dierenartsen en eigenaren de dagen van diarree alleen als de feces die achtereenvolgend dun zijn, dus beginnen ze bij diarree met wisselende aard elke keer opnieuw met tellen en heeft men dus eigenlijk te maken met meer chronische diarree. In de controle groep wordt in de inclusie criteria naar 3 voorafgaande weken gevraagd en in de enquête naar de afgelopen maand hierin is een grijs gedeelte waarin gezonde pups toch braak of diarree klachten zouden kunnen hebben gehad en zodanig onterecht in het onderzoek zijn gekomen.

Bij de variabele ‘krijgen van snacks’ is te zien dat deze significant gecorreleerd zijn maar met een negatieve Pearson correlatie. Dit wil zeggen dat de kans dat een pup die snacks krijgt normale feces heeft groter is dan een pup die geen snacks krijgt. Van het eten van snacks zou dus een beschermend effect met betrekking tot diarree uitgaan. Het ontdekken van een biologische plausibiliteit is hier niet gelukt. Hierdoor wordt dit resultaat als een confouder gezien.

***8.1.6. Pathogeen resultaten***

In de feces van zowel de pups met diarree als de controle groep worden, zowel bacterieel, viraal, parasitair als gist agentia gevonden. Er zijn pathogenen die in beide groepen gelijk vertegenwoordigd zijn, zoals *Campylobacter* *spp*., *Toxocara* *Canis*, *Cystoisospora* *spp.* en *Giardia* *spp*. De aanwezigheid van deze agentia in de feces lijkt dus niet gecorreleerd met de aanwezigheid van diarree. Deze 4 pathogenen zijn verder gedetailleerd uitgewerkt waarbij is onderzocht of de hoeveelheid pathogeen uitscheiding wellicht wel gecorreleerd was met de klinische klacht acute diarree. Hiertoe is een score systeem van geen, enkele, meerdere en veel tot zeer veel (bijlage blok 1 blz. 65) genoteerd. De verwachting zou zijn dat wanneer er een grotere hoeveelheid van een pathogeen in de feces aanwezig is er een grotere kans is op diarree. In de tabellen is te zien dat dieren met een score van veel tot zeer veel pathogenen in de feces nog relatief vaak behoren tot de gezonde controle groep (bijlage blok 1).

In het geval van *Campylobacter* is vaker gebleken, uit andere studies, dat een vergelijkbare prevalentie gedetecteerd werd in zowel gezonde als dieren met diarree. Enkele studies tonen echter wel een positieve correlatie aan tussen het hebben van diarree en *Campylobacter*, met name bij dieren < 1 jaar leeftijd (Marks 2011, Burnens 1992) ). Bij deze studies is niet altijd een exact vergelijkbare monstername, verzending en kweekmethode als bij onze studie gebruikt, en deze variaties kunnen natuurlijk van invloed zijn op de resultaten. Wij hebben in deze studie de *Campylobacters* uit een swab met amies charcoal gekweekt. Aangezien *Campylobacter* een fragiele bacterie is die buiten de feces snel zijn replicerend vermogen verliest zal onze methode duidelijk een groter aantal positieven opleveren vergeleken met studies waarbij uit de feces (van enkele dagen oud) *Campylobacters* zijn geïsoleerd. Mogelijk zou het interessant kunnen zijn om te kijken naar de subtypen binnen de *Campylobacter* *spp*., wellicht zijn er subtypen welke meer virulent zijn en dus relatief vaker geassocieerd worden met diarree (Chaban 2010) beschrijft in zijn studie zeer hoge prevalenties positieve dieren die *Campylobacter* uitscheiden (58% gezonde dieren en 97% dieren met diarree). Hij vond dat er *Campylobacter* species waren die meer gecorreleerd zijn met het voorkomen van diarree zoals: *C. coli, C. concisus, C. fetus, C. gracilis, C. helveticus, C. jejuni, C. lari, C. mucosalis, C. showae, C. sputorum and C. upsaliensis.*

Zoals in de tabel 2 (antibioticagift icm pathogenen) is te zien is er duidelijk vermindering van *Campylobacter* positieve dieren in de feces zichtbaar wanneer dieren antibiotica kregen voor de monsterafname. Deze antibioticumgift zou invloed uitgeoefend kunnen hebben op de aantallen en de ernst van de *Campylobacter* excretie in de groep dieren die diarree vertoonden. De correlatie is echter niet zo eenvoudig te onderzoeken, aangezien de dieren zonder diarree ook veel minder vaak antibiotica hadden gekregen. Mogelijk is er dus sprake van een confouder.

Helaas zijn de vragen omtrent de ontworming onvoldoende betrouwbaar ingevuld. Dit maakt het moeilijk om ontworming te kunnen linken aan de lage prevalentie *Toxocara* uitscheiders in de feces. Invloed van ontworming op de resultaten lijkt voor de hand liggend (Overgauw 1997).

Bij *Giardia* is het merendeel van de dieren hoge uitscheider, en zien we desalniettemin geen correlatie met de klacht diarree. De studie van Batchelor 2008 laat zien dat *Giardia* vaak samen gaat met honden die diarree symptomen hebben, wat niet wil zeggen dat zij ook veroorzaker zijn. Vergeleken met andere studies (Sokolow 2005, Tupler 2012) zijn de prevalenties van *Giardia* in onze studie een stuk lager dan verwacht. Mogelijke verklaring hiervoor zou allereerst kunnen zijn omdat de diagnostische methode van invloed op het verschil tussen onze resultaten en de resultaten van Batchelor. Mogelijk wordt in de CSF methode die wij hebben gebruikt minder *Giardia* cysten gevonden dan via andere technieken. Andere detectie technieken zoals ELISA en DFA (direct Fluorescent antibody) kunnen een grotere gevoeligheid geven (Sokolow 2005). Uit het onderzoek van Hamnes 2007 is naar voren gekomen dat de infectiedruk van *Giardia* in de stad hoger ligt dan op het plattenland. Dit is te verklaren doordat er meer mensen/dieren leven op een m2, en fecale contaminatie derhalve groter zal zijn. *Giardia* is niet altijd diersoortspecifiek, dit is assemblage afhankelijk. Sommige *Giardia* assemblages zijn derhalve makkelijk over te brengen via gecontamineerd (grond/sloot) water en het eten van feces van andere dieren (Thompson 2000). De kans hierop lijkt groter op het platteland. Helaas is de geografische verdeling van onze populatie niet specifiek genoeg bestudeerd om betrouwbaar onderscheid tussen een stadse en plattelandsomgeving te kunnen maken. Een andere mogelijkheid voor de lage prevalentie is dat via een *Giardia* snaptest snel een diagnose en behandeling kan worden ingesteld, hierdoor zijn dierenartsen wellicht minder geneigd om deze makkelijk te behandelen pups voor dit onderzoek aan te bieden. De pups waarbij de diagnose (nog) niet met zekerheid te bepalen was, zijn door de gratis diagnostiek eerder aantrekkelijk om op te sturen en dus aan de studie aangeboden. Mogelijk was er in het aanbieden van dieren voor deze studie dus een zekere selectie bias.

Metronidazol is een middel dat voorgeschreven wordt voor onder andere bestrijding van *Giardia*. Nu is bij de antibiotica tabel 3 te zien dat in 30 van de 42 gevallen waarbij antibiotica rondom de monstername zijn voorgeschreven voor metronidazol is gekozen Toch is er geen significante invloed uit dit gegeven af te lezen in de prevalentie van *Giardia* bij de dieren met en zonder diarree. De huidige tendens om *Giardia* als belangrijk primair pathogeen en diarreeverwekker bij de hond te beschouwen dient naar aanleiding van deze studie te worden genuanceerd

Bij *Cystoisospora* spp. lijkt ook geen significant verband te zijn tussen hoeveelheid uitscheiding van oöcysten en diarreeklachten. In ons onderzoek is duidelijk te zien dat *Cystoisospora* *spp.* 3,33 keer meer voorkomt bij pups met diarree dan bij pups zonder diarree. In de studie van Tupler 2012 is een prevalentie gevonden tussen de 2%-4%, in ons onderzoek spreken we van 15,8% (tabel 4). Een mogelijke verklaring hiervoor zou kunnen liggen in de wijze waarop de *Cystoisospora spp*. is gedetecteerd. In de studie van Tupler 2012 is een ander flotatie substraat gebruikt namelijk Natrium nitraat oplossing welke een ander resultaat kan geven dan de ZnSO4 die in dit onderzoek is gebruikt. Ook is er niet bekend of de dieren in de voorafgaande weken zijn behandeld met een antiparasitair middel. *Cystoisospora* kan ook symptoomloos voorkomen wordt vooral gezien bij jonge dieren. In een vervolg onderzoek zou het interessant kunnen zijn om een lineaire regressie te maken tussen de leeftijden en het hebben van diarree.

Uitscheiding van *Campylobacter spp., Giardia spp.* en coccidioden kunnen intermitterend zijn, (Hamnes 2007, Batchelor 2008, Marks 2011 ) net als bij *Salmonella spp*., daarom zouden er voor betrouwbaardere resultaten feces van 3 achtereen volgende dagen verzameld moeten worden. Van sommige monsters was de transporttijd relatief lang. Ook door de tijd tussen de monstername en het verwerken van de feces is het mogelijk dat de prevalentie van sommige agentia is veranderd. Sommige pathogenen zullen verminderd te diagnosticeren zijn, bijvoorbeeld *Giardia* (Hackett 2003). Voor andere pathogenen die vrij omgevingsresistent zijn (*E. Coli, Clostridium perfringens, Salmonella spp., Cystoisospora spp., Toxocara*) zal geen invloed te verwachten zijn. Voor *Campylobacter* *spp*. hebben we dit enigszins kunnen ondervangen door het vervoer van de swab in transport medium

In dit onderzoek is ook gekeken naar *C. perfringens*. Hierin is te zien dat deze wel 3,5 keer meer voorkomt in de groep van de pups met diarree maar nog niet significant gecorreleerd is. Uit eerdere onderzoeken van Marks 2002 is naar voren gekomen dat zowel bij 80% van de dieren met als zonder diarree *C. perfringens* wordt gevonden. Dit omdat *C. perfringens* behoort tot de natuurlijke darmflora van meerdere diersoorten. *C. Perfringens* is een sporenvormende en toxines producerende bacterie. De rol van *CPE* is enigszins onduidelijk in *C. perfringens* geassocieerde diarree, omdat deze ook in 5-14% van de honden gevonden wordt zonder diarree (Marks 2011, Tupler 2012). Wel lijkt er meer overeenkomst te zitten in CPE met acute hemorragische diarree (Marks 2011). In dit onderzoek is alleen gekeken naar een overmaat aan *C. perfringens* in de fecesmonsters, aangezien een overmaat de darmflora balans zal verstoren en diarree kan ontstaan. Wij hebben daarom een veel lagere prevalentie van *Clostridium perfringens* beschreven dan in de eerder genoemde studie waarbij elke *Clostridium perfringens* excretie is vermeld. Voor een volgend onderzoek zou het aan te raden zijn om niet alleen te kijken naar de aantal bacteriën maar juist te kijken naar het verband tussen de gevonden toxines en de fecesmonsters. Mogelijk zou PCR een uitkomst kunnen bieden tussen de vergelijking van de verschillende toxinegenen en de verschillende vormen van diarree.

