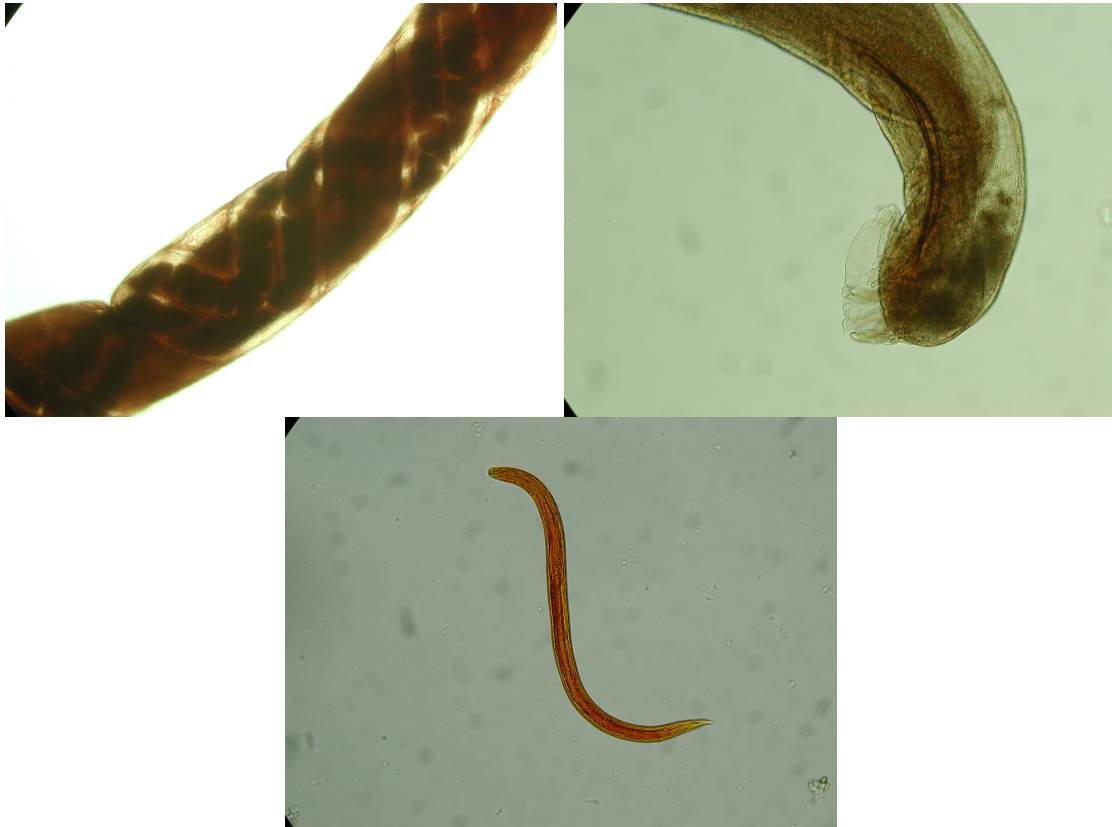


Angiostrongylus vasorum in tussengastheer en de vos in Nederland
Een pilot studie



Onderzoekstage, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht
Judith Sabbé, 0352691
Begeleider: Drs. Rolf Nijse
Utrecht, Oktober 2009 - Januari 2010

Inhoudsopgave

Samenvatting.....	3
Introductie.....	4
Levenscyclus <i>Angiostrongylus vasorum</i>	4
Verschijnselen bij honden met <i>Angiostrongylus vasorum</i> infectie.....	4
Diagnostiek.....	6
Behandeling.....	6
Prognose.....	7
Epidemiologie en situatie in Nederland.....	7
Vossen in Nederland.....	8
Longwormen bij vossen.....	8
Morfologie van nematode longworm larven.....	10
Doel van de studie.....	11
Materiaal en methode.....	12
Slakken verzamelen.....	12
Slakken houden en determineren.....	12
Parasitologisch onderzoek van slakken.....	13
Vossen.....	14
Longspoelen.....	14
Longen knippen.....	14
Feces monsters vossen.....	15
Resultaten.....	16
Slakken verzamelen en determineren.....	16
Parasitologisch onderzoek van slakken.....	16
Longwormen uit vossenlongen verzamelen.....	17
Feces monsters vossen.....	18
Discussie.....	20
Slakken onderzoek.....	20
Vossen onderzoek.....	21
Conclusie.....	24
Dankwoord.....	25
Referenties.....	26
Bijlagen.....	30
Bijlage 1 Protocol slakken onderzoek methode 1a, b en c.....	30
Bijlage 2 Protocol slakken onderzoek methode 2a en b.....	31
Bijlage 3 Protocol slakken onderzoek methode 3a en b.....	32
Bijlage 4 Protocol verteringsvloeistof.....	34
Bijlage 5 Protocol vossen longen spoelen.....	35
Bijlage 6 Gegevens vossen RIVM.....	36
Bijlage 7 Alle bevindingen bij parasitologisch onderzoek van vossen.....	37

