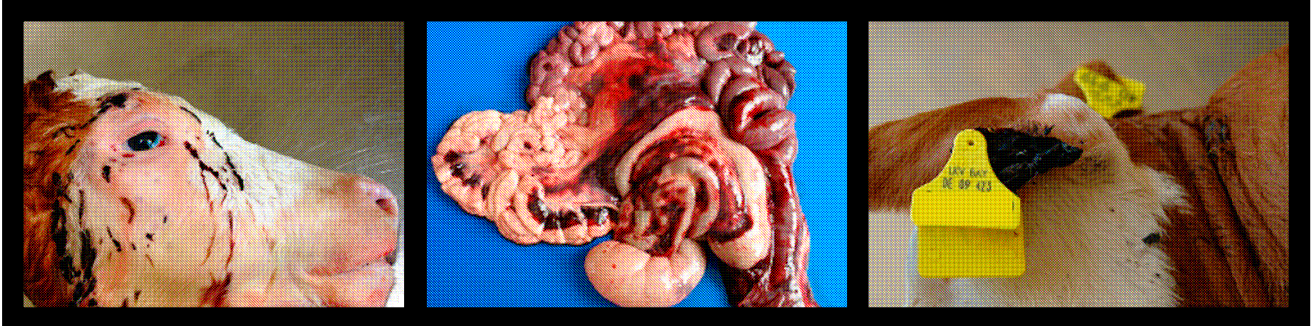


# **Trombocyten bepalingen bij neonatale kalveren t.b.v. het onderzoek naar Bovine Neonatale Pancytopenie**



Universiteit Utrecht



**Research Project Gezondheidsdienst voor Dieren  
Deventer in coöperation with Veterinary Medicine  
University Utrecht**

**Drs. B.J.G. Roelofs**

**November 2010**

**Project Tutors:  
*Gezondheidsdienst voor Dieren:*  
**Drs. A. Smolenaars**  
*Faculteit Diergeneeskunde Universiteit Utrecht:*  
**Dr. W. Gruenberg****

## Inhoudsopgave

<b>INHOUDSOPGAVE</b> .....	2
<b>SAMENVATTING</b> .....	3
<b>INTRODUCTIE</b> .....	4
HYPOTHESE.....	6
DOEL VAN HET ONDERZOEK .....	6
<b>MATERIAAL EN METHODE</b> .....	7
DE NORMAALWAARDEN VAN DE HOEVEELHEID TROMBOCYTEN VAN NEONATALE KALVEREN VAN 0-14 DAGEN OUD.....	7
TROMBOCYTENBEPALINGEN ZIJN NOG STEEDS REPRESENTATIEF AAN DE SITUATIE IN HET DIER, NADAT EEN BLOEDBUISJE IS OPGESTUURD NAAR EEN LABORATORIUM.....	9
<b>RESULTATEN</b> .....	10
DE NORMAALWAARDEN VAN DE HOEVEELHEID TROMBOCYTEN VAN NEONATALE KALVEREN VAN 0-14 DAGEN OUD.....	11
TROMBOCYTENBEPALINGEN ZIJN NOG STEEDS REPRESENTATIEF AAN DE SITUATIE IN HET DIER, NADAT EEN BLOEDBUISJE IS OPGESTUURD NAAR EEN LABORATORIUM.....	15
<b>DISCUSSIE</b> .....	19
<b>CONCLUSIE</b> .....	20
<b>AANBEVELINGEN</b> .....	22
<b>DANKWOORD</b> .....	23
<b>REFERENTIES</b> .....	24
<b>BIJLAGEN</b> .....	25
BIJLAGE 1: RESULTATEN VAN HET ONDERZOEK TOT 14 DAGEN LEEFTIJD .....	25
BIJLAGE 2: RESULTATEN VAN HET VERGELIJKINGSONDERZOEK EDTA VS. ....	29
CITRAAT.....	29
BIJLAGE 3: WERKSHEMA EN STALKAART GEBRUIKT BIJ HET ONDERZOEK.....	30
BIJLAGE 4: BLAND-ALTMANN GRAFIEKEN PER TIJDSTIP.....	31

## Samenvatting

Sinds eind 2008 komen er bij de Gezondheidsdienst voor Dieren in Deventer, Nederland, kalveren binnen. Deze kalveren tussen de 7 en 28 dagen oud worden aangeboden met huidbloedingen over het hele lichaam, vooral aan de kop. Hierbij lopen straaltjes bloed over de kop, rug en poten van het dier. Ook zijn er kalveren die bloederige diarree vertonen.

Het blijkt dat ook elders in Europa vergelijkbare kalveren binnen komen bij de landelijke centra. Er zijn nog geen directe redenen aanwijsbaar. Maar vast staat dat de dieren een tekort aan bloedcellen hebben. De benaming voor deze aandoening is vastgesteld op Bovine Neonatale Pancytopenie. Het tekort aan trombocyten is de eerste reden waarom deze kalveren worden aangeboden. De levensduur hiervan is immers beperkt.

Er zijn echter een tweetal cruciale zaken onbekend:

- Wat zijn de normaalwaarden voor neonatale kalveren?
- Hoe lang, en in welke bloedbuis is het bloedmonster te bewaren zodat er nog een trombocytenbepaling kan worden gedaan?

Dit is nodig om een kalf te kunnen bestempelen als patiënt. Uit onderzoek in een groep van 19 Holstein Friesian kalveren in de kliniek van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht is gebleken dat normaalwaarden in de eerste 14 dagen van het leven van een kalf nogal verschillen ten opzichte van elkaar. Het is dus nogal moeilijk om één normaalwaarde te geven voor het hele tijdsbestek.

Daarnaast is er uit het vergelijkende onderzoek tussen EDTA-bloed en Citraat-bloed vast komen te staan dat deze waarden voor een tijdsbestek van respectievelijk 48 uur en 72 uur bruikbaar zijn om een reële afspiegeling te geven van de situatie in het kalf op het moment van bloedafname. Wel is het duidelijk dat de EDTA-waarde op ieder moment hoger ligt dan deze van Citraatbloed.

## Introductie

In Nederland komen er sinds eind 2008 bij de Gezondheidsdienst voor Dieren regelmatig meldingen binnen van kalveren met spontane huidbloedingen. Deze kalveren tussen de 7 en 28 dagen oud worden aangeboden met huidbloedingen over het hele lichaam, vooral aan de kop. Hierbij lopen straaltjes bloed over de kop, rug en poten van het dier. Ook zijn er kalveren die bloederige diarree vertonen. Tijdens sectie komt naar voren dat deze dieren ook bloedingen vertonen in bijna alle inwendige organen. Ook in andere, ons omringende, landen zoals: Duitsland, België, Frankrijk, etc. zijn er kalveren aangeboden met dezelfde symptomen. Van de reeds aangedane dieren sterft het overgrote deel binnen enkele dagen. [1,2,4]

Bij de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD Deventer) loopt sinds oktober 2008 een pilotstudy naar Bovine Neonatale Pancytopenie. Dit is een basaal onderzoek om de prevalentie in kaart te brengen én een eventuele oorzaak te achterhalen. Tot op heden is de daadwerkelijke oorzaak nog niet gevonden, wel is de pathofysiologische achtergrond van de bloedingen bekend: een trombocytopenie als gevolg van aplastisch beenmerg. Door het aplastische beenmerg is ook de aanmaak van leukocyten verminderd. Dit uit zich in een leukocytopenie. [4,5]

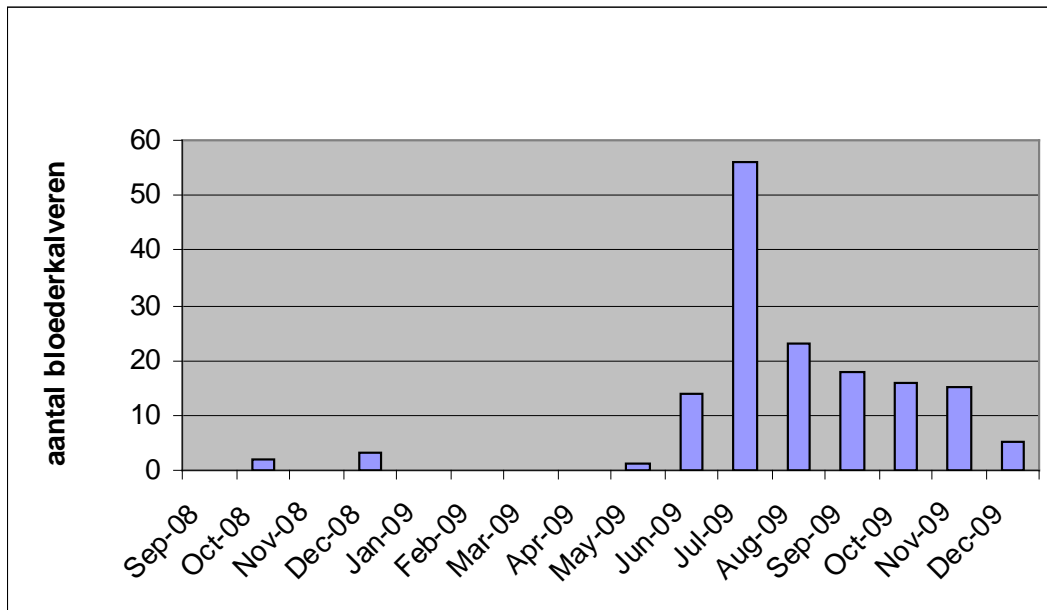
**Tabel 1:** Situatie tot en met november 2009 (GD Deventer) [3]

Land	2006	2007	2008	t/m nov 2009
Nederland	-	-	8 bedrijven	69 (145 kalveren)
België	2 bedrijven	3 bedrijven		30 (84 kalveren)
Groot Brittannië	-	3 bedrijven	6 bedrijven	35 (76 kalveren)
Frankrijk	-	3 kalveren	6 kalveren	37 kalveren
Italië				16
Duitsland München	1981 t/m 2007: 3 kalveren	66 kalveren in zomer 2008 en 2009 Nov 2009: 342 kalveren, 115 bedrijven		
Duitsland Berlijn	-	3 kalveren	15 kalveren	
Noord Ierland				2 kalveren
Spanje				3 kalveren