In dit onderzoek is getest op een reeks veel voorkomende pathogenen die diarree kunnen veroorzaken, waaronder ook *Salmonella* en *Clostridium difficile* behoren. Bij *Salmonella* zijn bij 168 (99.4%) feces monsters uitslagen bekend, hieruit is 1 (0.6%) geval van *Salmonella* ontdekt bij een pup met diarree. Hieruit kan geconcludeerd worden dat er geen betrouwbare resultaten toonbaar zullen worden voor de hele populatie over *Salmonella* als veroorzaker van diarree bij pups in dit onderzoek. In de studie van Marks 2011 zegt men dat *Salmonella* ook frequent wordt gezien bij dieren zonder diarree. Prevalentie ligt tussen de 0 en 3.6% en bij de meeste studies wordt dit vaker gedetecteerd bij dieren die rauw vlees of vis eten. Isolatie alleen is niet voldoende om diagnose *Salmonella* geïnduceerde enteritis eraan te geven.

De lage prevalentie in ons onderzoek zou kunnen komen, doordat er inderdaad weinig pups in Nederland Salmonella hebben, maar een aannemelijker idee is aangezien *Salmonella* een intermitterende uitscheider is dat de kans dat deze met 1 monster gedetecteerd wordt veel kleiner is. Een betrouwbaarder beeld had verkregen kunnen worden door feces gedurende 3 dagen achter elkaar te verzamelen en echter dit was voor deze studie niet haalbaar. Bij *C. difficile* zijn enkele uitslagen bekend, echter te weinig om deze mee te kunnen nemen in de berekeningen voor betrouwbare resultaten waar uitspraken over de gehele populatie kunnen worden gedaan. Wegens tijdgebrek zijn deze in de vriezer op -20°C bewaard deze monsters worden op een later tijdstip nog verwerkt.

*Hemolytische E. coli* wordt wel meer in de diarree groep gevonden maar nog niet significant. Dit is overigens niet vreemd aangezien deel uit maakt van de natuurlijke darmflora. Er zijn in totaal weinig pups met *hemolytische E. coli* gevonden, zoals in de univariabele tabel is te zien zijn er 9 gevallen gevonden in de groep met diarree en een enkele in de controle groep. Wel zijn er combinaties gevonden tussen *hemolytische E. coli* en het hebben van bloederige diarree (p=0.006), dit zijn 6 pups, wellis waar een te klein aantal om een betrouwbare uitspraak te kunnen geven. Hoewel in Bhakdi 1988 beschreven wordt dat de prevalentie van hemolysin producerende *E. coli* ook laag is, tussen 5-10%. Zou het misschien kunnen baten om een andere detectie mogelijkheid te gebruiken. In zijn onderzoek wordt zowel gebruik gemaakt van een bloedagar als een SDS-PAGE immunoblotting techniek.

In ons onderzoek lijkt er een verband te zitten tussen voorkomen van *Giardia* en *Brillendoosjesgisten* met het hebben van diarree. Hierbij moet wel kritisch gekeken worden naar de aantallen die gevonden zijn. Deze aantallen zijn veel te laag om er een betrouwbare uitspraak over te doen en de mogelijkheid bestaat dat we hier te maken hebben met een toevalsbevinding. Vooralsnog ondersteunt dit eerder onderzoek dat de *Brillendoosjesgist* niet een primair pathogeen lijkt te zijn voor het ontstaan van diarree, een oorzakelijke rol lijkt dan men name weggelegd bij dieren met chronische diarree en een andere onderliggende oorzaak. Het vinden van deze gist is doorgaans gecorreleerd met eten van vegetatie of konijnenfeces en de gist wordt gezien als passant. Door de lage prevalentie is deze pathogeen niet veel meer opgewerkt in dit onderzoek, een volgend onderzoek zou misschien meer kunnen uitkomst bieden om verbanden tussen andere pathogenen en risicofactoren te toetsen en te bevestigen.

Bij 5 pups van de controle groep (zonder diarree is *CPV* via PCR aangetoond. Een van deze dieren is afkomstig van een zogenaamde broodfokker. Bij eerdere resultaten (tabel 6 blz. 32) hebben we gezien dat er een significantie bestaat tussen het uitscheiden van *CPV* en de herkomst bij een broodfokker. Op dergelijke bedrijven heerst kennelijk vaker een *CPV* infectie en is er in de omgeving dus veel *CPV*. Degelijke infecties zijn lastig te bestrijden want dit virus is zeer omgevingsresistent.

De controle pup zou dus een subklinische *CPV* infectie kunnen doormaken, waarbij het dier nog beschermd is voor ernstige klinische verschijnselen door de aanwezigheid van maternale immuniteit, of door vaccinatie geïnduceerde immuniteit. Een andere reden voor uitscheiding van *CPV* via de feces is een recente vaccinatie. Wij vaccineren in Nederland met een geattenueerd vaccin. Na vaccinatie is bekend dat dieren enkele weken *CPV*-vaccin, virus via de feces kunnen uitscheiden De PCR kan geen onderscheid maken tussen excretie van een vaccinvirus of een veldvirus (Decaro 2012). In de literatuur is niet bekend hoe lang pups na hersteld te zijn van *CPV* infecties nog *CPV* kunnen uitscheiden. Of dieren die >1 maand geleden een *CPV* infectie hebben doorgemaakt nog virus kunnen uitscheiden is dus niet bekend. Het is dus niet bekend of een eerder doorgemaakte infectie ook een verklaring kan zijn voor het nu nog uitscheiden van *CPV* (Goddard 2010). Predisponerende factoren die faciliterend werken op een *CPV* infectie, of de infectie heftiger kunnen laten verlopen zijn immuundepressie, intestinale parasieten, overbevolking, slechte hygiëne en stressvolle situaties (spenen) of omgeving (Goddard 2010). Onze resultaten omtrent *CPV* infecties en broodfokkers zijn in overeenstemming met deze bevindingen.

*CPV* en *CCoV* kwamen significant vaker samen voor bij pups met diarree, dit is in overeenstemming met meerdere studies zoals Pratelli 2006, Decaro 2008. Bij *CCoV* is de mortaliteit doorgaans laag maar uit meerdere studies blijkt dat de mortaliteit significant groter wordt bij een menginfectie van *CCoV* met *CPV*, maar ook wel in combinatie met *Canine Adenovirus en Canine DistemperVirus*. In dit onderzoek zijn echter te lage aantallen pups overleden om een betrouwbare significantie te bewerkstelligen tussen het voorkomen van een menginfectie van CPV en CCoV en de kans op mortaliteit. De gegevens zijn verkregen door middel van de enquête en de follow-up. Uit de follow-up is echter niet na te gaan of de honden daadwerkelijk zijn overleden aan deze infectie, aangezien de follow-up soms tot 2 jaar na deelname aan het onderzoek is uitgevoerd. Tevens zou met een multivariabele berekening waarbij de ernst van de symptomen is meegenomen een meer definitief en betrouwbaar resultaat kunnen volgen. Het aanwezig zijn van beide pathogenen hoeft niet altijd te betekenen dat er ook interactie plaats vindt. In dit geval zou er een biologisch plausibele interactie plaats kunnen vinden tussen deze 2 virussen. Dit omdat *CCoV* de top van de villi in de dunne darm aantast, waardoor herstel wordt geïnitieerd. De cellen voor herstel bevinden zich in de crypten, deze verhogen de frequentie van celdelingen op om zo de defecte/degenererende cellen in de top van de villi te vervangen. *CPV* zet zijn singlestreng DNA af in de kern, waarna via de mitose van de snel delende cellen in de crypten van de dunne darm replicatie ontstaat (Goddard 2010). Hierdoor lijkt een oorzakelijk verband in theorie tussen *CPV* en *CCoV* en ernst van een infectie waarschijnlijk.

***8.1.7. Risicofactoren resultaten***

Bij het onderzoek naar risicofactoren die de kans op diarree vergroten is gekeken naar verschillende variabelen. In de enquête zijn meerdere vragen aan het bod gekomen zoals het ras en gewicht. Specifieke uitspraken over een raspredispositie voor diarree was in dit onderzoek niet mogelijk door de grote diversiteit aan rassen die opgestuurd waren in dit onderzoek. Daarom is gekeken naar een verschil tussen een rashond of kruising bij het krijgen van diarree. In dit onderzoek is hier geen significant verschil gevonden, Stavisky 2011 vond wel een significantie van p=0.08 OR 1.9 (0.9-3.9 (95% interval)).

Ook is gekeken naar een geslachtspredispositie voor het krijgen van diarree, Stavisky 2011 en Hubbard 2007 beschrijven een verhoogde kans op het optreden van diarree bij dieren van het mannelijk geslacht. Wij hebben in onze studie daar geen aanwijzing voor gevonden (tabel 4 blz. 27). Er werden in deze studie meer fecesmonsters van reuen dan van teven ingezonden, maar er waren geen aanwijzingen dat er geslachtspredispositie was bij mannelijke dieren. Over de broodfokker als risicofactor is in de discussie bij de pathogenen al uitgebreid gesproken. Er lijkt meer verband aanwezig tussen broodfokker en de verschillende pathogenen dan tussen broodfokker als op zichzelf staande risicofactor met het ontwikkelen van diarree. Zoals te zien is in de univariabele tabel is dit niet significant. Een multivariabele berekening zou mogelijk meer verbanden aan het licht kunnen brengen. Pups die afkomstig zijn van een broodfokker lopen meer risico op het oplopen van pathogenen omdat de dier-dichtheid en dus de infectiedruk groter kan zijn. Daarnaast zijn op dergelijke bedrijven vaak veel gevoelige jonge dieren aanwezig waardoor de infectiedruk nog toe zal nemen. Andere bedrijven met een hoge dier-dichtheid, zoals dier-ziekenhuizen en dierenasiels zullen waarschijnlijk ook vaker met diarree uitbraken te maken krijgen.