Samenvatting

Begin 2008 is uit een onderzoek gebleken dat er drie honden angiostrongylose hadden die nog nooit in het buitenland zijn geweest. *Angiostrongylus vasorum* lijkt zich in Nederland te hebben gevestigd. Deze pilot studie is uitgevoerd om er achter te komen of *A. vasorum* inderdaad in Nederland is te vinden in slakken en in de vossenpopulatie en op welke manieren dit het best kan worden onderzocht. In dit onderzoek zijn er 56 slakken op verschillende manieren onderzocht waarbij in één batch mogelijk L3 van *A. vasorum* is gevonden, maar dit is niet bevestigd met PCR. Daarnaast zijn de longen van 23 vossen onderzocht, de meerderheid afkomstig van de Sallandse heuvelrug, drie uit Den Haag, één vos uit Wieringermeer en twee vossen uit het Nationaal Park de Hoge Veluwe. In alle longen van de vossen uit Den Haag en het Nationaal Park de Hoge Veluwe zijn adulten van *Angiostrongylus vasorum* gevonden. Naast de longen van vossen zijn er ook fecesmonsters geraapt, drie van vossen in de Oostvaardersplassen en tien in het Nationaal Park de Hoge Veluwe. Deze monsters zijn onderzocht met de suikerflotatiemethode en volgens de Baermann methode. Twee van de monsters van de Oostvaardersplassen en acht van het Nationaal Park de Hoge Veluwe bleken L1 van *A. vasorum* te bevatten. De infectie heeft zich in Nederland gevestigd en er ligt een endemische focus in Den Haag. Verder onderzoek moet uitwijzen of er nog meer endemische foci in Nederland liggen. Er is ook nader onderzoek nodig naar de methodes om slakken te onderzoeken. Uit deze studie blijkt dat het onderzoeken van vossenlongen goed is uit te voeren. Door het spoelen van de longen worden larven verkregen, terwijl door het knippen van de longen adulten kunnen worden verkregen. Door beide methoden te gebruiken is de kans groter dat de aanwezige longwormen worden gevonden.

Introductie

Angiostrongylus vasorum, de Franse hartworm, is een nematode van de superfamilie Metastrongyloidea. De volwassen wormen parasiteren het rechter hart en voornamelijk de arterie pulmonalis van honden en hondachtigen (Canidae). In Noord Europa is de vos (*Vulpes vulpes*) een belangrijke eindgastheer en dient mogelijk als reservoir voor de infectie bij de hond (Koch, 2009; Bolt, 1994; Bolt 1992). Naast de hond en de vos zijn er nog andere eindgastheren beschreven: de wolf (*Canis lupus*), de coyote (*Canis latrans*), de jakhals (*Canis aureus*), de Europese otter (*Lutra lutra*), de Europese das (*Meles meles*), het fret (*Mustela putorius*) en de rode panda (*Ailurus fulens fulgens*) (Koch, 2009).