Bij alle bedrijven met gemelde bloederkalveren is een enquête afgenomen. Hieruit is gebleken dat:

- de verspreiding van de dieren over het land is gelijk aan de rundveedichtheid.
- Het komt zowel bij mannelijke als vrouwelijke dieren voor
- De kalveren hebben verschillende vaders
- geboren uit verschillende rassen (HF, Brown Swiss, Belgisch Blauw, Fleckvieh)
- geboren uit moeders van verschillende leeftijden

Dit wordt ook in andere Europese landen gezien zoals in België en Duitsland. [4,5]



**Grafiek 1:** Aantal meldingen van bloederkalveren in Nederland 2008-2009 (GD Deventer) [6]

Het enige tot nu toe opvallende is dat bij 86% van de getroffen bedrijven is gevaccineerd met een BVD-vaccin, te weten Pregsure BVD<sup>®</sup> van Pfizer. Dit is veel meer dan de gemiddelde vaccinatiegraad voor BVD in Nederland. In België heeft zelfs bij 95% van de gevallen een BVD vaccinatie plaatsgevonden. [4]

Tijdens internationaal overleg in Marseille is naar voren gekomen dat in meerdere landen wordt gedacht aan een immunologische reactie. Dit zou dus kunnen betekenen dat een dier dat biest binnen krijgt, ook antistoffen opneemt die het beenmerg van het kalf zouden aantasten. Hoe het mogelijk is dat er slechts enkele dieren op een bedrijf worden gezien, en beslist niet alle geboren kalveren, is tot op heden ook onbekend. Daarnaast werd er gesproken over de mogelijkheid van het bestaan van subklinische bloederkalveren. Dit zijn kalveren met een te lage hoeveelheid trombocyten, zonder zichtbare symptomen. Indien dit het geval is, vergroot dit de prevalentie en de mogelijkheid voor vervolgonderzoek naar de risicofactoren. [4,5,7] Echter, in de literatuur is weinig bekend over de normaalwaarden van trombocyten bij neonatale kalveren.

## Hypothese

Het doel van deze onderzoeksstage is antwoord te krijgen op een tweetal hypotheses:

**“De normaalwaarden van de hoeveelheid trombocyten van neonatale kalveren van 0-14 dagen oud met een goede betrouwbaarheid bepalen”**

**“Trombocytenbepalingen zijn nog steeds representatief aan de situatie in het dier, nadat een bloedbuisje is opgestuurd naar een laboratorium”**

## Doel van het onderzoek

Om te bepalen waarom de ziekte zich uit op bepaalde bedrijven (bedrijfsrisicofactor) en waarom bij een bepaald kalf van een bepaalde moeder (dierrisicofactor) is verder onderzoek nodig. Om de dierrisicofactor te onderzoeken is een goede case definitie noodzakelijk. Nu is er zoals in de inleiding al is gezegd, gebleken dat er ook kalveren zijn die subklinisch lijden aan deze ziekte, in de vorm van een trombocytopenie. Als dat daadwerkelijk het geval is, zijn dit belangrijke kalveren om onderzoek te doen naar de pathogenese en risicofactoren. Deze dieren bieden dan ook een uitgangspunt voor een case control studie.

Het doel van deze onderzoeksstage is, om voor een eventuele case control studie antwoord te krijgen op bovenstaande hypotheses.

Deze twee stappen zijn van belang om een goed beeld te krijgen van de normaalwaarden van trombocyten in kalveren én van de houdbaarheid van genomen bloedmonsters. Er zijn weinig tot geen normaalwaarden bekend voor neonatale kalveren wat het trombocytenaantal aangaat. Om een kalf echter een subklinisch bloederkalf te noemen is het van belang dat deze normaalwaarden bekend zijn. Omdat tussen het nemen en het bepalen van een bloedmonster onder praktijkomstandigheden normalerwijze enige tijd verstrijkt is het voor de betrouwbaarheid van de studie van belang om te weten hoe lang een dergelijk bloedmonster bewaard kan worden.

## **Materiaal en Methode**

Als onderzoeksdieren zijn hier neonatale Holstein Friesian (HF) kalveren gebruikt. Deze kalveren waren afkomstig uit moederdieren die gehuisvest waren in de kliniek Landbouwhuisdieren van de faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. Deze dieren waren vooraf geselecteerd op de volgende criteria: het dienden dieren te zijn, afkomstig van moeders welke niet waren gevaccineerd met het vaccin Pregsure BVD<sup>®</sup> van Pfizer. Dit de hoge vaccinatiegraad bij moederdieren van Bovine Neonatale Pancytopenie kalveren. Echter een direct verband tussen het vaccin en het ontstaan van Bovine Neonatale Pancytopenie is niet gelegd.

Op 3 juni werd echter door het concern Pfizer bekend gemaakt dat tot nader order de verkoop van dit vaccin in Europa stil ligt.

Om de afstamming van de moederdieren na te gaan, welke allemaal 1<sup>e</sup> kalfs koeien waren, was het noodzakelijk om de verschillende veehouders en vorige eigenaren van de dieren te bellen. Tijdens een korte telefonische enquête werd er gevraagd naar de verschillende ziekte statussen en vaccinatiestrategieën van het bedrijf. Ook werd er aandacht besteed aan de ziektegeschiedenis van de dieren. Door de controle doormiddel van deze enquête kunnen we zeggen dat deze dieren geen van alleen zijn gevaccineerd met het betreffende vaccin voor BVD. Ook zijn er tijdens deze enquêtes geen zorgwekkende aanwijzingen naar boven gekomen om aan te nemen dat deze dieren ziek waren of zijn geweest tijdens het verblijf op de voorgaande bedrijven. Ook ten tijde van het experiment zijn er geen aanwijzingen geweest dat de moederdieren enige vorm van ziekte hebben doorgemaakt.

Het Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium (UVDL) te Utrecht heeft voor het bepalen van de trombocytenaantallen het standaard protocol gebruikt voor de bediening van de bloedanalyser. De gebruikte analyzer is een "ADVIA 120 met Multispecies software" van de firma Siemens Healthcare Diagnostics B.V. te Breda.

Voor het vervolg van "materiaal en methoden" wordt het verslag opgesplitst in een tweetal hoofdlijnen. Dit vanwege de verschillende aanpak per onderzoeksvraag. Dit zal zijn: "De normaalwaarden van de hoeveelheid trombocyten van neonatale kalveren van 0-14 dagen oud" en "Trombocytenbepalingen zijn nog steeds representatief aan de situatie in het dier, nadat een bloedbuisje is opgestuurd naar een laboratorium"

## **De normaalwaarden van de hoeveelheid trombocyten van neonatale kalveren van 0-14 dagen oud**

Voor dit onderzoek werden 19 kalveren gebruikt van de beschreven runderen in de inleiding van "materiaal en methoden". Van deze kalveren zijn er 18 geboren door middel van een normale partus zonder complicaties. Bij een koe werd voorafgaand aan de partus een torsio uteri vastgesteld, maar het gezond geboren. Één dier is ter wereld gekomen met een sectio caesaria zonder verder complicaties.

Voor ieder kalf werd er volgens een vastgesteld schema (zie als bijlage 3) bloed afgenomen in een Citraat-Bloedbuis door middel van het vacutainer systeem. De keuze voor citraat is gemaakt op basis van bevindingen bij andere diersoorten, en op advies van het Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium (UVDL) in Utrecht. Zij hebben bij andere diersoorten vergelijkbare bloedonderzoeken gedaan naar trombocyten. Hieruit is gebleken dat citraat het beste anti-coagulans is. [8, 10]

Voor wat de monstername betreft werd dit gedaan bij de kalveren uit de V. Jugularis. Om te zorgen dat de dieren allemaal een gelijke uitgangsbasis hadden is er gekozen voor een gestandaardiseerd biestprotocol. Dat wil zeggen dat de dieren voordat ze respectievelijk 2, 6 en 12 uur oud waren 2 liter biest van de eigen moeder kregen. Dit om te voorkomen dat de hoeveelheid antistoffen invloed zou kunnen hebben op de onderzoeksresultaten. Bij een paar dieren was het het geval dat het moederdier niet voldoende biest, of biest van onvoldoende kwaliteit produceerde. In dit geval is er gekozen voor biest van een andere bekende moeder. Dit was iedere keer afkomstig van een andere koe welke in de proef ook als moederdier diende.

Tijdens het verloop van de proef werd er tot op 14 dagen leeftijd van ieder kalf bloed afgenomen.

Tijdens de looptijd van de proef zijn er een aantal behandelingen bij enkele kalveren noodzakelijk geweest, bij een tweetal kalveren is er een infuus aangebracht deze ernstige uitdrogingsverschijnselen vertoonden als gevolg van diarree. In het uitslagenblad (bijlage 1) is dit duidelijk aangegeven door de zieke dieren te merken in de kolom met een 1 en niet zieke dieren met een 0. Ook in de twee voorafgaande én navolgende dagen, voordat of nadat het dier ziekteverschijnselen vertoonde, is het dier aangemerkt als ziek. Tevens is in deze bijlage te zien wat er daadwerkelijk aan behandelingen is toegepast.

Één dier is tijdens de proef opgemerkt als zijnde beiderzijds blind. Dit dier is voor het co-schaponderwijs gebruikt. Hierbij is na het testen van bloedmonsters op antigeen vast komen te staan dat dit dier géén drager van het BVD-virus is.

Alle bloedmonsters zijn zo snel mogelijk, doch uiterlijk binnen 72 uur geanalyseerd in het Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium



van de faculteit Diergeneeskunde te Utrecht. De trombocyten werden geteld, en deze aantallen zijn terug te vinden in bijlage 1.

Om de uitslagen te analyseren werd er gebruik gemaakt van de Mixed Models methode. Het programma dat hiervoor werd gebruikt was SPSS Versie 16.1. Door deze mixed models analyse is het mogelijk om de AIC en daarmee het beste model te bepalen. Aan de hand daarvan is het mogelijk om te bewijzen of de resultaten in het verloop van de tijd daadwerkelijk van elkaar verschillen en wat de invloed van bijvoorbeeld ziekte en tijd is.