Verder is er gekeken naar de vaccinatie geschiedenis van de pups. Om hier mogelijke verbanden te kunnen ontdekken is er gekozen om te kijken of er volgens het entschema in Nederland. In Nederland worden pups doorgaans gevaccineerd, volgens een schema van 6, 9 en 12 weken en daarna jaarlijks, tegen gevaarlijke pathogenen waar een pup snel zeer ziek dan wel dood van kan gaan. De entingen bestaan uit *Canine Distemper Virus, Canine Parvo Virus, Leptospirose, Canine Para-influenza-3 virus, en Canine Adenovirus type-2*, als core-vaccines. Verwacht wordt dat vaccinatie de prevalentie van infectieuze verwekkers in Nederland zal beïnvloeden. Het is daarom interessant om te onderzoeken in welke mate deze agentia in de Nederlandse hondenpopulatie (nog) aanwezig zijn, of er andere ziekteverwekkers of andere stammen/ varianten in opkomst zijn waardoor ons vaccinatiebeleid moet worden aangepast Daarnaast kunnen de bacteriologische en virologische stammen verzameld worden voor latere analyse Dit onderzoek dient ook om nieuwe pathogenen zoals *pantroop canine coronavirus* in kaart te brengen, en zeker ook om zoönosen te monitoren.

In deze studie is een standaard afwijking van een week ingebouwd omdat in de enquête niet gevraagd is naar de datum van de vaccinaties zoals ik het vaccinatieboekje zal staan, maar naar de leeftijd in weken waarop deze vaccinaties gegeven zijn. Door de variatie van leeftijden tussen de pups in dit onderzoek, zal de ene pup die volgens entschema is geënt nog maar 2 entingen hebben gehad en oudere pups 3 entingen. Wat ook invloed kan hebben is hoelang na het geven van de vaccinatie de feces zijn afgenomen, zoals al eerder is besproken bij *CPV* wordt bij vaccinatie in Nederland gebruik gemaakt van een zwak gemodificeerd virus wat mogelijk enkele dagen na de vaccinatie een milde diarree kan geven, ook zijn bij de verschillende praktijken gebruik gemaakt van andere merken die op de markt zijn.

Voeding is ook aan de orde gekomen, maar we hebben geen significante verbanden tussen voeding en diarree aangetoond. De enquête vragen omtrent voeding waren helder, maar niet erg specifiek. In onze enquête is niet gevraagd naar voer veranderingen, ook is onbekend hoelang de dieren de voeding hebben gekregen voor de diarree begon? Hebben ze wel eens rauw voer gekregen of eten ze elke dag rauw voer? Zijn de eigenaren direct na het zien van de diarree symptomen overgegaan op ander voer en is er pas dagen erna feces monster afgenomen en opgestuurd? Dit zijn allemaal vragen die van invloed hadden kunnen zijn op de uitslag. In het onderzoek van Stavisky 2011 is ook gekeken naar de rol die bepaalde soorten voeding kunnen spelen bij het ontstaan van diarree. Hierin is wel een duidelijke significantie gevonden in diarree bij pups die zelf gekookt voer krijgen. Net als bij Stavisky (2011 )zien wij bij het voeren van rauw voer geen significante invloed van het eten van rauw voer op het voorkomen van diarree. Er is een trend zichtbaar die een negatieve correlatie doet vermoeden, (dit onderzoek p= 0.186 en in Stavisky 2011 p=0.1 met allebei een OR <1 en een negatieve Pearson correlatie.) In een vervolg onderzoek zou meer gelet moeten worden op een meer helder gedefinieerde vraagstelling om bruikbare resultaten te krijgen.

Stavisky 2011 vond een beschermend effect van het eten van paardenpoep op het voorkomen van diarree. Wij hebben ook naar het eten van poep van verschillende diersoorten/groepen gekeken. Er lijkt wel een significant verband tussen poep eten en het voorkomen van bepaalde pathogenen. Als we kritisch kijken kunnen we zien dat hier met zulke kleine aantallen gewerkt worden dat we deze resultaten alleen kunnen zien als een mogelijk nieuw idee voor een vervolg onderzoek.

**9. Conclusie**

Deze veldstudie presenteert een uitgebreid overzicht van veel voorkomende pathogenen en risicofactoren bij pups met acute infectieuze diarree in Nederland. Deze studie kan dierenartsen helpen bij een betere diagnose en specifiekere behandeling van een pup met diarree. We kunnen niet uitsluiten dat andere variabelen/(risico)factoren invloed kunnen uitoefenen op het wel of niet krijgen van diarree bij een infectie. Onder andere kunnen het gebruik van antibiotica, toepassen van ontworming, type leefomgeving, eten van poep of vreemd voedsel zeker invloed uit oefenen op de aanwezigheid van potentiële pathogenen. Multivariabele analyse zou meer informatie kunnen geven over de samenhang van deze pathogeen met andere pathogenen, risicofactoren die elkaar bijstaan of juist tegenwerken. Dit gaat echter buiten de omvang van deze onderzoekstage.

Hoewel deze studie genoeg ideeën geeft voor onderzoeken in de toekomst, zoals 'is de populatie eerlijk verdeeld over de seizoenen en in welk seizoen je pieken ziet van bepaalde (mogelijk seizoensgebonden) agentia'. Geeft deze studie ook genoeg knel- en verbeterpunten waar in een volgend onderzoek zijn voordeel mee gedaan kan worden.

**10. Referaten**

Batchelor D J, Tzannes S, Graham P A, et al. Detection of endoparasites with zoonotic potential in dogs with gastrointestinal disease in the UK. Transboundery and emerging diseases, Blackwell verlag 2008 55, pp. 99-104

Beutin L,. Escherichia coli as a pathogen in dogs and cats. Vet Res. 1999 30, pp. 285-298

Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, et al. The hemolysin of Escherichia coli. Eur. J. Epidemiol. 1988 4(2), pp.135-143

Buonavoglia, C, Decaro, N, Martella, et al. Canine Coronavirus Higly Pathogenic for Dogs. Emerging infectious diseases 2006 12(3), pp. 492-494

Burnens A P, Angeloz-Wick b, Nicolet J,. Comparison of campylobacter carriage rates in diarrheic and healthy pet animals. J. Vet. Med. 1992 39, pp. 175-180

Butzler J-P,. Campylobacter, from obscurity to celebrity. Clin. Microbiology and Infection 2004 10(10), pp. 868-876

Caccio S M, Ryan U,. Molecular epidemiology of giardiasis. Molecular & biochemical parasitology 2008 160, pp. 75-80

Carter M E, Quinn P J,. Salmonella infections in dogs and cats. CAB international, salmonella in domestic animals 2000, pp. 231-242

Chaban B, Ngeleka M, Hill J E,. Detection and quantification of 14 Campylobacter species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. BMC Microbiology 2010 10(73), pp. 1-7

Daughies a, Mundt H-C, Letkova V,. Toltrazuril treatment of Cystoisosporosis in dogs under experimental and field conditions. Parasitol Res. 2000 86, pp. 797-799

Decaro N, Pratelli, A, Campolo, M., et al. C. Quantitation of canine coronavirus RNA in the faeces of dogs by TaqMan RT-PCR. Journal of Virological Methods 2004 119, pp. 145-150.

Decaro N, Elia G, Martella V, et al. A real-time PCR assay for rapid detection and quantitation of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. Vet. Microbiol 2005 105, pp. 19-28

Decaro N, Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: Viral evolution and pathobiology. Veterinary Microbiology 2008 132, pp. 221-234

Decaro N, Campolo M, Lorusso A, et al. Experimental infection of dogs with a novel strain of canine coronavirus causing systemic disease and lymphopenia. Veterinary Microbiology 2008 128, pp. 253-260

Decaro N, Buonavoglia C,. Canine parvovirus-A review of epidemiological and diagnostic aspects, with emphasis on type 2c. Vet. Microbiology 2012 155, pp. 1-12

Flausino G, Leal P D S, McIntosh D, Amaral L G, et al. Isolation and characterization of Cyniclomyces guttulatus (Robin) Van Der Walt an Scott, 1971 in Dogs in Brazil. Current Microbiology 2012 12, pp. 184-186

Goddard A, Leisewitz AL. Canine parvovirus. Vet Clin Small Anim 2010 40, pp. 1041-53

Griffiths P L, Park R W A,. A review: Campylobacter associated with human diarrhoeal disease. J. of App. Bact. 1990 69, pp. 281-301

Hackett T, Lappin M R,. Prevalence of enteric pathogens in dogs of north-Central Colorado. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 2003 39, pp. 52-56

Hamnes I S, Gjerde B K, Robertson L J,. A longitudinal study on the occurrence of Cryptosporidium and Giardia in dogs during their first year of life. Act vet. Scandinavica 2007 49(22), pp. 1-10

Hubbard K, Skelly B J, McKelvie J, et al. Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. Vet. Rec. 2007 161, pp. 755-757

Junker K, Houwers D J,. Diarree, pupsterfte en Cystoisospora-species (coccidiose). Tijdschr. Diergeneeskd. 2000 125, pp. 582-584

Lee A C Y, Schantz P M, Kazacos K R, et al. Epidemiologic and zoonotic aspect os ascarid infections in dogs and cats. Trends in Parasitology 2010 26(4), pp.155-161

Marks S L, Kather E J, Kass P H, et al. Genotypic and phenotypic characterization of Clostridium perfringes an Clostridium difficile in diarrheic and healthy dogs. J. Vet. Intern med. 2002 16, pp. 533-540

Marks S L, Rankin S C, Byrne B A, Weese J S,. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: Diagnosis, epidemiology, treatment and control. J. Vet. Intern Med. 2011 25, pp. 1195-1208

Mochizuki M, Hashimoto M, Ishida T,. Recent epidemiological status of canine viral enteric infections of Giardia infection in Japan. J. Vet. Med. Sci. 2001 63(5), pp. 573-575

Morse E V, Duncan M A, Estep D A, et al. Canine Salmonellosis: A review and report of dog to child transmission of Salmonella enteriditis. AJPH 1976 66(1), pp. 82-84