Levenscyclus *Angiostrongylus vasorum*

Angiostrongylus vasorum heeft een indirecte levenscyclus met verschillende soorten land- en waterslakken als tussengastheer (Fig. 1). De vrouwelijke adulte wormen scheiden eieren uit die via de arterie pulmonalis in de pulmonale capillairen terecht komen. De eieren komen uit en de L1-larven dringen door de capillairwand en het alveolaire epitheel heen en bereiken het luchthoudende weefsel. Hier vandaan worden ze opgehoest en doorgeslikt waarna ze met de feces worden uitgescheiden in het milieu. De L1-larven dringen actief een slak binnen of worden door slakken opgenomen tijdens het 'eten' van feces met L1-larven (Guilhon, 1973; Bolt, 1994). Ook de bruine kikker (*Rana temporaria*) kan door het binnenkrijgen van L1-larven of door het eten van geïnfecteerde slakken als tussengastheer of transportgastheer fungeren (Bolt, 1993). In de slak ontwikkelt de L1 zich in zestien tot achttien dagen tot een infectieuze L3 (Guilhon, 1973). De eindgastheer raakt geïnfecteerd door het opnemen van een tussengastheer die infectieuze L3 bevat. Waarschijnlijk bevinden de infectieuze L3-larven zich ook in het slijm van slakken. Barçante et al. (2003) hebben gevonden dat *Biomphalaria glabrata* slakken L3-larven uitscheiden in het water en dat irriterende stimuli de hoeveelheid L3-larven die vrijkomen uit de waterslakken vergroten. Het uitscheiden van de larven gebeurt gedurende meerdere dagen en de larven kunnen tot vijftien dagen overleven in vers water. Het opnemen van slakken lijkt dus niet noodzakelijk te zijn om eindgastheren te infecteren.

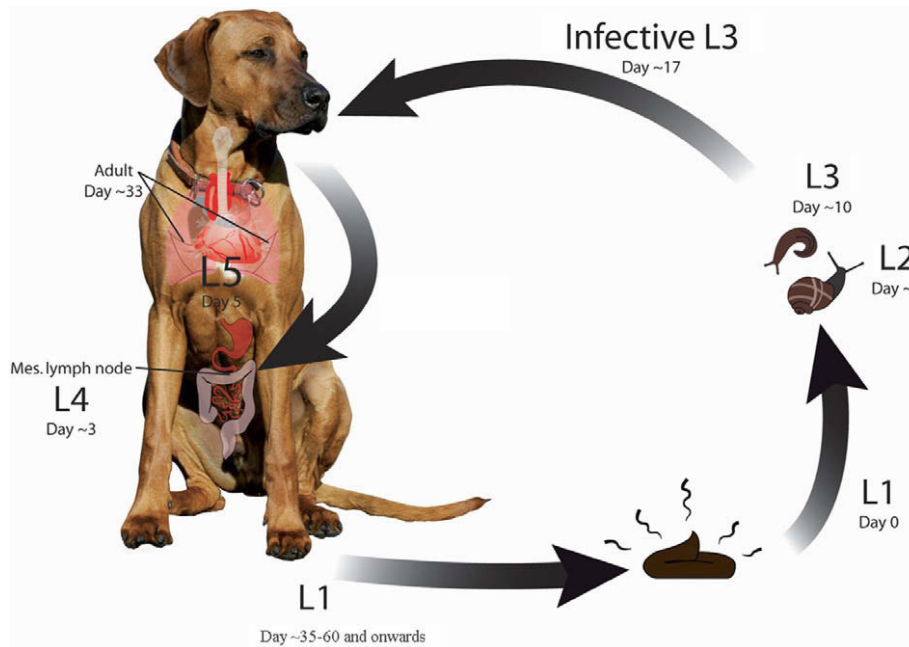
In de darm van de eindgastheer dringt de L3 door de darmwand heen en trekt in de abdominale viscerale lymfeknopen, waaronder de mesenteriale lymfeknopen. In de lymfeknopen ontwikkelen ze door middel van twee vervellingen tot jong adulten die via de vena porta hepatica, de lever en de vena cava caudalis naar het rechter hart en de arterie pulmonalis migreren waar ze ongeveer tien dagen na infectie aankomen. 33-36 dagen na infectie zijn de larven ontwikkeld tot adulte wormen en na 35-60 dagen worden er L1-larven uitgescheiden met de feces (Guilhon, 1973; Bolt, 1994).