## **Trombocytenbepalingen zijn nog steeds representatief aan de situatie in het dier, nadat een bloedbuisje is opgestuurd naar een laboratorium**

Voor dit deelonderzoek werden bloedmonsters gebruikt van 5 kalveren. Deze 5 kalveren waren gezonde dieren, uit welke ook in het andere deelonderzoek hebben deelgenomen. Ten tijde van de monsternamen waren deze kalveren 12 dagen (1 dier), 13 dagen (3 dieren) en 14 dagen (1 dier) oud. Deze leeftijd is gekozen omdat er dan nagenoeg geen neonatale effecten meer zijn. Er zijn namelijk in de eerste levensdagen veel zaken die veranderen bij het kalf. Het drinkt namelijk zijn eerste biest, en later melk. De hele vochtbalans van het kalf verandert. En het is ook aannemelijk dat dit een effect heeft op de bloedwaarden, daar deze afhankelijk zijn van de mate van hydratatie. Daarnaast is dit ook de leeftijd waarop Bovine Neonatale Pancytopenie wordt gezien bij de patiënten. [4,9]

Doordat zowel in het onderzoek, als in de praktijksituatie de bloedbuizen niet direct na monsternamen geanalyseerd worden is het noodzakelijk om te weten of de laboratoriumuitslagen nog betrouwbaar zijn na respectievelijk 0, 6, 24, 48 en 72 uur.

Om dit te bepalen voor zowel Citraatbuizen (vacutainer) als EDTA-buizen (vacutainer) kunnen we bepalen welke buizen betrouwbare resultaten geven over langere tijd na monsternamen.

De Citraatbuizen werden gebruikt bij de gehele monsternamen in de proef. De EDTA-buizen worden in de praktijk standaard toegepast bij onderzoek naar trombocyten. Om ook in de praktijk te kunnen vertrouwen op deze resultaten is het van belang dat de vergelijking wordt gemaakt tussen EDTA en Citraat.

De proef werd als volgt opgezet: bij ieder dier werden twee bloedbuizen afgenomen met het vacutainer systeem. Dit was één buis EDTA en één buis Citraat. Deze monsters werden vervolgens bepaald in het Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium te Utrecht. De methode van bepalen was gelijk aan die bij de vorige deelvraag. Met dit verschil dat er telkens uit dezelfde buis werd bepaald. Dit om de

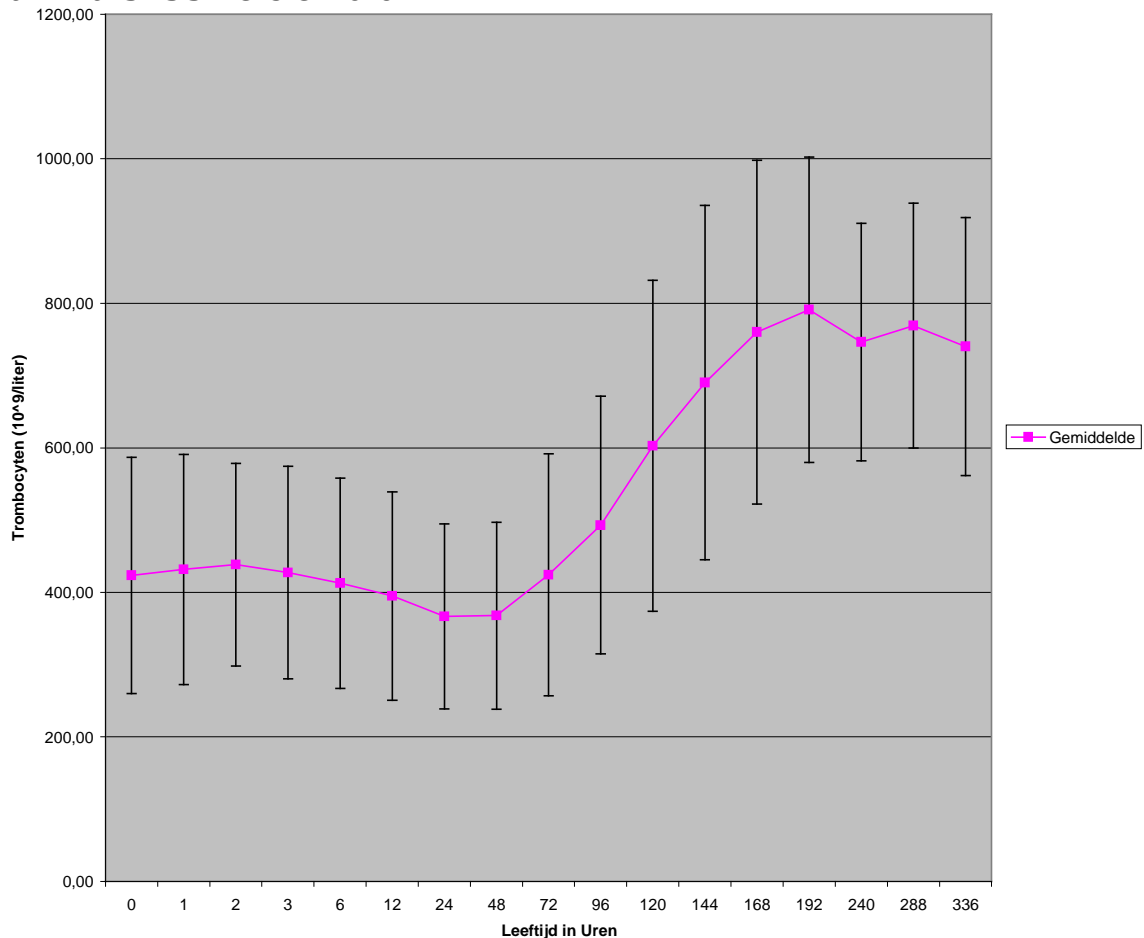
resultaten in de tijd te kunnen vervolgen. De Citraat-buis werd bepaald op 0, 6, 24, 48 en 72 uur na inzending. De EDTA-buis werd bepaald op 0, 6, 24 en 48 uur na inzending. Allemaal in hetzelfde laboratorium onder dezelfde omstandigheden. De resultaten van deze monsternamen zijn te vinden in de bijlagen. (Bijlage 2)

## **Resultaten**

De resultaten van beide deelonderzoeken worden hier weergegeven. De twee verschillende onderzoeken zijn verweven met elkaar om de betrouwbaarheid aan te geven tussen beide resultaten en later in de praktijksituatie in Nederland en het buitenland.

## De normaalwaarden van de hoeveelheid trombocyten van neonatale kalveren van 0-14 dagen oud

De totale uitslagen van de hele proeven, dat wil zeggen de resultaten die uit het laboratoriumonderzoek zijn gebleken, zijn terug te vinden in de bijlagen. (Bijlage 1) Hier is per dier te zien wat de exacte waarden voor de Trombocytenbepalingen zijn per tijdstip. Om deze resultaten te kunnen gebruiken, is het noodzakelijk hier analytisch werk aan te verrichten. In dit geval is er gebruik gemaakt van het Mixed-Models model, met het programma SPSS versie 16.0.



**Grafiek 2:** Het gemiddeld aantal trombocyten en 95% referentie interval (gem +/- 2\*sd) per leeftijdscategorie (in uur na geboorte).

In grafiek 2 is voor ieder tijdstip waarop bloed is afgenomen een gemiddelde waarde voor alle kalveren af te lezen. Tevens is hier zichtbaar het interval waarbinnen zich 95% van alle kalveren bevinden. Met andere woorden dit geeft de spreiding binnen een bepaald tijdstip aan.

Naast deze grafiek zijn er ook andere grafieken per tijdstip bekend, met het 95% interval. Deze zijn voor ieder tijdstip te vinden in de bijlagen.

**(Bijlage 4)**

Belangrijk is deze grafiek met het 95% interval, omdat dit de definitie is voor het bepalen van normaalwaarden voor de trombocyten aantallen bij deze kalveren. [10, 11] Dit interval met een 2,5% marge in de resultaten aan zowel de onderkant als de bovenkant is een internationaal geaccepteerd getal voor de bepaling. Dit is ook in cijfers weergegeven in de onderstaande tabel, tabel 2.

**Tabel 2:** Per tijdstip het 95% betrouwbaarheidsinterval.

TIJD STIP	Mean	Std. Error	df	Estimates <sup>a</sup>	
				95% Confidence Interval	
				Lower Bound	Upper Bound
0	423.632	51.551	55.345	320.336	526.928
1	438.464	49.423	48.487	339.118	537.810
2	438.316	47.440	43.534	342.679	533.953
3	427.421	45.860	40.852	334.794	520.048
6	411.049	44.654	39.893	320.792	501.306
12	394.947	43.444	39.074	307.078	482.817
24	373.501	42.654	39.825	287.282	459.720
48	367.789	41.786	40.221	283.351	452.228
72	424.316	41.170	41.468	341.201	507.431
96	493.053	40.664	43.010	411.047	575.058
120	602.895	40.249	44.753	521.816	683.974
144	690.368	39.911	46.615	610.060	770.677
168	760.053	39.635	48.527	680.383	839.722
192	791.105	39.410	50.432	711.964	870.246
240	757.486	39.430	53.243	678.409	836.564
288	777.796	39.399	55.384	698.851	856.742
336	746.910	39.358	57.124	668.100	825.720

a. Dependent Variable: UITSLAG TROMBOCYTEN (109/liter).

Naast de waarden die uit dit onderzoek blijken is noodzakelijk om te weten of de waarden onderling ook sterk wisselen in jonge kalveren, dit om met zekerheid uitspraken over de resultaten te doen. Met andere woorden, zijn de waarden die gevonden zijn op tijdstip 240 significant verschillend van de waarden gevonden op tijdstip 192 (48 uur of 2 dagen

eerder)? Dit is van belang bij de interpretatie van de laboratoriumuitslagen die je krijgt bij het insturen van bloedmonsters.

Het blijkt dat de uitkomsten onder de 19 kalveren in het verloop van de tijd onderhevig zijn aan behoorlijke schommelingen in de waarden. Je ziet ook in grafiek 2 al een toenemende regressielijn, en vooral vanaf tijdstip 72 een toenemende waarde. In tabel 3 blijkt dan ook dat de waarden vanaf tijdstip 96 uur significant verschillen ten opzichte van iedere voorgaande waarde.