Munnich A, Lobke –becker A,. Escherichia coli infections in newborn puppies: clinical an epidemiologic investigation. Theriogenology 2004 62(3-4), pp. 562-575

Overgaauw P A M,. Aspects of Toxocara epidemiology: Toxocarosis in dogs and cats. Crit. Reviews in Microbiology 1997 23(3), pp. 233-251

Overgaauw PA M, Claerebout E (red.),. Dierenarts in praktijk: Parasieten bij hond en kat. Animo Vet. Publishers Haarlem 2002, pp. 32-42; 97-99

He P, Li J, Gong P, et al. Cystoisospora sp. From dogs in China and phylogentic analysis of its 18s and ITS1 gene. Vet. Parasitol. 2012 6396, pp. 1-5

Pratelli A,. Genetics evolution of canine coronavirus and recent advances in prophylaxis. Vet. Res. 2006 37, pp. 191-200

Sævik B K, Skancke E M, Trangerud C,. A longitudinal study on diarrhoea and vomiting in young dogs of four large breeds, Acta Vet. Scandinavica 2012 54(8), pp. 1-9

Schulz B S, Strauch C, Mueller R S, et al. Comparison of the prevalence of enteric viruses in healthy dogs and those with acute haemorrhagic diarrhoea by electron microscopy. J. of Small Anim. Prac. 2008 49(2), pp. 84–88

Skirrow M B,. campylobacter enteritis in dogs and cats; a ‘new’zoonosis. Vet. Res. Com. 1981 5, pp. 13-19

Sokolow S H, Rand C, Marks S L, et al. Epidemiologic evaluation of diarrhea in dogs in an animal shelter. Am. J. Vet. Res. 2005 66(6), pp. 1018-1024

Stavisky J, Radford A D, Gaskell R, et al. A case-control study of pathogen and lifestyle risk factors for diarrhoea in dogs. Prev. Vet. med. 2011 99, pp. 185-192

Thompson R C A,. Giardiasis as a re-emerging infectious disease and its zoonotic potential. Intern. J. for Parasitology 2000 30, pp. 1259-1267

Tupler T, Levy J K, Sabshin S J, et al. Enteropathogens identified in dogs entering a Florida animal shelter with normal feces or diarrhea. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2012 241(3), pp. 338-343

Zicola A, Jolly S, Mathijs E, et al. Fatal outbreak in dogs associated with pantropic canine coronavirus in France and Belgium. J. of Small. Animal Practice 2012 53(5), pp. 297-300

**11. Bijlage**

Onderzoek acute diarree bij pups: vragenlijst dierenarts

**Vragenlijst voor dierenartsen**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Afnamedatum fecesmonsters:** ………………………………………….....................................................… | | | | |
|  | **Oorsprong monsters:** | 1 zieke pup (dier met diarree) | | 0gezonde pup |
| **Gegevens dierenartspraktijk** | | | | |
| **1** | Naam praktijk .......................................................................................................................................... | | | |
| **2** | Naam dierenarts........................................................................................................................................ | | | |
| **3** | praktijkadres  (plak eventueel sticker met adresgegevens in vak rechts) | | 1 straat………………………………………...........…  2 huisnummer…...........................................................  3 postcode……….........................................................  4 woonplaats…….........................................................  5 tel. nummer…...................….....................................  6 fax. nummer…………………………………..……  7 e-mailadres………..................................................... | |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | | Naam **eigenaar** van de pup................................................................................................................... | |
| **2** | Adresgegevens eigenaar | | 1 straat………………………………………....….  2 huisnummer……………………………....….....  3 postcode…………………………………….......  4 woonplaats…………………………………..….  5 tel. nummer………………………………….….  6 fax. nummer………………………………..……  7 e-mailadres………………………………...….....  8 computercode van deze cliënt………………...... |
| **3** | Naam van de **pup** ..................................................................................................................................... | | |
| **4** | Geboortedatum............................................................................................................................................ | | |
| **5** | Ras | | 1 rashond, nl………………………………….......  2 kruising, nl…………………………………….. |
| **6** | Geslacht | | 1 reu  0 teef |
| **7** | Huidig gewicht | | ………….kilo |
| **8** | Komt de pup uit het buitenland? | | 1 ja  0 nee (sla de volgende vraag over)  2 weet niet |
| **9** | Uit welk land vermoedelijk? | | 1…………………………………………………. |
| **10** | Zijn er aanwijzingen dat de pup afkomstig is van een zgn. broodfokker? | | 1 ja  0 nee  2  weet niet |
| **11** | Komt de pup uit een dierenwinkel? | | 1 ja  0 nee  2  weet niet |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Vraag over de vaccinatiestatus van de pup** | | |
| **1** | Op welke leeftijd(en) is de pup ingeënt?  (graag naam fabrikant en merknaam noemen, neemt u eventueel de gegevens uit het vaccinatieboekje over) | 0  pup is (nog) niet ingeënt  1 ..... wk met 1…………………..……….............  2 ..... wk met 2……………….…….……….........  3 ..... wk met 3…………………………..….........  4 ......wk met 4………………….……………......  5 onbekend |

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Vraag over het ontwormen van de pup** | | | | | |
| **1** | | Hoe is de pup ontwormd?  ( u kunt meerdere vakjes aankruisen, graag merknamen vermelden) | 0 pup is niet ontwormd  1 op............wk met 1 ...........................................................  2 op............wk met 2 ...........................................................  3 op............wk met. 3 ...........................................................  4 op............wk met 4  ...........................................................  5 op........... wk met 5 .............................................................  6 op............wk met 6 ...........................................................  7 onbekend | | |
| **Algemene vragen over de gezondheid van de pup**  ***U hoeft deze vragen alleen in te vullen als het een gezonde pup betreft*** | | | | | |
| **1** | Heeft de pup *in de afgelopen maand* gezondheidsklachten gehad waarvoor u bent geconsulteerd? | | | | 1 ja  0 nee |
| **2** | Heeft de pup *in de afgelopen maand* episodes van diarree gehad waarvoor u bent geconsulteerd? | | | | 1 ja ..... keer  0 nee |
| **3** | Heeft de pup *in de afgelopen maand* braakklachten gehad waarvoor u bent geconsulteerd? | | | | 1 ja ..... keer  0 nee |
| **4** | Heeft de pup *in de afgelopen maand* antibiotica gekregen?  (indien ja,graag merk noemen) | | | | 1 ja, nl.....................................................  0 nee |
| **5** | Is de pup *in de afgelopen maand* in de/een praktijk in opname geweest? | | | | 1 ja, wegens...........................................  0 nee |
| **Vervolgonderzoek** | | | | | |
| **1** | Heeft u er bezwaar tegen dat wij u in de toekomst benaderen voor een vervolgonderzoek? | | | 1 ja  0 nee | |
| **2** | Wilt u een nieuw monsternamepakket ontvangen? | | | 1 ja  0 nee | |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***De volgende vragen alleen invullen indien het een zieke pup betreft!*** | | |
| **1** | Is de pup nog in leven? | 1 ja  0 nee \* |
| **2** | Heeft u de pup momenteel in opname/ in opname gehad? | 1 ja  0 nee \* |
| **3** | Heeft de pup braakklachten/braakklachten gehad? | 1 ja  0 nee |
| **4** | Hoe lang bestaan/bestonden deze klachten al? | …....dagen |
| **5** | Hoe ziet/zag het braaksel er uit?  (u mag meerdere vakjes aankruisen) | 1 voedsel  2 water/slijm  3 gal  4 bloed  0 anders, nl................................... |
| **6** | Heeft de pup diarreeklachten/diarreeklachten gehad? | 1 ja  0 nee |
| **7** | Hoe lang bestaan/bestonden deze klachten? | ……..dagen |
| **8** | Hoe ziet/zag de diarree er uit?  ( u mag meerdere vakjes aankruisen) | 1 brijig  2 waterdun  3 met bloed \*  4 zwart  5 met slijm  0 anders, nl.................................... |
| **9** | Is/was er sprake van algehele malaise? | 1 ja  0 nee |
| **10** | Heeft/had de pup last van verminderde eetlust? | 1 ja  0 nee  2 weet niet |
| **1** | Heeft/had de pup neurologische symptomen, zoals ataxie? | 0 nee  1 ja |
| **12** | Heeft de pup koorts, of koorts gehad? | 0 nee  1 ja…………0C |
|  | Zijn/waren er nog overige klachten? | 0 nee  1 ja, namelijk……………………….. |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Indien u bloedonderzoek heeft uitgevoerd, wilt u dan de volgende vragen beantwoorden** | | |
| **1** | Leverfunctiewaarden | 0 niet afwijkend  1  afwijkend |
| **2** | Nierfunctiewaarden | 0 niet afwijkend  1  afwijkend |
| **3** | Totaal eiwit | 0 niet afwijkend  1  afwijkend |
| **4** | Albumine | 0 niet afwijkend  1  afwijkend |
| **5** | Hematocriet | 0 niet afwijkend  1  afwijkend |
| **6** | Leucocytenaantal | 0 niet afwijkend  1  afwijkend |
| **7** | Differentiatie witte bloedbeeld (beschrijf) | 1 ………………………………………………… |
| **8** | Heeft u sneldiagnostiek naar infectieziekten uitgevoerd? | 1 sneltest Giardia uitslag: .........................  2 sneltest CPV uitslag: ........................  3 sneltest Rota uitslag: .........................  4 sneltest Corona uitslag: ........................  5 sneltest Hondenziekte uitslag:.........................  6  anders, nl......................uitslag:........................... |
|  | **Vragen over de behandeling** | |
| **1** | Werd de hond ten tijde van de monstername behandeld met antibiotica ? | 0 nee *(einde enquête)*  1 ja |
| **2** | Naam werkzame stof............................................................................................................. | |
| **3** | Hoeveel dagen heeft de pup antibiotica gehad ten tijde van de monstername? | 1...….dagen **einde enquête, hartelijk dank voor uw medewerking!** |