Verschijselen bij honden met *Angiostrongylus vasorum* infectie

Angiostrongylose bij de hond varieert van een asymptomatische tot een fatale infectie en de verschijnselen die hierbij worden gezien zijn zeer variabel en kunnen specifiek zijn. Meestal vertonen de honden symptomen van een chronische longafwijking en hartfalen: depressie, anorexie, groei achterstand, vermageren, verminderd uithoudingsvermogen, flauwvallen, kokhalzen, hoesten, oedeem, tachypneu en ernstige dyspneu. Respiratoire klachten worden veroorzaakt door de ontstekingsreactie

op eieren en migrerende larven in de longen. Er worden af en toe gastrointestinale klachten gezien zoals braken en diarree (Bolt, 1994; Chapman 2004). Bij jonge honden wordt soms een acute vorm van angiostrongylose gezien waarbij de honden binnen een paar dagen na het ontstaan van verschijnselen kunnen overlijden door acuut rechterhart falen (Patteson, 1993).

In sommige gevallen worden neurologische verschijnselen gezien. Deze verschijnselen zijn zeer divers: ataxie, parese of paralyse van de extremiteiten, hypermetrie, cirkelen, pijn in de nek, intentie tremoren, depressie, verminderde proprioceptie, toevallen en blindheid. De neurologische verschijnselen zijn mogelijk het gevolg van cerebrale hypoxie door hartfalen of door larven die embolische processen veroorzaken in de hersenen. Er zijn meerdere casussen bekend van honden waarbij de neurologische verschijnselen werden veroorzaakt door bloedingen in de hersenen of het ruggenmerg (Bolt, 1994; Patteson, 1993; Chapman, 2004; Wessmann, 2006; Denk, 2009).



Figuur 1. Levenscyclus van *Angiostrongylus vasorum* (Koch, 2009)

Bloedingen door stollingsstoornissen worden vaker gezien bij honden met angiostrongylose. De bloedingen variëren van petechien tot haematomen en kunnen overall voorkomen van slijmvliezen en huid tot ogen en hersenen. Een oorzaak voor de stollingsproblemen is nog niet met zekerheid aan te wijzen maar in veel gevallen is er sprake van diffuse intravasale stolling. Het is mogelijk dat de aanwezigheid van larven in bloedvaten het endotheel beschadigt waardoor de intravasculaire stolling wordt geactiveerd en er een consumptie coagulopathie ontstaat. Andere onderzoekers zijn van mening dat adulte wormen of larven mogelijk een stof afscheiden die de stolling remt (Cury, 2002). En dan zijn er nog twee gevallen waarbij een andere oorzaak voor de hemorragische diathese is gevonden. In het ene geval werden de bloedingen veroorzaakt door een immuungemedieerde trombocytopenie en in het andere geval werd er een

verkregen von Willebrands factor deficiëntie gevonden (Koch, 2009; Whitley, 2005; Bourque, 2002).

In zeldzame gevallen worden adulten en L1-larven gevonden op ectopische plaatsen. Er zijn adulten van *A. vasorum* gevonden in de nier, de arterie femoralis, de voorste oogkamer, de blaas en in het pericardium. L1-larven zijn teruggevonden in de hersenen, het cerebellum, de lever, de pancreas, de huid, in cerebrospinale vloeistof en in het perifere bloed (Oliveira-Junior, 2004; Bolt, 1994).

Diagnostiek

Het inzetten van een Baermann wordt momenteel in Nederland gebruikt voor het diagnostiseren van angiostrongylose bij de hond. Het liefst met verse feces dat niet in direct contact is geweest met de grond om contaminatie met vrijlevende nematoden te voorkomen. De Baermann methode heeft echter geen hoge sensitiviteit, dus een negatieve uitslag wil niet zeggen dat de patiënt geen angiostrongylose heeft (Bolt, 1994; Traversa, 2008). Daarnaast moet er onderscheid gemaakt worden tussen L1-larven van *A. vasorum* en L1-larven van andere longwormen namelijk *Crenosoma vulpis*, *Filaroides* spp. en *Oslerus Osleri* (Traversa, 2009b).