**Tabel 3:** Paarsgewijze vergelijking van de trombocytenaantallen.

Pairwise Comparisons <sup>b</sup>							
(I) TIJD STIP	(J) TIJD STIP	Mean Difference (I- J)	Std. Error	df	Sig. <sup>a</sup>	95% Confidence Interval for Difference <sup>a</sup>	
						Lower Bound	Upper Bound
1	0	14.833	18.116	278.173	1.000	-39.175	68.840
2	0	14.684	23.303	231.279	1.000	-54.912	84.281
3	0	3.789	26.928	206.343	1.000	-76.735	84.313
6	0	-12.583	29.707	199.793	1.000	-101.452	76.287
12	0	-28.684	31.491	188.301	1.000	-122.962	65.594
24	0	-50.131	33.140	180.250	1.000	-149.403	49.142
48	0	-55.842	34.151	165.344	1.000	-158.270	46.586
72	0	.684	35.064	152.498	1.000	-104.615	105.983
96	0	69.421	35.787	140.249	.870	-38.199	177.041
120	0	179.263*	36.360	129.208	.000	69.753	288.773
144	0	266.737*	36.818	119.594	.000	155.676	377.797
168	0	336.421*	37.185	111.395	.000	224.084	448.758
192	0	367.474*	37.479	104.485	.000	254.082	480.866
240	0	333.855*	37.926	100.355	.000	218.999	448.710
288	0	354.165*	38.235	95.760	.000	238.233	470.096
336	0	323.279*	38.468	91.590	.000	206.504	440.053

Based on estimated marginal means

a. Adjustment for multiple comparisons: Bonferroni.

\*. The mean difference is significant at the .05 level.

b. Dependent Variable: UITSLAG TROMBOCYTEN (109/liter).

Omdat het bij normaalwaarden extra van belang is dat de data afkomstig zijn van zieke, normale dieren. In dit onderzoek is dan ook nauwkeurig bijgehouden of een bepaald dier ziek dan wel gezond zou zijn. Dit is aangemerkt met een getal zoals in bijlage 1 te zien is. Om zeker te weten of ook de resultaten van de "zieke" dieren meegenomen kan en mag worden in de totaalresultaten moet er eerst een test worden gedaan of de resultaten verschillen van de normale dieren. Dit is gedaan door middel van de analyse met de mixed models. Het blijkt hieruit dat de zieke dieren niet afwijken van de gezonde dieren met betrekking tot de

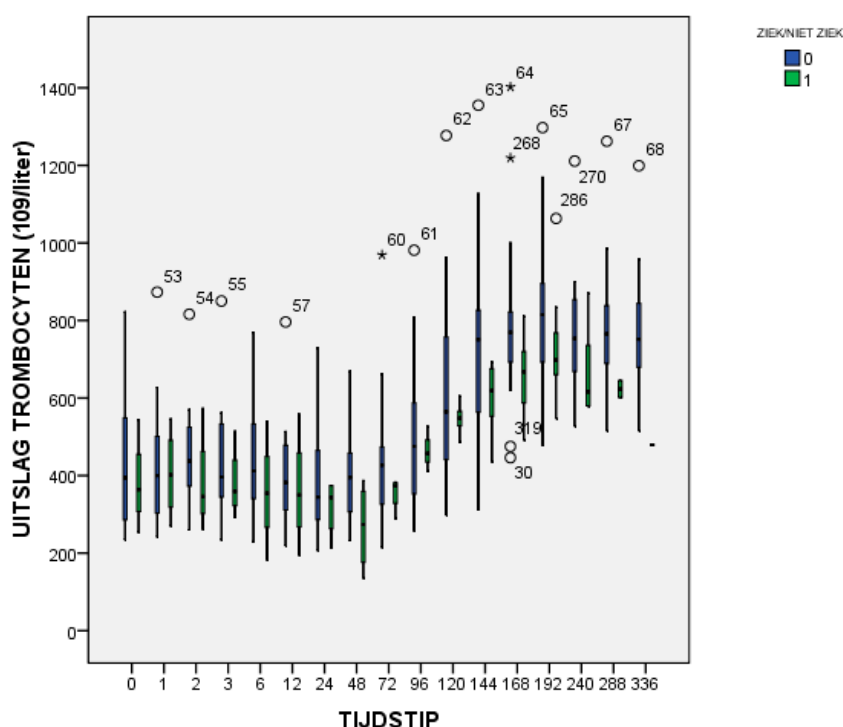
trombocytenaantallen. Met andere woorden het al dan niet ziek zijn heeft geen invloed op de hoeveelheid getelde trombocyten door het laboratorium. In tabel 4 en grafiek 3 is dit weergegeven. In de tabel is te zien dat het model geen significantie aantoon, alleen voor de al gegeven significantie op tijdstip.

**Tabel 4:** Output met het Mixed Models model, de Fixed Effects. Je ziet dat alleen de significantie met betrekking tot het tijdstip wordt aangetoond. De andere Fixed Effects hebben geen invloed op de variabele: De Trombocyten uitslag.

**Type III Tests of Fixed Effects<sup>a</sup>**

Source	Numerator df	Denominator df	F	Sig.
Intercept	1	31.878	200.406	.000
TIJDSTIP	16	156.501	10.393	.000
ZIEKNIETZIEK	1	172.285	.482	.489
TIJDSTIP * ZIEKNIETZIEK	16	171.774	.794	.691

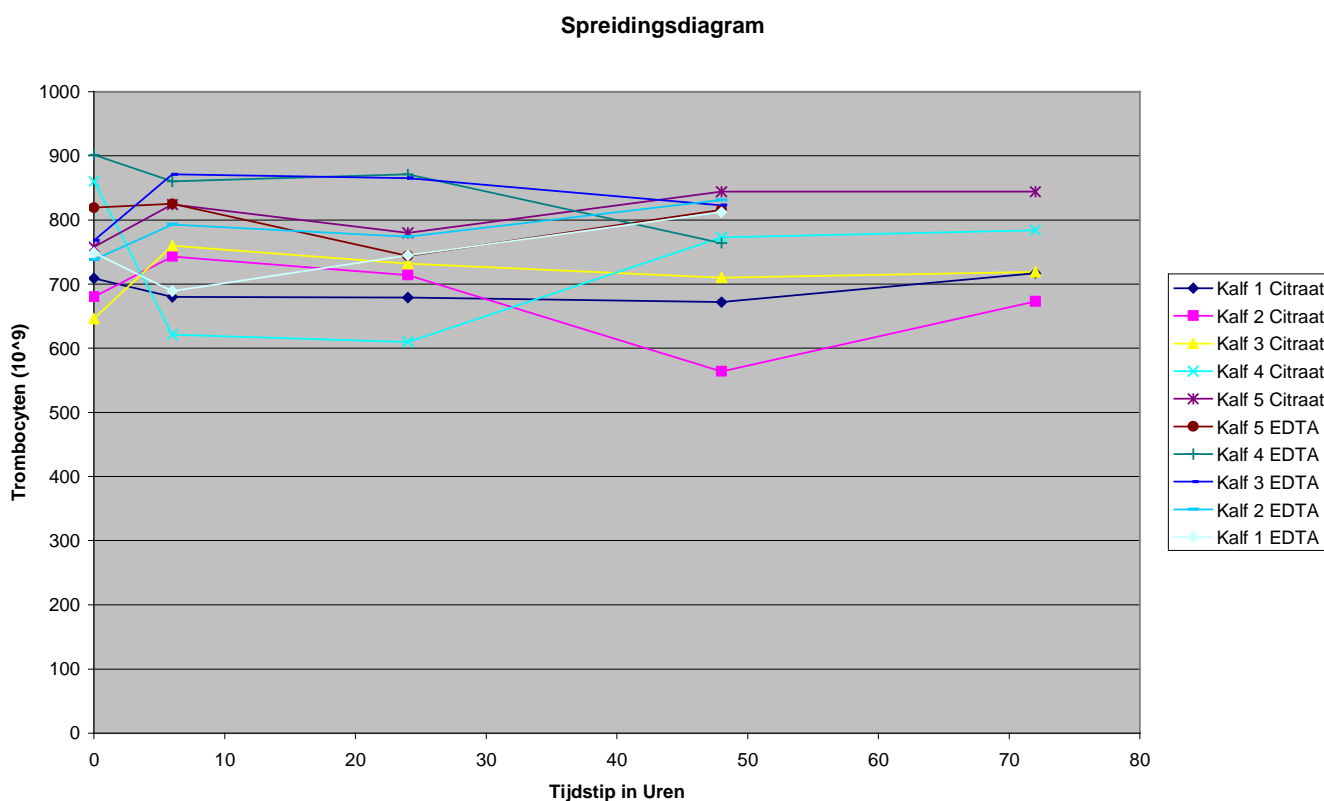
a. Dependent Variable: UITSLAG TROMBOCYTEN (109/liter).



**Grafiek 3:** De grafische weergave van alle resultaten. Ook de eventueel belangrijke afwijkingen zijn weergegeven. Hierin is te zien dat de zieke dieren (1) binnen de lijnen vallen van de niet zieke dieren (2)

## Trombocytenbepalingen zijn nog steeds representatief aan de situatie in het dier, nadat een bloedbuisje is opgestuurd naar een laboratorium

Deze uitslagen zijn uitgebreid terug te vinden in de bijlagen. (Bijlage 2) Om deze laboratoriumuitslagen dan ook nog wat inzichtelijker te maken volgt er een grafische weergave, telkens gevolgd door een kleine uitleg bij de grafiek.



**Grafiek 4:** Het spreidingsdiagram

In deze grafiek is te zien dat de kalveren allemaal een eigen startwaarde hebben, zowel voor EDTA als voor Citraat. Echter de lijnen voor ieder kalf afzonderlijk blijven telkens stabiel. Met andere woorden, de waarden fluctueren weinig bij zowel EDTA-bloed als Citraat-bloed tot 48 en respectievelijk 72 uur, maar de waarden van citraat en EDTA verschillen wel van elkaar.