*11.1.2 Enquête eigenaar*

Onderzoek besmettelijke diarree bij pups: vragenlijst eigenaar

**Vragenlijst voor eigenaren van een pup**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Datum invullen van de vragenlijst**....................................................................................... | | | | | |
|  | **Oorsprong monsters:** | | 1 zieke pup | | 0gezonde pup |
| **Uw persoonlijke gegevens** | | | | | |
| **1** | Naam................................................................................................................................................... | | | | |
| **2** | Adres | | | 2 huisnummer……………………..….............  3 postcode………………………………….....  4 woonplaats……………………………..…...  5 telefoonnummer…………………………….  7 e-mailadres……………………………….... | |
| **3** | Naam dierenartspraktijk........................................................................................................................ | | | | |
|  | | | | | |
| **Algemene gegevens over de pup** | | | | | |
| **1** | Naam van uw pup.................................................................................................................................... | | | | |
| **2** | Geboortedatum van uw pup.................................................................................................................... | | | | |
| **3** | Ras van uw pup | | | 1 rashond, nl…………………………………..  2 kruising, nl………………………………… | |
| **4** | Heeft u een reu of een teef? | | | 1 reu  2 teef | |
| **5** | Hoe zwaar is uw pup momenteel?...................kilo | | | | |
| **6** | Hoe hebt u uw pup verkregen? | | | 1 particulier (bijv. kennissen, familie, eigen fok))  2 erkende fokker (aangesloten bij een rasvereniging)  3 grotere fokker (heeft meerdere rassen)  4 anders, nl...................................................  (bv. krant, asiel, dierenwinkel) | |
| **7** | Komt uw pup uit het buitenland? | | | 0 nee  1 ja, uit...........................................................  2 weet niet | |
| **8** | Op welke leeftijd heeft u de pup gekregen? | | | 1 6 wk  2 7 wk  3 8 wk  4 9 wk  5 10 wk  6 11 wk  7 12 wk  8  anders, nl......wk  0 weet niet | |
| **Woon/leefomgeving pup** | | | | | |
| **1** | | Heeft u nog andere (huis)dieren?(u mag meerdere vakjes aankruisen) | | 1 ja, hond  2 ja, kat  3 ja, paard  4 ja, schaap/geit  5 ja, vogels  6 ja, konijnen/knaagdieren  7 ja, koe/schaap/geit  8 ja, nl…….....................................................  0 nee | |
| **2** | | Loopt uw pup los buiten (bijv. op straat of op een veldje)? | | 0 ja, soms (<25% van de tijd)  1 ja, regelmatig (25-75% v/d tijd)  2 ja, bijna altijd (>75% van de tijd)  3 nee, nooit | |
| **3** | | Gaat u met uw pup naar een (puppy)cursus? | | 0 nee  1 ja | |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Algemene vragen over de gezondheid van uw pup**  ***U hoeft deze vragen alleen in te vullen als uw pup als gezonde pup meedoet aan dit onderzoek*** | | | | | | | | | |
| **1** | | | Heeft uw pup *in de afgelopen maand* gezondheidsklachten gehad? | | | 0 nee  1 ja,nl………………………………………….. | | | |
| **2** | | | Heeft uw pup *in de afgelopen maand* diarree gehad? | | | 0 nee  1 ja …...... keer | | | |
| **3** | | | Heeft uw pup *in de afgelopen maand* wel eens gebraakt? | | | 0 nee  1 ja ........ keer | | | |
| **Algemene vragen over het ontwormen van uw pup** | | | | | | | | | |
| **1** | | | Heeft uw pup een ontwormingskuur gehad? | | | 0 nee (sla de volgende vragen over ontwormen over)  1 ja  3 weet niet (sla de volgende vragen over ontwormen over) | | | |
| **2** | | | Gebruikte u steeds hetzelfde middel voor ontworming? | | | 0 nee  1 ja  3 weet niet | | | |
| **3** | | | Op welke leeftijden heeft u uw pup ontwormd?  (Indien mogelijk naam van het produkt vermelden) | | | 1 ...........wk met.............................................  2 ...........wk met.............................................  3 ...... ....wk met.............................................  4 ...........wk met.............................................  5 ...........wk met.............................................  6 ...........wk met............................................. |
| **4** | | | Op wiens advies heeft u uw pup op deze wijze ontwormd? | | | 1 vrienden/bekenden  2 internet  3 dierenwinkel  4 dierenarts/assistente  5 boeken  6 informatiefolder  0 eigen initatief |

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Vragen over de inentingen van uw pup** | | | | | | | | | | | | |
| **1** | | | | | Is uw pup ingeënt? | | | 0 nee  1 ja, met: .................................................................................................................................................................................................................................................................................................................................  (zie vaccinatieboekje:graag merk vaccin (sticker) vermelden) | | | | |
| **Vragen over de voeding van uw pup** | | | | | | | | | | | | |
| **1** | | | | | Wat krijgt uw pup te eten?  ( u mag meerdere vakjes aankruisen) | | | | 1 blikvoer  2 brokken  3 melk (kunstmelk of moedermelk)  4 eet met de pot mee | | | |
| **2** | | | | | Welke “snacks“( tussendoortjes) krijgt uw pup? | | | | 0 mijn hond krijgt geen snacks  1 hondenkoekje  2 varkensoor  3 bullepees  4 botkluif gerookt  5 botkluif rauw  6 anders, nl……………………….………….. | | |
| **3** | | | | | Welk rauw vlees krijgt uw pup te eten? (indien commerciële rauwvleesvoeding, dan graag merk vermelden) | | | | 0  mijn hond krijgt geen rauw vlees te eten  1 rauwe kip/eendagskuiken  2 rauw varkensvlees (bijv. gehakt)  3 rauw rund/kalfsvlees  4 rauwe pens  5 rauwe worst  6 rauwe vis  7 anders, nl………......................................(merk) | | |
| **4** | | | | | Eet uw hond wel eens poep van andere dieren? | | | | 0 nee  1 ja van andere honden  2 ja van katten  3 ja van konijnen/knaagdieren  4 ja van paarden  5 ja, van ............................................................ | | |
| **5** | | | | Heeft uw pup *in de afgelopen week*  de volgende voedingsmiddelen gegeten? | | | | | 1 rauw vlees  2 melkprodukten  3 rauwe vis  5 varkensoren  6 bullepees  7 hondenkoek  8 botkluif rauw  9 botkluif gerookt  10 poep  0 geen van deze produkten | |
| **6** | | | | Heeft uw pup *de afgelopen 3 weken* iets“vreemds”gegeten (iets wat niet tot de normale voeding van uw pup behoort) ? | | | | | 1ja, nl………………………………………..  0nee/weet niet | |
| **De volgende vragen alleen beantwoorden indien uw pup gezondheidsklachten heeft!** | | | | | | | | | | | |
| **1** | | Is de pup in leven? | | | | | | | 1 ja  0 nee | | |
| **2** | | Heeft/had uw pup last van braken? | | | | | | | 1 ja  0 nee | | |
| **3** | | Hoe lang bestaan/bestonden deze klachten al? | | | | | | | …………...dagen | | |
| **4** | | Worden de klachten minder erg, of erger? | | | | | | | 1  erger  2 verminderen | | |
| **5** | | Hoe ziet/zag het braaksel er uit? (u mag meerdere vakjes aankruisen) | | | | | | | 1 voedsel  2 water/slijm  3 gal  4 bloed  0 anders, nl…………………… | | |
| **6** | | Heeft/had uw pup last van diarree? | | | | | | | 1 ja  0 nee | | |
| **7** | | Hoe lang bestaan/bestonden deze klachten? | | | | | | | ………………dagen | | |
| **8** | | Worden de klachten minder erg, of erger? | | | | | | | 1 erger  2 verminderen | | |
| **9** | | Hoe ziet/zag de diarree er uit? | | | | | | | 1 brijig  2 waterdun  3 met bloed  4 zwart  5 met slijm  6 anders, nl………………….......................…  0 weet niet | | |
| **10** | | Is/was de pup zindelijk? | | | | | | | 0 nee, poept in huis  1 ja, is zindelijk | | |
| **11** | | Laat/liet de pup veel winden? | | | | | | | 1 ja  0 nee | | |
| **12** | | Heeft u de indruk dat uw pup buikpijn heeft/had? | | | | | | | 1 ja  0 nee | | |
| **13** | | Vindt u dat uw pup een zieke indruk maakt? | | | | | | | 1 ja  0 nee  2 weet niet | | |
| **14** | | Heeft/had uw pup last van verminderde eetlust? | | | | | | | 1 ja  0 nee | | |
| **15** | | Zijn/waren er nog overige klachten? | | | | | | | 1 ja, nl.............................................................  0 nee  2 weet niet | | |
| **16** | | Heeft u *in de afgelopen 2 weken* een plek bezocht waar uw pup met meerdere honden samenkwam? (u mag meerdere vakjes aankruisen) | | | | | | | 1  tijdens het uitlaten  2 puppyclub  3 hondenshow  4 groepswandeling  5 uitlaatservice  6 anders, nl………………………………….... | | |
| **17** | | Is uw pup *in* *de afgelopen 2 weken* in contact geweest met honden met diarree/braakklachten? | | | | | | | 1 ja  0 nee  2 weet niet | | |

**Heel hartelijk dank voor uw medewerking!**

**11.2. Telefonische follow-up vragen**

***11.2.1 zieke pup***

Onderzoek acute diarree bij pups: Follow vragen dierenarts

**Aanvullende vragenlijst DAP’s**

Zieke dieren

1. Wat was de consistentie van de diarree op het moment van monstername?
2. Heeft het dier voorafgaande aan de monstername een behandeling gehad?
3. Is er naar aanleiding van de uitslag een behandeling ingesteld?
4. Is het dier nu nog in leven?

!Evenveel ziek als gezond ingestuurd?? Overige vragen? Missende van enquete??

* .
* .
* .
* .
  + 1. ***Gezonde pup***

Onderzoek acute diarree bij pups: vragenlijst dierenarts

**Aanvullende vragenlijst DAP’s**

Gezonde dieren

1. Wat was de reden van het bezoek aan de dierenarts?
2. Heeft het dier voorafgaande aan de monstername een behandeling

(voorgeschreven) gekregen?

1. Hoe gaat het nu?
2. Is er nog een behandeling ingesteld na het terugkrijgen van de (positieve) resultaten.

!Evenveel ziek als gezond ingestuurd?? Overige vragen? Missende van enquete??

* .
* .
* .
* .
* .

**11.3. Protocollen**

**11.3.1. Virologie**

Protocol ontwikkelt voor onderzoek.

Voor het project pups met diarree komen er monsters binnen bij het VMDC. Dit kunnen gezonde dieren zijn, of pups met diarree. De monsters worden op het VMDC ingezet voor parasitologisch en bacteriologisch onderzoek. Ook wordt bij de zieke dieren een sneltest parvo/corona uitgevoerd. Daarna moeten de monsters in de -80 worden opgeslagen voor vervolgonderzoek PCR en in de -20 voor eventueel later onderzoek naar C. difficile.