De lage sensitiviteit van de Baermann wordt onder andere veroorzaakt doordat er tijdens de prepatentperiode nog geen larven worden uitgescheiden en er met de Baermann dus geen larven gevonden kunnen worden (Traversa, 2009b). Er is ook een sandwich ELISA ontwikkeld voor het aantonen van circulerende *A. vasorum* antigenen. Uit onderzoek van Verzberger-Epshtein et al.(2008) bleek dat de sensitiviteit van de ELISA 96% was en de sensitiviteit van de Baermann slechts 51%. De serologische test geeft voor het eerste positieve resultaten rond het begin van de prepatentperiode dus mogelijk net iets eerder dan de Baermann methode (Schnyder, 2009). Met behulp van de ELISA kunnen er tijdens en mogelijk iets voor de prepatentperiode dus meer zieke honden worden gediagnostiseerd. De ELISA is echter nog niet beschikbaar. Sinds kort is er in Engeland een PCR beschikbaar voor het aantonen van *A. vasorum* DNA in EDTA bloed en feces (Jeffries, 2009).

Met bronchoalveolaire lavage kunnen er ook levende L1-larven worden gevonden in het spoelsel (Chapman, 2004). Het maken van röntgenfoto's van de thorax kan een aanwijzing geven richting angiostrongylose maar de beelden zijn niet pathognomonisch. Er kan een diffuus bronchiaal en interstitieel patroon zichtbaar zijn met voornamelijk in de caudale longdelen een alveolair patroon. Bij bloedonderzoek worden regelmatig een regeneratieve anemie, leucocytose, eosinofilie en verhoogde β - en γ -globulines gevonden. In sommige gevallen is er sprake van hypercalcaemie en ook lage fructosamine concentraties zijn gevonden bij honden met angiostrongylose (Koch, 2009; Chapman, 2004; Patteson, 1993).

Behandeling

In Nederland zijn er twee middelen geregistreerd voor het behandelen van angiostrongylose bij de hond. Milbemax[®] is een combinatie van milbemycine oxime en praziquantel en heeft een behandelingschema van vier maal toedienen met steeds een week tussentijd (Conboy, 2004). Het andere middel is Advocate[®] wat imidacloprid en moxidectine bevat. Dit spot-on middel werkt vier weken lang en vaak is eenmalig toedienen voldoende. Sommige honden hebben echter een tweede behandeling nodig dus

het is verstandig om na vier weken nog een keer en Baermann in te zetten (bijsluiter). Advocate[®] doodt L4-larven en immature *A. vasorum* stadia. Maandelijks toedienen voorkomt het vestigen van adulten in het rechter hart en arterie pulmonalis en voorkomt zo het ontstaan van ernstige klinische verschijnselen (Schnyder, 2009). Naast het behandelen van de hartworm is vaak symptomatische behandeling nodig. Bij ernstige dyspneu kan verbetering optreden door bronchodilatators en mucolytische medicatie. Diuretica kunnen verlichting geven in het geval van oedemen. De ontstekingsreactie die eieren en larven veroorzaken in de longen kan geremd worden met corticosteroiden. In het geval van immuungemedieerde thrombocytopenie zijn corticosteroiden ook geïndiceerd. Bij levensbedreigende bloedingen zijn plasma- of bloedtransfusies nodig om de patiënt te stabiliseren en de behandeling te starten (Bolt, 1994; Koch, 2009).

Prognose

Bij een vroegtijdige diagnose en behandeling is de prognose het best. Honden zonder ernstige ziekteverschijnselen overleven angiostrongylose in de meeste gevallen (Koch, 2009). Neurologische verschijnselen zijn soms zo erg dat men besluit tot euthanasie (Wessmann, 2006). In sommige gevallen zijn de honden zo ziek dat ze overlijden aan een hartstilstand of aan bloedingen door stollingsstoornissen (Wessmann, 2006; Koch, 2009). De acute vorm bij jonge honden heeft meestal een fatale afloop (Patteson, 1993). De hartworm kan ook permanente cardiopulmonaire schade aanrichten waardoor na een succesvolle behandeling alsnog voor euthanasie wordt gekozen (Bourque, 2002).

Epidemiologie en situatie in Nederland

Angiostrongylus vasorum komt voor in Noord- en Zuid-Amerika, Afrika en Europa. De verdeling van infecties met *A. vasorum* is gekarakteriseerd door endemische foci waarbuiten maar zelden infecties worden gevonden (Koch 2009). In Europa zijn er verschillende landen waar endemische foci voorkomen. Deze foci liggen in zuidwest Frankrijk, Ierland, Wales, Cornwall en Zuid-west Engeland, Denemarken, Spanje, Portugal en Duitsland (Bolt, 1992; Bolt, 1994; Morgan, 2005; Simpson, 1996; Willingham, 1996; Chapman, 2004; Saeed, 2006; Segovia, 2004; Gortázar, 1998; Eira, 2006).