Met behulp van SPSS is er toen een mixed models analyse gedaan. Hierbij zijn de trombocyten als onderwerp gebruikt en de andere waarden (tijd, methode en tijd\*methode)

Door de analyse te doen is hier het beste model naar voren gekomen. Dit is bepaald aan de laagste waarde van de AIC. De AIC waarde zegt wat over de betrouwbaarheid van de werkelijke waarden aan de hand van de

schattingen in het model. Door dit model is het mogelijk om een inschatting te geven welke effecten het meeste invloed hebben op de totstandkoming van de vaste waarde, in dit geval de trombocytenaantallen in  $10^9$  per liter.

Hier komt dan uit dat vooral het model met de toepassing van alleen de methode in het model, het best beschrijvende model is. Dit aan de hand van de AIC bepaald door alle mogelijke Fixed Effects te bepalen.

**Model Dimension<sup>b</sup>**

		Number of Levels	Covariance Structure	Number of Parameters	Subject Variables
Fixed Effects	Intercept	1	Variance Components	1	Kalf
	Methode	2		1	
Random Effects	Intercept <sup>a</sup>	1		1	
Residual				1	
Total		4		4	

a. As of version 11.5, the syntax rules for the RANDOM subcommand have changed. Your command syntax may yield results that differ from those produced by prior versions. If you are using SPSS 11 syntax, please consult the current syntax reference guide for more information.

b. Dependent Variable: Trombocyten.

**Information Criteria<sup>a</sup>**

-2 Log Likelihood	501.176
Akaike's Information Criterion (AIC)	509.176
Hurvich and Tsai's Criterion (AICC)	510.176
Bozdogan's Criterion (CAIC)	520.403
Schwarz's Bayesian Criterion (BIC)	516.403

**Tabel 5 & Tabel 6:**  
Uitslagen uit SPSS voor de beste mixed models analyse.

The information criteria are displayed in smaller-is-better forms.

a. Dependent Variable: Trombocyten.

Daarnaast is het nodig om te weten wat de afwijkingen en gemiddelden in het model waren. Uit onderstaande tabel is af te lezen dat de methode: EDTA, als "standaard" is genomen. De methode citraat wijkt hier van lichtelijk van af. Ook het 95% betrouwbaarheidsinterval met de bovenste en onderste grenswaarde is hieruit af te lezen.



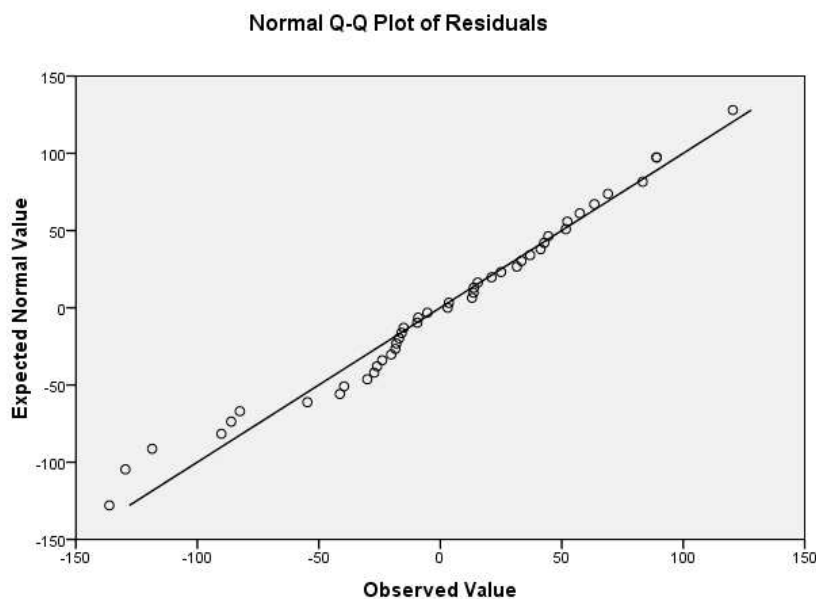
**Tabel 7:** De gemiddelde waarden, voorzien van standaardafwijking en de betreffende betrouwbaarheidsintervallen uit SPSS

Estimates of Fixed Effects <sup>b</sup>							
Parameter	Estimate	Std. Error	df	t	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Intercept	802.950000	18.268938	9.887	43.952	.000	762.180928	843.719072
[Methode=Citraat]	-79.110000	17.909821	40	-4.417	.000	-115.307099	-42.912901
[Methode=EDTA]	0 <sup>a</sup>	0	.	.	.	.	.

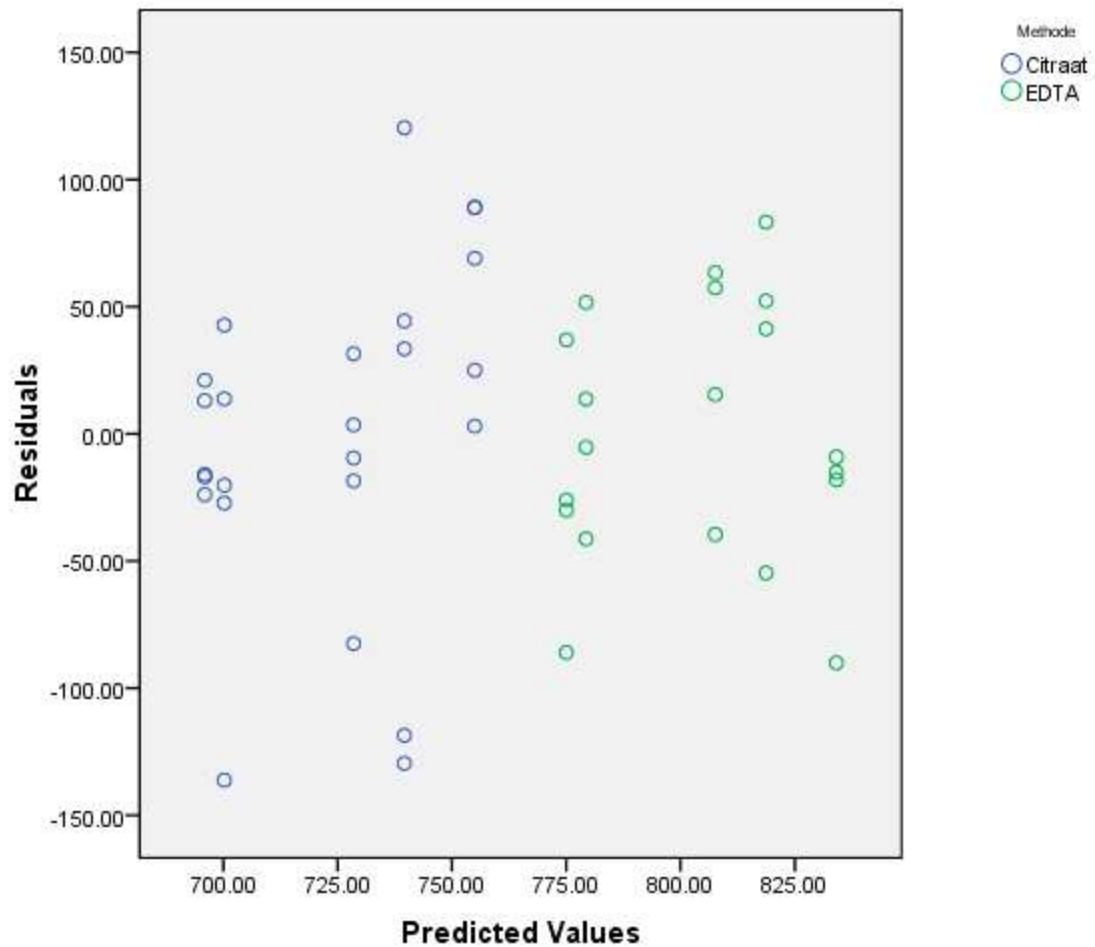
a. This parameter is set to zero because it is redundant.

b. Dependent Variable: Trombocyten.

Verder is er om de betrouwbaarheid van het model grafisch in beeld te brengen een QQ-plot gemaakt van de waarden. Zowel met een trendlijn, als ook een spreidingsdiagram. Hierin is te zien dat alle waarden gespreid liggen rond zowel de trendlijn in grafiek 3, als verdeeld in grafiek 4, hier is ook te zien hoe de scheiding tussen EDTA en Citraat verdeeld is..



**Grafiek 5:** Spreiding rondom de verwachte normaalwaarden, weergegeven in een QQ-Plot. Hierin is te zien dat de waarden gespreid zijn langs de trendlijn, en niet aan één kant van deze lijn liggen.



**Grafiek 6:** Verdeling van de waarden in een scatter-plot. Hier is te zien dat er een “scheiding” bestaat tussen citraat en EDTA, maar dat deze beide methoden wel verdeeld zijn rondom de denkbeeldige X-as op de 0-lijn.

## Discussie

Er zijn een aantal zaken in dit onderzoek die nadere toelichting en of uitdieping vragen in een ander onderzoek. Tevens is het nodig om hier even bij stil te staan alvorens een conclusie te formuleren.

Als eerste de keuze van de Citraat-buizen. Deze buizen zijn gekozen op basis van eerdere onderzoeken, en op te verwachten effecten op de trombocytenhoudbaarheid. Er zit echter een oplossing in de bloedbuis, welke de stolling voorkomt. Deze oplossing verdunt echter het bloedmonster dat we moeten onderzoeken ook.

Om de verdunning te onderzoeken is er gekeken hoeveel vloeistof er in de bloedbuis zit op het moment dat deze uit de verpakking komt. Daarnaast is er gekeken hoeveel vloeistof er inzit als de buis het vacuüm heeft volgezogen. Hieruit blijkt dat het volume van de citraatoplossing 0,2 milliliter is. De totale inhoud na het volzuigen met een vloeistof tot de indicatiepijl, dus volledige vulling, is 2,2 milliliter.

Deze bevinding wil dus zeggen dat er een verdunning van het bloed plaatsvindt van 10%. Dit is dus noodzakelijk om te weten om een uitspraak te doen over de daadwerkelijke aantallen trombocyten. Want deze trombocytenaantallen uit de laboratoriumuitslagen zullen dan ook 10% hoger liggen dan de gevonden resultaten.

Daarnaast moet worden opgemerkt dat de groepsgrootte van 19 dieren natuurlijk aan de kleine kant is om uitspraken te doen over de trombocytenaantallen in een hele populatie kalveren in Nederland en de wereld. Het is vanzelfsprekend dat een uitschieterende waarde, om welke reden dan ook, in een onderzoek met 19 dieren een veel grotere invloed heeft op het gemiddelde dan diezelfde uitschieter op een totaal van 10.000 proefdieren.