**Procedure ophalen monsters:**

Elke dag 13.00 uur bellen met VMDC: Wendy (1242) of even langslopen bij de monsterontvangst van het VMDC 3e verdieping W339, om te kijken of er monsters staan.

Eind van de dag, dus rond 16.00 uur: VMDC bellen of er nog monsters zijn bijgekomen! En deze ook verwerken volgens werkprotocol

**Procedure verwerken monsters:**

Gevulde faecespotjes staan bij de monsterontvangst; links op de werktafel bij de deur, direct als je binnekomt bij Wendy. 2 Potjes per dier.Wendy heeft al stickers uitgeprint bij deze potjes. Als je ze niet kunt vinden staan ze in de bacteriologiemonsterkoelkast, naast het gramkleuringsapparaat.

Potjes van zieke dieren zijn gemarkeerd met een gele sticker. Bij twijfel: enquete dierenarts: controle vraag ziek/gezond.Van *alle* dieren moet een fassisi ParCo test worden uitgevoerd volgens handleiding van Mirjam. Sneltesten en handleiding liggen in de doos materialen( zie verder). De sneltest kan worden uitgevoerd in het parasitologie lab kamer W343. Denk aan jas en handschoenen.

Bij + parvotest: Wendy waarschuwen: Wendy waarschuwt Mirjam of microbioloog : uitslag moet direct doorgebeld worden naar de praktijk. Daarna uitslag naar Wendy, zij voert ze in. Anky of Carolien kan dit ook.

**Procedure bewaren monsters in de vriezer:**

**-20:** 1 potje voor bac/para: naar -20vriezer. Op het potje de **datum** noteren. Hiervoor loop je door de klapdeuren tot je aan de linkerhand een koele kamerruimte ziet. In de koele kamer is achterin een vriezerdeur van de -20 vriezerruimte. Hierin staat rechtsonderin, in een stelling een grijze piepschuimbak, met project duijvestijn pups diarree erop. Hierin ligt een A4 waarop een monstersticker geplakt moet worden. Op de sticker even **de datum** noteren. Daarna het buisje , en stickervel in de grijze piepschuim bak stoppen.

**-80:** Met het faecespotje naar kamer W343 parasitologielab. Hier staat op de koelkast een kartonnen doos, met materialen.

**Nodig:**

fles *DPBS zonder Mg en Ca:* in doos

centrifuge: in kamer 343

weegschaal: in kamer 343

centrifugebuizen: in doos

Handschoenen: doos in doos

(Pasteurse pipetten): in doos

(Fiepjes: linker ladeblok middelste la, hergebruik!)

Oranje Cryostats 2 ml: in doos

falconbuizen 50 ml oranje dop: doos

Vortex: kamer 343

Rekjes linker ladeblok onderste la

Vriezerbakjes: *in kolom 10 van rechter -80 vriezer*

Gewicht bruine sarstedt 15 ml faecesbuisjes leeg= 7,1 gram

Gewicht rode hardplastic 20 ml buisjes: 11,6 gram

Zet als eerste de PARCO in. Let op: als er geen reactie komt: met pen of spatel oid op de zijkant van de test tikken tot je een reactie ziet opkomen, de testen, mn de parvo kant, lopen niet lekker door.

Ondertussen:

Monster in bruine potjes van sarstedt( 15 ml) wegen.

dan weet je het gewicht van de faeces; die verdunnen volgens: 1 gram is 1 ml PBS. Als er teveel faeces is: overdoen in falconbuis, met houten spatel( in 2 breken). Daarna wegen en verdunnen.

faeces 1:5 verdunnen met PBS.

Daarna buisje vortexen (ook werkbank rechts) en suspensie overgieten in centrifugebuizen.

Deze buizen afdraaien (minimaal 1 min vol vermogen) . Terwijl deze afdraaien kun je de stickers voor de cryostats en de -20 en het logboek schrijven:

**Op stickers VMDC bijschrijven**

* *datum,*
* *verdunning,*
* ***237*** *( code**lab journaal) ,*
* *MD*
* *Z ( ziek)*
* supernatant pipetteren in cryostat buisjes. Minimaal 3 Maximaal 5 buisjes vullen.
* n

In de groene map vriezermaterialen die op de vriezer ligt zit bij kolom 10 een A4 voor Monsters van Mirjam project diarree. Hier nog even invullen in welke plek welke monsters zitten.

Vervolgens de cryostats in het juiste vriezerbakje in kolom 10 plaatsen. Rechter vriezer achterin vriezerhok( middenruimte achterin)

Schoonmaken paralab: Reinigen materialen met alcohol, rekjes in de sop leggen

Werkblad schoon met alcohol,

*Overige stickers: op buro Mirjam in labjournaal plakken: erbij schrijven wat de parco uitslag is.*

**11.3.2. Bacteriologie**

# ALGEMEEN BACTERIOLOGISCH ONDERZOEK VAN FECES SOPnr: VB45

**Doel**

Het kweken/isoleren van bacteriën uit faeces die darmstoornissen kunnen veroorzaken

**Inleiding**

Met behulp van selectieve voedingsbodems isoleren van potentieel pathogene bacteriën. Tevens

wordt voor een aantal diersoorten ook algemene voedingsbodems ingezet, zodat de verhouding

tussen Gram positieve en Gram negatieve flora bekeken kan worden.

Bij een aantal diersoorten wordt ook een Gram preparaat gemaakt, oa tbv de verhouding Gram

positief/negatief en om eventuele spirocheetvormige bacteriënvast te stellen.

**Benodigdheden**

- Briljantgroenagar modificatie RIVM (RIV) Bio-Trading koelkast 3

- seleniet ophopingvloeistof (SEL) Bio-Trading koelkast 3

- bloedagarschaap anaëroob (BAA) Bio-Trading koelkast 1

- bloedagarschaap aëroob (BA) Bio-Trading koelkast 1

- MacConkey nr. 3 (MAC) Bio-Trading koelkast 2

- evt. Minca (MIN) Bio-Trading koelkast 3

- evt. Campylobacter bloodfree agar(CA37 of CA42) Bio-Trading koelkast 3

- CINagar (voor Yersinia) (CIN) Bio-Trading koelkast 3

- XLD (voor Salmonella en Shigella) (XLD) Bio-Trading koelkast 3

- seleniet ophopingvloeistof (SEL) Bio-Trading koelkast 3

- universele containers Greiner onder stoof 3

- Grampreparaat

- kleurapparaat voor Gramkleuring

- anaërobic jar La 1,2,4

- Anoxomat

- broedstoof 37°C, 42° en 30°C

**Werkwijze**

* voor Salmonella onderzoek een BGA beënten: 1e entstreep faeces m.b.v. swab opbrengen

en uitenten m.b.v. öse.

Minimaal 1 gram faeces in universal doen en 10 ml seleniet toevoegen (verhouding 1:10).

Voor grote huisdieren 10 gram faeces met 100 ml seleniet. Zorg ervoor dat de suspensie

goed gemengd wordt voor het bebroeden.

Let op: bij kippenfaeces eerst 1:10 voorophopen in gebufferd peptonwater, overnacht

bebroeden bij 37°C, dan 1 ml overbrengen in 10 ml seleniet die vervolgens overnacht wordt

bebroed en daarna afgeënt op de BGA.

* algemeen onderzoek BAA, BA, MAC beënten m.b.v. swab 1e entstreep, uitenten m.b.v.

öse.

* Gram preparaat maken op een voorwerpglas. Op het preparaat vermelden van welk

diersoort materiaal afkomstig is. (zie voorschrift Gramkleuring).

* Campylobacterplaten beënten (2 stuks) en een plaat bij 37°C en een plaat bij 42°C

bebroeden (microaerofiel)

* Minca (K99) voor pathogene coli’s bij kalveren en biggen jonger dan 10 dagen. Mincaplaat

beënten en bebroeden bij 37°C. Niet in rek plaatsen, maar apart, omdat ze direct uit

de stoof geagglutineerd moeten worden (zie ook voorschrift agglutinatie E.coli)

* Voor Yersinia onderzoek een CIN agar inzetten. 2x 24 uur bij 30°C bebroeden
* - XLD plaat voor Shigella onderzoek enten. 2x 24 uur bij 37 °C

**Bebroeden**

* BGA, BAA, BA, MAC, XLD, MIN en SEL 2x 18 - 24 uur bij 37 C
* CIN bij 2x 18 – 24 uur bij 30°C
* SEL na 18 - 24 uur afenten op BGA. Deze BGA 18 - 24 uur bebroeden. Niet schudden voor

het afenten. Öse ongeveer 5 cm in de seleniet steken.

* CA37 en CA42 48 uur bebroeden. Indien geen verdachte kolonies nog 2x 24 uur extra

bebroeden; totaal dus 4 dagen.

**Interpretatie**

* Rode kolonies op BGA duiden op Salmonella. Deze kolonies determineren en ABG

bepalen (zie voorschrift Determinatie en ABG)

* (Dubbele) haemolyse op BAA duidt op Clostridium perfringens. Als deze kolonies in

overmaat aanwezig zijn moeten deze gedetermineerd worden en ABG bepalen. (zie

voorschrift determinatie en ABG).

* Bij algemeen onderzoek kijken naar de verhouding tussen Gram positief en Gram

negatieve bacterien.

* Campylobacter groeit als heldere, kleine kolonies, soms zwermend met de entstreep mee.

Zij zijn oxidase positief. Altijd een Gram preparaat maken voor bevestiging. Geen ABG

inzetten

* Yersinia groeit rood op de CIN plaat
* Shigella groeit als “rode dropjes” op de XLD plaat

**Normale darmflora bij**

hond mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

kat mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

aap mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

paard mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

rund mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

varken mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

kip wel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

kalkoen mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

Papagaai mengcultuur van diverse Gram positieve bacteriën (vnl. Streptococcen), geen

coliformen.

Kanarie mengcultuur van diverse Gram positieve bacteriën (vnl. Streptococcen), geen

coliformen.

Kaketoe mengcultuur van diverse Gram positieve bacteriën (vnl. Streptococcen), geen

coliformen.

Konijn mengcultuur van diverse Gram positieve bacteriën, enkele coliformen.

Cavia mengcultuur van diverse Gram positieve bacteriën, enkele coliformen.

Zeehond mengcultuur met zowel Gram positieve als Gram negatieve bacteriën (incl.

coliformen)

**Weergave Glims**

* Bij isolaattesten vermelden welke bacterie je wel of niet gekweekt hebt (Salmonella,

Yersinia, Shigella, Campylobacter)

* Denk eraan dat je bij exoten in de stammenlijst de mengcultuur vermeld als MCV(+aantal).

Bij extern commentaar de omschrijving van de mengcultuur vermelden.

* Bij de andere diersoorten bij toelichting via standaardtekst (insert voor lijst) normale

darmflora, of overmaat Clostridium, of verder faecale flora vermelden.

**Literatuur**

* Cornelisse J.L., Bacteriële ziekten en mycotische aandoeningen bij dieren.

Uitgeverij Bunge, 2e druk, 1993

* Quinn P.J., Clinical Veterinary Microbiology

Uitgeverij Wolfe Publishing, 1994

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| D.J. Houwers | 28062011 |  |
| S.C. Flemming | 31 maart 1998 |  |

**11.3.3. Parasitologie**

# ALGEMEEN PARASITOLOGISCH ONDERZOEK VAN FECES SOPnr: VP60

## Doel

Het aantonen van wormen, proglottiden, wormeieren, larven, (gisten ) cysten en trophozoiten in feces.

## Inleiding

## Het aantonen in feces gebeurt volgens de directe centrifuge-flottatiemethode.

Als flottatiemiddel wordt voornamelijk *zinksulfaat* gebruikt, soms een suikeroplossing en soms NaCL \*.

Zie ook andere voorschriften van specifiek onderzoek op leverbot, longwormlarven, , Cryptosporidium.

## Instrumentarium

* Plastic containers inhoud 40 ml. met deksel lade 6
* Balans met tarreer mogelijkheid. aanrecht
* Roestvrijstalen en houten spatels aanrecht
* Vortex-mixer aanrecht
* Plastic maatbekers 500 ml plank
* Theezeefjes lade 3
* Porseleinen stampers lade 3
* Twee plastic maatflesjes met een volume van 105 resp. 55ml plank
* Aanrecht met 2 spoelbakken voorzien van warm- en koudwaterkraan.
* Centrifugebuizen Greiner lade 8
* Centrifuge met vrij zwaaiende rotor
* Vacuümpomp met afzuigkolf aanrecht
* Twee dispensettes, één met water en één met ZnSO4 aanrecht
* Buizenrekjes plank
* Dekglaasjes 18 x 18 mm magazijn JVD lade 11
* Druppelflesje met ZnSO4
* Voorpwerpglaasjes VWR lade 11
* Microscoop met een micrometeroculair

## Reagentia

* Kraanwater
* Natriumchloride (NaCl) s.g. 1.19 Merck W328
* Suikeroplossing s.g 1.3 Merck W328
* Zinksulfaat (ZnSO4) s.g. 1.34 Merck W328

## Werkwijze

1. Weeg 1 gram feces (runderen 2 gr.) af in een plastic container met deksel.
2. Voeg hier 7 ml kraanwater aan toe (1 ‘pompje’) uit de dispensette met water)\*\*
3. Dit mengen op de Vortex.
4. Voeg nogmaals 7 ml water toe en meng weer op de Vortex.
5. Neem een plasticmaatbeker en leg hierop een theezeefje.
6. Giet de fecessuspensie uit het plasticpotje door het zeefje.
7. Container,dekseltje en zeefje met inhoud goed naspoelen met 105 ml koud kraanwater uit het plastic maatflesje.
8. Indien nodig de suspensie met porseleinen stamper voorzichtig aandrukken.
9. De maatbeker nu rondzwenken en alle inhoud in éen vloeiende beweging boven de spoelbak uitstorten over een centrifugebuisje.
10. Handen spoelen en tevens centrifugebuisje aan de buitenzijde afspoelen met warm water.
11. Centrifugeren gedurende 1 minuut bij 4000 omwentelingen per minuut.
12. Supernatant afzuigen met behulp van de vacuümpomp tot enkele mm boven het sediment.
13. Centrifugebuisje aanvullen met ca. 2 ml ZnSO4 uit de dispensette en dit 3 sec. mengen op de Vortex
14. Buisje nu verder aanvullen met ZnSO4 tot net onder de bovenrand en terugplaatsen in de centrifuge.
15. Met druppelflesje met ZnSO4 voorzichtig aanvullen tot een bolle meniscus zichtbaar is en hierop een dekglaasje leggen. Het glaasje zuigt zich nu vast. (geen luchtbellen)
16. 4 minuten centrifugeren bij 3000 omwentelingen per minuut.
17. Dekglaasje rechtstandig (horizontaal) overbrengen naar een voorwerpglaasje.
18. Centrifugebuisje in een buizenrekje zetten en met 1 a 2 druppels aanvullen tot weer een bolle meniscus ontstaat. 2e dekglaasje erop leggen en laten staan.
19. Het eerste glaasje direct bekijken en daarna het 2e dekglaasje op hetzelfde voorwerpglaasje leggen en vervolgens dit bekijken. Totaal aantal eieren tellen =nt (zie interpretatie).

\*\* Bij harde of droge feces eerst ca. 2 ml. water toevoegen en m.b.v. rvs.spatel grondig suspenderen!

Bij sommige diersoorten is het zelfs nodig om dit een tijd te laten staan om eerst vocht op te laten nemen alvorens het verder kan worden verwerkt.

***\* NB. ZnSO4 wordt i.v.m. het milieu niet afgevoerd. Centrifugebuis leeggieten in erlenmeyer op tafel voor later hergebruik. Centrifugebuis zelf weggooien in gele ziekenhuisafvalbak.***

## Interpretatie

*wormeieren*

* wormeieren bekijken bij 40 - 100x vergroting (4 en 10x objectief). Eventueel opmeten bij 400x (tabel op de microscoop/ O:\DGK\DII\KLIF\Diagn admin\Parasitologie).
* veel wormeieren staan per diersoort afgebeeld op voorbeeldplaten boven het aanrecht.
* zie ook voor afbeeldingen de diverse handboeken en handleidingen op de VMDC Parasitologie afd.

**Het berekenen van het routine e.p.g. gaat als volgt:**

(1 gram feces + 14 ml water) + 105 ml water

Epg = ⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯ = verdunningsfactor 10 x nt

12 ml (volume centrifugebuis)

**bij 1 gram feces**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *Aantal getelde eieren =* nt | *Weergave in RIS MICROS* | *interpretatie* |
| 0-10 | + | enkele tot 100 epg |
| 11-20 | >+ | meerdere tot 200 epg |
| 21-100 | +++ | veel tot 1000 epg |
| >100 | ++++ | zeer veel > 1000 epg |

Wanneer je 2 gram feces gebruikt, b.v. bij runderen , dan moet het aantal eieren dus 2x zoveel zijn om diezelfde epg-waarde te behalen ( de verdunningsfaktor is dan nl. 5 ).

Bij aanlevering van weinig feces, b.v. van kanaries, kun je meestal niet meer dan 0,5 gram gebruiken.De hoeveelheden toegevoegd water zijn hier 7 en 55 ml (ipv 14 en 105)

**Het berekenen van het e.p.g. gaat dan als volgt:**

(0,5 gram feces + 7 ml water) + 60 ml water

Epg = ⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯⎯ = verdunningsfactor 5 x nt

13,5 ml (volume centrifugebuis)

* Bij paarden goed letten op zand in de feces tijdens het rondzwenken (zie punt 9).
* Bij zeer waterige feces ca 3gr. nemen en aanvullen met water tot 15 gr. op de balans.
* Bij veulens tot 1 jaar oud NaCl gebruiken, dit i.v.m. het effect van ZnSO4 op de eieren van S*trongyloides westeri* (zie diagnostiek Paard op de pc).
* Bij bloederige en/of slijmerige feces juist dit gedeelte nemen i.v.m. eventuele cysten en oocysten.
* Soms is het zelfs nodig en zelfs beter, om een rectaal uitstrijkje als natief preparaat te bekijken.(van kalveren met klinische coccidiose is soms geen feces te verkrijgen).
* ZnSO4 heeft een destructieve werking op sommige eieren en cysten, dat is voor de diagnose soms zelfs handig voor de ervaren analist, maar soms weer niet.
* De betrouwbaarheid van een epg. is o.a. afhankelijk van de netheid waarmee gewerkt wordt.

### Cysten, oocysten

* Bij hond en kat kun je oocysten van *Cystoisospora spp*. aantreffen (zie oa. blz 524 van Veterinärmedizinisch Parasitologie van J.Boch en R. Supperen /4. Auflage).
* *Giardia*cysten bij de hond (zie oa. blz 522 van Veterinärmedizinisch Parasitlogie van J.Boch en R. Supperen/4. Auflage). De trophozoit in een feces-directpreparaat bekijken m.b.v. lugol (zie voorschrift Giardia) veel cysten worden in het routinepreparaat al gezien bij 100x vergroting vanwege de typische ZnSo4 verminking. Er naar zoeken echter bij 200 - 400x vergroting.
* Bij kalveren, pinken, geiten en schapen etc., vooral bij lammeren, zien we oocysten van *Eimeria spp*. (zie blz 125 van Veterinärmedizinisch Parasitlogie van J.Boch en R. Supperen /4. Auflage) en blz. 601 en 608 van E.J.L. Soulsby.
* Bij duiven en andere vogels komen ook oocysten van *Eimeria spp*. voor (zie blz 654 van E.J.L. Soulsby).