De steekproef van maar 5 dieren waarbij de monsters zijn vervolgd in de tijd zijn ook zeker te weinig dieren om een daadwerkelijke uitspraak te mogen doen over de situatie in de praktijk. Één enkele waarneming in het laboratorium heeft een gewicht van 20% op het gemiddelde per tijdsinterval. Dit is natuurlijk gigantisch.

Om deze zelfde reden is het dan ook aanbevelenswaardig om verder onderzoek te doen naar het trombocytenbeeld bij neonatale kalveren, evenals de houdbaarheid van trombocyten in zowel Citraat-bloed als EDTA-bloed. Doordat er bij meer dieren, en meer bloedmonsters onderzoek wordt gedaan naar het verloop van de trombocyten, is het met een grotere zekerheid vast te stellen dat de uitslagen uit dit verdere onderzoek een daadwerkelijke afspiegeling zijn van de praktijksituatie.

## Conclusie

Hierbij is het de vraag of er een antwoord kan worden gegeven op de gestelde onderzoeksvragen. Als eerste onderzoeksvraag is aan de orde: "De normaalwaarden van de hoeveelheid trombocyten van neonatale kalveren van 0-14 dagen oud met een goede betrouwbaarheid bepalen". Dit is bepaald, en daarbij speelt het begrip normaalwaarde een belangrijke rol. [11, 12] Het is van belang dat de 2,5% marge aan zowel onder als bovenzijde van de uitslagen wordt weggelaten bij het bepalen van de normaalwaarden. Hiermee worden grote uitschieters omzeild. Wel moet in het achterhoofd worden gehouden dat deze eventuele uitschieter of "mismeting" een even zo grote invloed heeft op het gemiddelde. Dit is echter ook al in het hoofdstuk discussie beschreven. De normaalwaarden voor neonatale kalveren zijn als volgt te definiëren, op basis van de resultaten uit dit onderzoek.

**Tabel 8:** Normaalwaarden voor trombocytenaantallen in Citraat-bloed voor Holstein Friesian kalveren van 0 – 14 dagen. Dit zijn de resultaten die afkomstig zijn uit tabel 2, eerder in deze verslaglegging.

Leeftijd kalf in uren vanaf de geboorte	Ondergrens Trombocyten (10 <sup>9</sup> liter)	Bovengrenst Trombocyten (10 <sup>9</sup> liter)	Gemiddelde Trombocyten (10 <sup>9</sup> liter)
0	320	527	424
1	339	538	438
2	343	534	438
3	335	520	427
6	320	501	411
12	307	483	395
24	287	460	374
48	283	452	368
72	341	507	424
96	411	575	493
120	522	684	603
144	610	771	690
168	680	840	760
192	712	870	791
240	678	837	757
288	699	857	778
336	668	827	747

Als opmerking dient hierbij te worden geplaatst dat dit alleen bruikbare resultaten zijn voor het laboratorium van het Universitair Veterinair Diagnostisch Laboratorium te Utrecht.

Tevens zijn deze waarden voor Citraat-Bloed. Daarnaast is er een eventueel grafisch verloop van deze waarden te volgen in grafiek 2.

In tabel 3 vind je dan ook de verschillende waarden die onderling zijn vergeleken. Hierbij zie je dat vanaf 96-urige leeftijd van het kalf de waarden ook onderling toenemen. Er is dus een verloop in de waarden door de tijd heen. Dit is een belangrijk gegeven, door dit feit is het niet mogelijk om één bepaalde normaalwaarde te geven voor bijvoorbeeld alle Holstein Friesian Kalveren met het leeftijdsinterval van 0 – 14 dagen. De verschillen tussen tijdstip T-0 en tijdstip T – 336 zijn natuurlijk enorm. Het gaat om een trombocytenaantal van respectievelijk  $320 - 526 \cdot 10^9$  per liter op T – 0 uur en waarden van  $668 - 825 \cdot 10^9$  per liter op T – 336 uur. Met andere woorden, de normaalwaarden van kalveren zijn in de eerste 14 levensdagen, en wellicht langer in de tijd, zo veranderlijk dat er geen één enkele normaalwaarde is te geven. Dat is ook de reden waarom er gekozen is voor een leeftijdsafhankelijke normaalwaarden zoals is weergegeven in tabel 8.

Als tweede vraag in dit onderzoek was aan de orde: “Trombocytenbepalingen zijn nog steeds representatief aan de situatie in het dier, nadat een bloedbuisje is opgestuurd naar een laboratorium” Dit is vergeleken aan de hand van de 5 bloedmonsters. Hieruit mag je concluderen dat de waarden in de buisjes niet significant verschilt gedurende het interval van 48 uur en 72 uur voor respectievelijk EDTA-bloed en Citraatbloed. Dit is door middel van een analyse weergegeven in tabel 7 duidelijk gemaakt.

Door deze analyse mogen de resultaten als geldig worden gezien, tevens is dit een houvast voor in de praktijk. Het is mogelijk om de monsters langere tijd te bewaren (tot respectievelijk 48 en 72 uur) waarna deze toch nog een reële afspiegeling zijn van tijdstip 0. Wederom komt hier het feit om de hoek kijken zoals ook in de discussie is aangehaald dat het aantal monsters van 5 stuks wat aan de lage kant is om een hoge betrouwbaarheid te mogen verwachten.

Verder is het misschien mogelijk om vanuit de EDTA waarden de citraatwaarden te krijgen door rekening te houden met de in de discussie genoemde 10% verdunning van het Citraat-bloed. Als je kijkt naar de uitslagen in tabel 7 blijkt onder andere dat de gemiddelde afwijking in Citraat-bloed 79,1 ( $10^9$  trombocyten per liter) lager ligt dan de hierbij gekozen standaardmethode van het EDTA-bloed welke ligt op 802,9 ( $10^9$  trombocyten per liter). Dit komt erg in de buurt van de 10% verdunning zoals in de discussie reeds besproken. Er is echter verder onderzoek nodig om deze bevinding te bevestigen.

## Aanbevelingen

Verder onderzoek naar de normaalwaarden van Holstein Friesian kalveren in een grotere populatie dan in deze steekproef. Idealiter zou dit plaatsvinden in zowel EDTA-bloed als in Citraat-bloed. Aan de hand van deze resultaten zou je dus voor beide onderzoeksvragen een grotere betrouwbaarheid krijgen. Ook zullen de afspiegelingen van de waarden een nauwkeuriger beeld geven van de werkelijkheid in de Nederlandse en wellicht Europese veestapel.

Tevens is het aanbevelenswaardig om de dieren een langer tijdsinterval te vervolgen. De kalveren die worden aangeboden met vermoedelijke Bovine Neonatale Pancytopenie zijn ook wel eens ouder dan de 14-dagen grens die in dit onderzoek is gesteld. Het zou goed mogelijk zijn, afgaand op deze resultaten, dat ook in een later tijdsbestek dan de 14-dagen leeftijdsgrens zich nog veranderingen in de trombocytenaantallen voordoen.

Aan de hand van deze resultaten die uit deze eventuele vervolgonderzoeken zouden komen is het mogelijk om een kalf in te delen in een bepaalde groep dieren. Deze groepen zouden dan zijn:

- de niet afwijkende dieren
- de klinisch én op bloedwaarden afwijkende dieren
- de klinisch afwijkende dieren maar niet op bloedwaarden afwijkend
- de klinisch niet afwijkende dieren maar op bloedwaarden wel afwijkend zijn.

## **Dankwoord**

Als eerste wil ik bedanken mijn twee begeleiders bij dit onderzoek. Dr. Walter Gruenberg van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht (UU), en Drs. Anja Smolenaars van de Gezondheidsdienst voor Dieren te Deventer (GD Deventer). Anja heeft er voor gezorgd dat ik mijn steentje bij kon dragen aan het onderzoek naar de bloederkalveren en ook dat de basis die ten grondslag lag aan het onderzoek goed was. Walter was altijd aanwezig voor vragen en hulp tijdens de voorbereiding, het onderzoek zelf en ook tijdens de uitwerking van de resultaten.

Daarnaast ben ik dank verschuldigd aan Ir. Hans Vernooij, als statisticus van de faculteit diergeneeskunde heeft hij mij ontzettend geholpen met het verwerken van de resultaten, en het wegwijs maken in de hele statistieke wereld.

Vervolgens wil ik de dierverzorgers van de faculteit diergeneeskunde, afdeling landbouwhuisdieren bedanken. Zij hebben mijn verblijf tijdens het onderzoek in de klinieken leuk gemaakt en ook heb ik veel hulp en kennis op allerlei fronten mogen ontvangen van hen.

Natuurlijk ook mijn dank voor de instellingen waarbij en waardoor ik mijn onderzoek heb kunnen doen. De Gezondheidsdienst voor Dieren te Deventer en de Universiteit Utrecht Faculteit Diergeneeskunde te Utrecht. Voor het beschikbaar stellen van financiële middelen, begeleiding, kennis, materialen, etc. etc.

Als laatste wil ik ook Roos Fokkinga en Sanneke Maas bedanken. Deze twee studenten deden tegelijkertijd onderzoek op de faculteit. De kalveren van de koeien uit dit onderzoek waren bestemd voor mijn onderzoek. Samen hebben we vele uren doorgebracht in de kliniek. Hierdoor was het werk wat aangenamer te verdelen, en ook vooral een stuk gezelliger.

Zonder al deze mensen was het niet mogelijk geweest om dit onderzoek te doen. Tevens zorgden zij allemaal op hun eigen manier ervoor dat het verblijf op de faculteit erg leerzaam en leuk werd.

## Referenties

1. VLA (2009) Vigilance urged for "bleeding calf syndrome". *The Veterinary Record* **164**, pp 515
2. COLIN, D. PENNY, CHARLOTTE BELL, LINDA MORRISSON, FIONA HOWIE, and KIM WILLOUGHBY (2009) Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. *The Veterinary Record* **164**, pp 762
3. SMOLENAARS, A. (2009) Overzicht Nederlandse situatie bloederkalveren 28-12-2009. Deventer
4. DE BLEECKER, K. CALLENS, J. DEPREZ, P. ET ALL. (2009) Tussentijds verslag Veepeiler: Hemorrhagische diathese bij neonatale kalveren. *Veepeiler 19-03-2009*, Gent
5. KAPPE, EVA C. ET ALL (2010) Bone marrow depletion with haemorrhagic diathesis in calves in Germany: Characterization of the disease and preliminary investigations on its aetiology. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* **123**, Heft 1 von 2 (2010) pp 31-41
6. Figuur: Distribution of case farms in the Netherlands (september 2008 / november 2009) GD Deventer
7. Pancytopenia and haemorrhage in young beef calves. *The Veterinary Record* **June 13**, 2009, pp 762
8. HUIJGEN, H.J. DE HAAN, M. RUBENS, M. (2000) Trombocytentelling in citraat-bloed: is iedere afnamebuis geschikt? *Ned Tijdschr Klin Chem* 2000, **vol. 25, no. 3**
9. PARDEN, B. ET ALL (2010) Haemorrhagic Diathesis in Neonatal Calves: An Emerging Syndrome in Europe. *Journal compilation, Blackwell Verlag Transboundary and Emerging Diseases. Vol 11*
10. PRINS, M. VAN LEEUWEN, M.W. TESKE, E. Stability and reproducibility of advia 120-measured red blood cell and platelet parameters in dogs, cats, and horses, and the use of reticulocyte haemoglobin content (CHr) in the diagnosis of iron deficiency. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde, Deel 134 • Aflevering 7 • 1 april 2009*
11. Common Medical Tests, Merck Manuals Online Medical Library (<http://www.merck.com/mmhe/appendixes/ap2/ap2a.html>)
12. CHRISTENSEN, R.D. JENSEN, J. MAHESHWARI, A. HENRY, E. Reference ranges for blood concentrations of eosinophils and monocytes during the neonatal period defined from over 63.000 records in a multihospital health-care system. *Journal of Perinatology* (2010) 30, **540-545**



## Bijlagen

### Bijlage 1: Resultaten van het onderzoek tot 14 dagen leeftijd

ID DIER	TIJDSTIP	UITSLAG TROMBOCYTEN (109/liter)	Gemiddelde Waarde	Afwijking van Gemiddelde	ZIEK (1) NIET ZIEK (0)
1183	0	352	424	-72	0
1183	1	386	432	-46	0
1183	2	429	438	-9	0
1183	3	371	427	-56	0
1183	6	342	413	-71	0
1183	12	343	395	-52	0
1183	24	332	367	-35	0
1183	48	311	368	-57	0
1183	72	389	424	-35	0
1183	96	527	493	34	1
1183	120	548	603	-55	1
1183	144	663	690	-27	1
1183	168	700	760	-60	1
1183	192	702	791	-89	1
1183	240	753	746	7	0
1183	288	770	769	1	0
1183	336	718	740	-22	0
1184	0	238	424	-186	0
1184	1	303	432	-129	0
1184	2	293	438	-145	0
1184	3	238	427	-189	0
1184	6	229	413	-184	0
1184	12	245	395	-150	0
1184	24	249	367	-118	0
1184	48	232	368	-136	0
1184	72	215	424	-209	0
1184	96	258	493	-235	0
1184	120	299	603	-304	0
1184	144	312	690	-378	0
1184	168	446	760	-314	0
1184	192	479	791	-312	0
1184	240	528	746	-218	0
1184	288	841	769	72	0
1184	336	836	740	96	0
2912	0	394	424	-30	0
2912	1	386	432	-46	0
2912	2	392	438	-46	0
2912	3	393	427	-34	0
2912	6	375	413	-38	0
2912	12	382	395	-13	0
2912	24	378	367	11	0
2912	48	302	368	-66	0
2912	72	427	424	3	0
2912	96	564	493	71	0
2912	120	777	603	174	0
2912	144	789	690	99	0
2912	168	775	760	15	0
2912	192	673	791	-118	0
2912	240	638	746	-108	0
2912	288	516	769	-253	0
2912	336	600	740	-140	0
3165	0	822	424	398	0
3165	1	873	432	441	0
3165	2	816	438	378	0
3165	3	850	427	423	0
3165	6	769	413	356	0
3165	12	796	395	401	0
3165	24	729	367	362	0
3165	48	669	368	301	0
3165	72	969	424	545	0
3165	96	981	493	488	0
3165	120	1277	603	674	0

Onderzoeksstage Universiteit Utrecht – Trombocytenbepalingen bij neonatale kalveren  
t.b.v. het onderzoek naar Bovine Neonatale Pancytopenie

ID DIER	TIJDSTIP	UITSLAG TROMBOCYTEN (109/liter)	Gemiddelde Waarde	Afwijking van Gemiddelde	ZIEK (1) NIET ZIEK (0)
3282	0	361	424	-63	1
3282	1	366	432	-66	1
3282	2	341	438	-97	1
3282	3	366	427	-61	1
3282	6	359	413	-54	1
3282	12	340	395	-55	1
3282	24	374	367	7	1
3282	48	331	368	-37	1
3282	72	367	424	-57	1
3282	96	474	493	-19	0
3282	120	566	603	-37	1
3282	144	693	690	3	1
3282	168	720	760	-40	1
3282	192	834	791	43	1
3282	240	736	746	-10	1
3282	288	793	769	24	0
3282	336	774	740	34	0
3333	0	522	424	98	0
3333	1	479	432	47	0
3333	2	476	438	38	0
3333	3	437	427	10	0
3333	6	447	413	34	0
3333	12	425	395	30	0
3333	24	286	367	-81	0
3333	48	397	368	29	0
3333	72	332	424	-92	0
3333	96	487	493	-6	0
3333	120	581	603	-22	0
3333	144	653	690	-37	0
3333	168	729	760	-31	0
3333	192	816	791	25	0
3333	240	668	746	-78	0
3333	288	679	769	-90	0
3333	336	516	740	-224	0
3489	0	366	424	-58	1
3489	1	437	432	5	1
3489	2	351	438	-87	1
3489	3	352	427	-75	1
3489	6	349	413	-64	1
3489	12	359	395	-36	1
3489	24	313	367	-54	1
3489	48	216	368	-152	1
3489	72	380	424	-44	1
3489	96	457	493	-36	1
3489	120	605	603	2	1
3489	144	612	690	-78	1
3489	168	635	760	-125	1
3489	192	654	791	-137	1
3489	240	579	746	-167	1
3489	288	601	769	-168	1
3489	336	480	740	-260	1
3493	0	402	424	-22	0
3493	1	242	432	-190	0
3493	2	437	438	-1	0
3493	3	396	427	-31	0
3493	6		413	-413	0
3493	12	362	395	-33	0
3493	24	374	367	7	1
3493	48	387	368	19	1
3493	72	383	424	-41	1
3493	96	412	493	-81	1
3493	120	528	603	-75	1

Onderzoeksstage Universiteit Utrecht – Trombocytenbepalingen bij neonatale kalveren  
t.b.v. het onderzoek naar Bovine Neonatale Pancytopenie

ID DIER	TIJDSTIP	UITSLAG TROMBOCYTEN (109/liter)	Gemiddelde Waarde	Afwijking van Gemiddelde	ZIEK (1) NIET ZIEK (0)
6090	0	640	424	216	0
6090	1	627	432	195	0
6090	2	549	438	111	0
6090	3	562	427	135	0
6090	6	533	413	120	0
6090	12	506	395	111	0
6090	24	508	367	141	0
6090	48	463	368	95	0
6090	72	440	424	16	0
6090	96	528	493	35	0
6090	120	686	603	83	0
6090	144	823	690	133	0
6090	168	805	760	45	0
6090	192	839	791	48	0
6090	240	725	746	-21	0
6090	288	729	769	-40	0
6090	336	680	740	-60	0
6102	0	519	424	95	0
6102	1	501	432	69	0
6102	2	520	438	82	0
6102	3	547	427	120	0
6102	6	479	413	66	0
6102	12	446	395	51	0
6102	24	352	367	-15	0
6102	48	291	368	-77	0
6102	72	389	424	-35	0
6102	96	476	493	-17	0
6102	120	548	603	-55	0
6102	144	742	690	52	0
6102	168	741	760	-19	0
6102	192	828	791	37	0
6102	240	760	746	14	0
6102	288	671	769	-98	0
6102	336	678	740	-62	0
6504	0	274	424	-150	0
6504	1	273	432	-159	0
6504	2	260	438	-178	0
6504	3	281	427	-146	0
6504	6	266	413	-147	0
6504	12	220	395	-175	0
6504	24	238	367	-129	0
6504	48	395	368	27	0
6504	72	550	424	126	0
6504	96	643	493	150	0
6504	120	757	603	154	0
6504	144	831	690	141	0
6504	168	822	760	62	0
6504	192	764	791	-27	0
6504	240	718	746	-28	0
6504	288	610	769	-159	0
6504	336	628	740	-112	0
6505	0	544	424	120	1
6505	1	546	432	114	1
6505	2	573	438	135	1
6505	3	514	427	87	1
6505	6	539	413	126	1
6505	12	558	395	163	1
6505	24		367	-367	0
6505	48	453	368	85	0
6505	72	470	424	46	0
6505	96	456	493	-37	0
6505	120	441	603	-162	0

Onderzoeksstage Universiteit Utrecht – Trombocytenbepalingen bij neonatale kalveren  
t.b.v. het onderzoek naar Bovine Neonatale Pancytopenie