## Literatuur

* Veterinärmedizinisch Parasitlogie van J.Boch en R. Supperen, 4. Auflage
* Diagnose van verminosen door koprologisch onderzoek van D. Thienpont e.a.
* Helminths, Arthropods and Protozoa of Domesticated Animals by E.J.L. Soulsby, 7th Edition

- Parasitology for Veterinarians van Georgi, 4th Edition

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| E. van Duijkeren |  |  |
| S.C. Flemming | 31-1-2002 |  |

**11. Bijlage**

*11.4.1 Pathogeen resultaten*

**legenda**

|  |  |
| --- | --- |
|  | Tabel van hele populatie |
|  | Tabel van alleen de dieren met diarree |
|  | Tabel van allen de controle groep |
| \* | Fisher's Exact Test: Max 20% van de *Expected Counts* ≤ 5 |

**11.4.1.1. Blok 1: kwantitatieve pathogeen resultaten**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | **diarree** | | **totaal** |
| **Campylobacter** |  | **geen** | **wel** |  |
| **0=geen** | Aantal  verwacht | 30  29.2 | 58  58.8 | **88** |
| **1=enkele** | Aantal  Verwacht | 9  7.0 | 12  14.0 | **21** |
| **2=meerdere** | Aantal verwacht | 12  13.9 | 30  28.1 | **42** |
| **3= tot zeer veel** | Aantal  Verwacht | 5  6.0 | 13  12.0 | **18** |
| **totaal** |  | **56** | **113** | **169** |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** |
| **N=169** | 1.560 | 0.668 | 1.542 | 0.096 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | **diarree** | | **totaal** |
| **Toxocara** |  | **geen** | **wel** |  |
| **0=geen** | Aantal  verwacht | 53  53.3 | 108  107.7 | **161** |
| **1=enkele** | Aantal  Verwacht | 1  1.3 | 3  2.7 | **4** |
| **2=meerdere** | Aantal verwacht | 2  0.7 | 0  1.3 | **2** |
| **3= tot zeer veel** | Aantal  Verwacht | 0  0.7 | 2  1.3 | **2** |
| **totaal** |  | **56** | **113** | **169** |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** |
| **N=169** | 5.150 | 0.161 | 6.157 | 0.172 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | **diarree** | | **totaal** |
| **Cystoisospora** |  | **geen** | **wel** |  |
| **0=geen** | Aantal  verwacht | 50  47.4 | 93  95.6 | **143** |
| **1=enkele** | Aantal  Verwacht | 1  2.7 | 7  5.3 | **8** |
| **2=meerdere** | Aantal verwacht | 1  1.3 | 3  2.7 | **4** |
| **3= tot zeer veel** | Aantal  Verwacht | 4  4.6 | 10  9.4 | **14** |
| **totaal** |  | **56** | **113** | **169** |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** |
| **N=169** | 2.005 | 0.571 | 2.290 | 0.109 |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  |  | **diarree** | | **totaal** |
| **Giardia** |  | **geen** | **wel** |  |
| **0=geen** | Aantal  verwacht | 52  53.3 | 103  103.6 | **155** |
| **1=enkele** | Aantal  Verwacht | 0  1.3 | 1  0.7 | **1** |
| **2=meerdere** | Aantal verwacht | 0  0 | 0  0 | **0** |
| **3= tot zeer veel** | Aantal  Verwacht | 4  4.3 | 9  8.7 | **13** |
| **totaal** |  | **56** | **113** | **169** |

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** |
| **N=169** | 0.540 | 0.763 | 0.850 | 0.056 |

**11.4.1.2. Blok 2: CPV resultaten**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **diarree** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |  |
| **Afwezig** | 49 | 84 | **133** |
| **Aanwezig** | 5 | 26 | **31** |
| **totaal** | **54** | **110** | **164** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=164** | 4.884 | 0.027 | 5.391 | 0.170 | 3.033 | 1.094 | 8.411 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **↓ eetlust** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 43 | 35 | **78** |
| **Aanwezig** | 2 | 22 | **24** |
| **totaal** | **45** | **57** | **102** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **↓ eetlust** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 41 | 35 | **76** |
| **Aanwezig** | 2 | 22 | **24** |
| **totaal** | **43** | **57** | **100** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\***  **↓ eetlust** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=102** | 13.514 | 0.000 | 18.910 | 0.371 | 13.514 | 2.971 | 61.466 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\***  **↓ eetlust** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=100** | 12.886 | 0.000 | 18.011 | 0.366 | 12.886 | 2.829 | 58.692 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Algehele malaise** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 46 | 34 | **80** |
| **Aanwezig** | 5 | 19 | **24** |
| **totaal** | **51** | **53** | **104** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\***  **algehele malaise** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=104** | 9.932 | 0.002 | 10.476 | 0.295 | 5.141 | 1.745 | 15.143 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Braken** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 48 | 35 | **83** |
| **Aanwezig** | 8 | 18 | **26** |
| **totaal** | **56** | **53** | **109** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Braken** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 45 | 35 | **80** |
| **Aanwezig** | 8 | 18 | **26** |
| **totaal** | **53** | **53** | **106** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Braken** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=109** | 5.804 | 0.016 | 5.909 | 0.225 | 3.086 | 1.206 | 7.898 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Braken** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=106** | 5.096 | 0.024 | 5.200 | 0.214 | 2.893 | 1.127 | 7.426 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Bloedbijmenging** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 55 | 29 | **84** |
| **Aanwezig** | 11 | 15 | **26** |
| **totaal** | **66** | **44** | **110** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Bloedbijmenging** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=110** | 4.441 | 0.035 | 4.369 | 0.197 | 2.586 | 1.053 | 6.353 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | | **totaal** |
| **CPV** | **levend** | **dood** |
| **Afwezig** | 115 | 5 | **120** |
| **Aanwezig** | 23 | 8 | **31** |
| **totaal** | **138** | **13** | **151** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  |  | | **totaal** |
| **CPV** | **levend** | **dood** |
| **Afwezig** | 73 | 3 | **76** |
| **Aanwezig** | 18 | 8 | **26** |
| **totaal** | **91** | **11** | **102** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\*** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=151** | 14.662 | 0.001\* | 11.635 | 0.298 | 8.000 | 2.401 | **N=151** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\*** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=102** | 14.485 | 0.001\* | 12.395 | 0.353 | 10.815 | 2.605 | 44.905 |

**11.4.1.3. Blok 3: Pathogeen combinatie**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **cystoisopora** | | **totaal** |
| **CPV** | **afwezig** | **aanwezig** |
| **Afwezig** | 115 | 15 | **105** |
| **Aanwezig** | 20 | 10 | **25** |
| **totaal** | **135** | **25** | **130** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **cystoisopora** | | **totaal** |
| **CPV** | **afwezig** | **aanwezig** |
| **Afwezig** | 72 | 9 | **81** |
| **Aanwezig** | 15 | 11 | **25** |
| **totaal** | **87** | **19** | **106** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* cystoisopora** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=130** | 8.783 | 0.009\* | 7.514 | 0.228 | 3.833 | 1.512 | 9.720 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* cystoisopora** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=106** | 10.837 | 0.002 | 9.531 | 0.305 | 5.333 | 1.851 | 15.371 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **CCoV** | | **totaal** |
| **CPV** | **afwezig** | **aanwezig** |
| **Afwezig** | 102 | 30 | **132** |
| **Aanwezig** | 15 | 16 | **31** |
| **totaal** | **117** | **46** | **163** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **CCoV** | | **totaal** |
| **CPV** | **afwezig** | **aanwezig** |
| **Afwezig** | 59 | 24 | **83** |
| **Aanwezig** | 10 | 16 | **26** |
| **totaal** | **69** | **40** | **109** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* CCoV** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=163** | 10.341 | 0.001 | 9.543 | 0.244 | 3.627 | 1.608 | 8.182 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* CCoV** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=109** | 9.070 | 0.003 | 8.819 | 0.277 | 3.933 | 1.565 | 7.886 |

**11.4.2.1. Blok 4: Broodfokker resultaten**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **broodfokker** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |  |
| **Afwezig** | 86 | 19 | **105** |
| **Aanwezig** | 13 | 12 | **25** |
| **totaal** | **99** | **31** | **130** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **broodfokker** | | **totaal** |
| **CPV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 50 | 10 | **60** |
| **Aanwezig** | 11 | 11 | **22** |
| **totaal** | **61** | **21** | **82** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=130** | 9.944 | 0.002 | 8.905 | 0.267 | 4.178 | 1.651 | 10.576 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CPV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=82** | 9.388 | 0.002 | 8.740 | 0.321 | 5.000 | 1.703 | 14.676 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **broodfokker** | | **totaal** |
| **CCOV** | **geen** | **wel** |  |
| **Afwezig** | 73 | 13 | **86** |
| **Aanwezig** | 26 | 17 | **43** |
| **totaal** | **99** | **30** | **129** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **broodfokker** | | **totaal** |
| **CCOV** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 39 | 6 | **45** |
| **Aanwezig** | 20 | 16 | **36** |
| **totaal** | **59** | **22** | **81** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CCOV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N= 129** | 12.482 | 0.001 | 11.95 | 0.299 | 4.321 | 1.829 | 10.208 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CCOV\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N= 81** | 12.799 | <0.001 | 13.32 | 0.373 | 7.467 | 2.374 | 23.486 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **broodfokker** | | **totaal** |
| **Cysto** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 54 | 14 | **68** |
| **Aanwezig** | 6 | 9 | **15** |
| **totaal** | **60** | **23** | **83** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Cysto\* Broodfokker** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N=83** | 9.529 | 0.004 | 8.634 | 0.321 | 5.786 | 1.763 | 18.990 |

**11.4.2.1. Blok 4: Poep eten resultaten**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **Hondenpoep** | | **totaal** |
| **Giardia** | **geen** | **wel** |  |
| **Afwezig** | 47 | 3 | **50** |
| **Aanwezig** | 2 | 2 | **4** |
| **totaal** | **49** | **5** | **54** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **hondenpoep** | | **totaal** |
| **Giardia** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 74 | 13 | **87** |
| **Aanwezig** | 5 | 4 | **9** |
| **totaal** | **79** | **17** | **96** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Giardia\* Hondenpoep** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N= 54** | 8.534 | 0.039 | 5.076 | 0.369 | 15.667 | 1.601 | 153.34 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Giardia\* Hondenpoep** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N= 96** | 4.871 | 0.049 | 3.910 | 0.220 | 4.554 | 1.078 | 19.237 |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **LH-poep** | | **totaal** |
| **Giardia** | **geen** | **wel** |  |
| **Afwezig** | 49 | 1 | **50** |
| **Aanwezig** | 2 | 2 | **4** |
| **totaal** | **51** | **3** | **54** |

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | **vogelpoep** | | **totaal** |
| **Brillen** | **geen** | **wel** |
| **Afwezig** | 81 | 3 | **84** |
| **Aanwezig** | 9 | 3 | **12** |
| **totaal** | **90** | **6** | **96** |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Giardia\* LH-poep** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N= 54** | 16.264 | 0.012 | 7.823 | 0.481 | 49.000 | 3.022 | 794.52 |

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Brillen\* vogelpoep** | **Pearson Chi-Square** | **Asymp. Sig (2-sided)** | **Likeli**  **hood** | **Contingency Coefficient** | **Odds ratio** | **95% confidence**  **Lower Upper** | |
| **N= 96** | 8.229 | 0.025 | 5.507 | 0.281 | 9.000 | 1.576 | 51.389 |