ID DIER	TIJDSTIP	UITSLAG TROMBOCYTEN (109/liter)	Gemiddelde Waarde	Afwijking van Gemiddelde	ZIEK (1) NIET ZIEK (0)
6515	0	624	424	200	0
6515	1	597	432	165	0
6515	2	570	438	132	0
6515	3	509	427	82	0
6515	6	545	413	132	0
6515	12	513	395	118	0
6515	24	489	367	122	0
6515	48	595	368	227	0
6515	72	662	424	238	0
6515	96	808	493	315	0
6515	120	963	603	360	0
6515	144	1127	690	437	0
6515	168	1219	760	459	0
6515	192	1169	791	378	0
6515	240	1211	746	465	0
6515	288	986	769	217	0
6515	336	958	740	218	0
7564	0	295	424	-129	0
7564	1	474	432	42	0
7564	2	516	438	78	0
7564	3	522	427	95	0
7564	6	488	413	75	0
7564	12	452	395	57	0
7564	24	465	367	98	0
7564	48	403	368	35	0
7564	72	435	424	11	0
7564	96	347	493	-146	0
7564	120	487	603	-116	1
7564	144	619	690	-71	1
7564	168	811	760	51	1
7564	192	1063	791	272	1
7564	240		746	-746	
7564	288		769	-769	
7564	336		740	-740	
9683	0	355	424	-69	0
9683	1	321	432	-111	0
9683	2	353	438	-85	0
9683	3	318	427	-109	0
9683	6	340	413	-73	0
9683	12	315	395	-80	0
9683	24	337	367	-30	0
9683	48	348	368	-20	0
9683	72	319	424	-105	0
9683	96	357	493	-136	0
9683	120	369	603	-234	0
9683	144	436	690	-254	1
9683	168	492	760	-268	1
9683	192	548	791	-243	1
9683	240	616	746	-130	1
9683	288	698	769	-71	0
9683	336	728	740	-12	0
9919	0	235	424	-189	0
9919	1	413	432	-19	0
9919	2	392	438	-46	0
9919	3	395	427	-32	0
9919	6	377	413	-36	0
9919	12	307	395	-88	0
9919	24	307	367	-60	0
9919	48	314	368	-54	0
9919	72	302	424	-122	0
9919	96	297	493	-196	0
9919	120	386	603	-217	0

## Bijlage 2: Resultaten van het vergelijkingsonderzoek EDTA vs. Citraat.

Kalf	Methode	Tijd (uren)	Trombocyten ( $10^9$ per liter)
1	Citraat	0	709
1	Citraat	6	680
1	Citraat	24	679
1	Citraat	48	672
1	Citraat	72	717
1	EDTA	0	749
1	EDTA	6	689
1	EDTA	24	745
1	EDTA	48	812
2	Citraat	0	680
2	Citraat	6	743
2	Citraat	24	714
2	Citraat	48	564
2	Citraat	72	673
2	EDTA	0	738
2	EDTA	6	793
2	EDTA	24	774
2	EDTA	48	831
3	Citraat	0	646
3	Citraat	6	760
3	Citraat	24	732
3	Citraat	48	710
3	Citraat	72	719
3	EDTA	0	768
3	EDTA	6	871
3	EDTA	24	865
3	EDTA	48	823
4	Citraat	0	860
4	Citraat	6	621
4	Citraat	24	610
4	Citraat	48	773
4	Citraat	72	784
4	EDTA	0	902
4	EDTA	6	860
4	EDTA	24	871
4	EDTA	48	764
5	Citraat	0	758
5	Citraat	6	824
5	Citraat	24	780
5	Citraat	48	844
5	Citraat	72	844
5	EDTA	0	819
5	EDTA	6	825
5	EDTA	24	744
5	EDTA	48	816

## Bijlage 3: Werkschema en Stalkaart gebruikt bij het onderzoek

Stalkaart Kalf

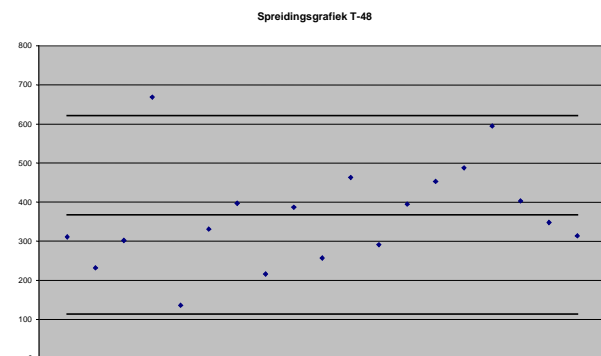
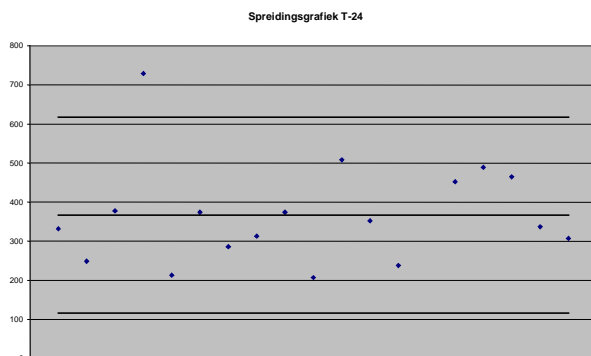
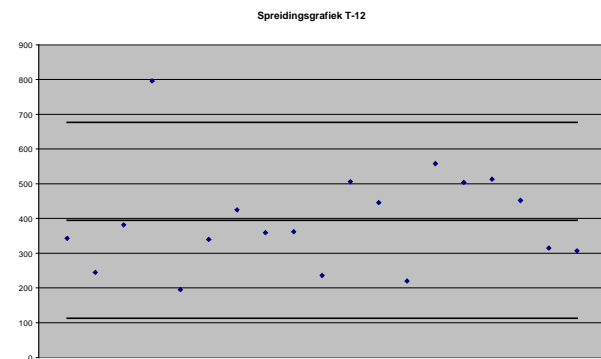
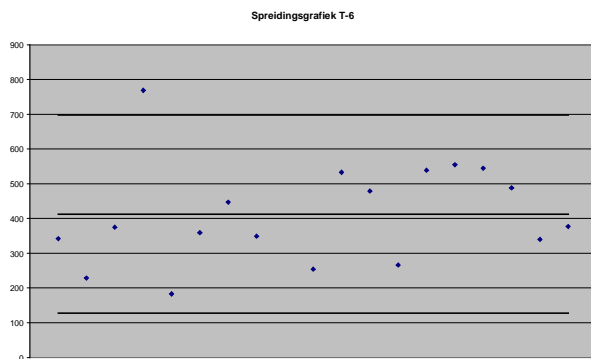
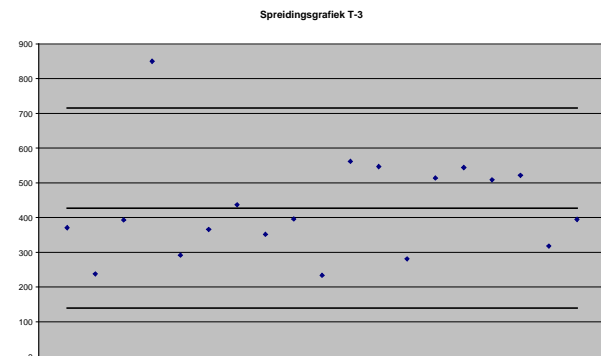
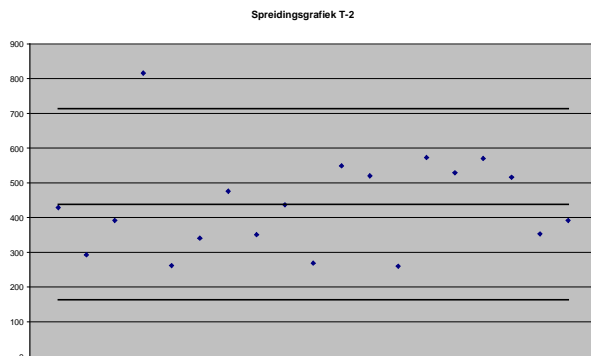
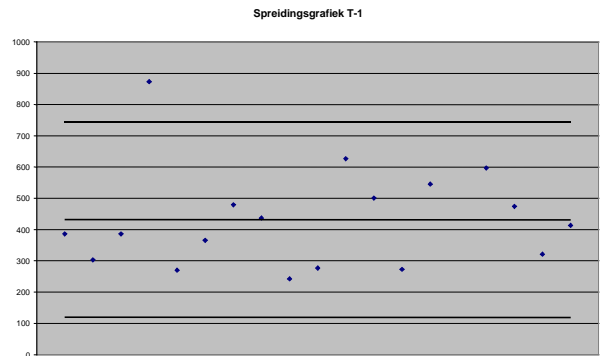
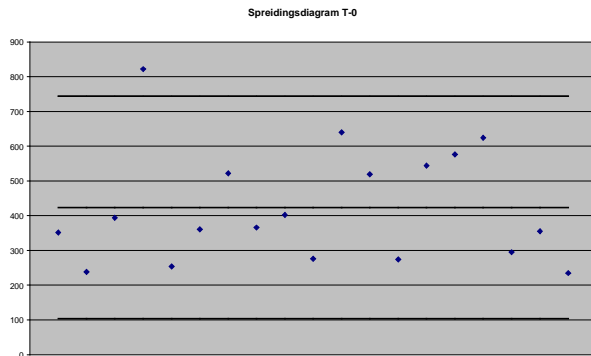
ID-Nummer kalf		Kalfnr. in het onderzoek	
ID-Nummer moeder			
Geboortedatum			
Geboortetijd			

TIJD	WERKELIJKE TIJD		HANDELING	UITGEVOERD DOOR	BIJZONDERHEDEN
	UUR	MIN			
T = 0			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT BLOEDAFNAME, 1 x SERUM		
T = 1			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
T = 2			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT BIESTGIFT, 2 LITER INVRIEZEN BIESTMONSTER		VOOR T = 2 BINNEN
T = 3			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
T = 6			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT BIESTGIFT, 2 LITER INVRIEZEN BIESTMONSTER		VOOR T = 6 BINNEN
T = 12			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT BIESTGIFT, 2 LITER INVRIEZEN BIESTMONSTER		VOOR T = 12 BINNEN
T = 24			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT BLOEDAFNAME, 1 x SERUM		

DAN AFHANKELIJK VAN T = 0, IEDERE DAG OM 10.00 UUR

TIJD	WERKELIJKE TIJD		HANDELING	UITGEVOERD DOOR	BIJZONDERHEDEN
	UUR	MIN			
D 2			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 3			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 4			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 5			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 6			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 7			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 8			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 9			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 10			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		
D 12			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT (EXTRA BUIS DUS!!!!)		
D 14			BLOEDAFNAME, 1 x CITRAAT		

## Bijlage 4: Bland-Altman grafieken per tijdstip



Onderzoeksstage Universiteit Utrecht – Trombocytenbepalingen bij neonatale kalveren  
t.b.v. het onderzoek naar Bovine Neonatale Pancytopenie