In Nederland kwamen infecties met *Angiostrongylus vasorum* tot voor kort alleen sporadisch voor bij honden die mee naar het buitenland waren geweest. In 2007 is er echter in Nederland bij vier honden de diagnose angiostrongylose gesteld waarvan drie honden nog nooit in het buitenland waren geweest. Een onderzoek in 2008 naar *Angiostrongylus vasorum* in Nederland leverde opnieuw vier positieve honden op waarbij maar één hond meerdere malen in het buitenland was geweest. De honden die nooit in het buitenland zijn geweest moeten de infectie dus hebben opgelopen in hun eigen omgeving. In 2008 kwamen twee van de vier positieve honden uit Den Haag en de andere twee honden kwamen uit het noorden van de Veluwe (van Doorn, 2009). In Nederland lijkt er in Den Haag een endemische focus te liggen. Wellicht is er ook in het noorden van de Veluwe een endemische focus, gezien de twee positieve honden uit 2008 die hier vandaan kwamen. Daarnaast is er tijdens dit onderzoek een pup van vijf maanden uit Harderwijk gestorven aan angiostrongylose.

Vossen in Nederland

Het leefgebied van de vos in Nederland is de laatste jaren flink uitgebreid. In de jaren '70 was de vos vooral te vinden in het oosten van het land op zandgronden maar de laatste jaren worden ze door het hele land gezien in veenweide- en akkerbouwgebieden en in de duinen in Noord- en Zuid-Holland. Door deze uitbreiding worden vossen ook steeds vaker in steden gezien (Fig. 2).

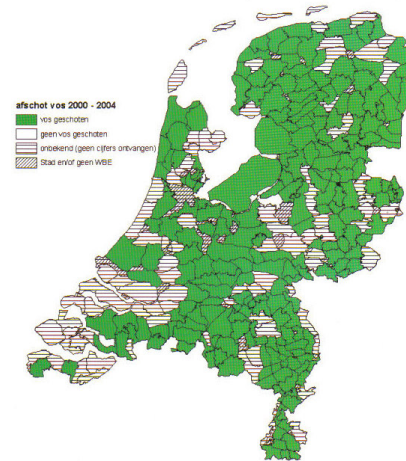
Naast de uitbreiding van het leefgebied is het aantal vossen in Nederland ook sterk toegenomen. Het aantal vossen in Nederland wordt uitgedrukt op basis van het aantal geschoten vossen in een jaar. In het jachtseizoen 2001-2002 werden er 15.000 vossen gedood wat een verdubbeling is van het aantal in de jaren '80. De jaren na 2002 was het aantal geschoten vossen een stuk lager doordat de vos in de Flora- en faunawet een beschermde status kreeg en er alleen in bijzondere situaties op gejaagd mocht worden. In 2006 is deze wet aangepast en nu mag er weer vrij gejaagd worden op vossen (Montizaan, 2007). Het aantal vossen dat momenteel in Nederland leeft is hierdoor moeilijk te bepalen omdat er een aantal jaar geen reële cijfers zijn geweest.

Concluderend leven er genoeg vossen in Nederland, ook in de stedelijke gebieden waar veel honden komen. In deze gebieden leven ook volop slakken waardoor *Angiostrongylus vasorum* een goede kans heeft om zich in Nederland te vestigen.

Longwormen bij vossen

In verschillende Europese landen wordt de vos gezien als reservoir voor *Angiostrongylus vasorum*. Bolt et al. (1992) hebben aangetoond dat honden te infecteren zijn met L3-larven afkomstig van L1-larven uit vossen en vossen zijn te infecteren met L3-larven afkomstig van L1-larven uit honden. Deze bevinding bewijst dat vossen inderdaad reservoir zouden kunnen zijn voor de infectie. In Denemarken, Italië, Frankrijk, Groot-Brittannië, Spanje, Kroatië, en Hongarije is *A. vasorum* gevonden in wilde vossen in percentages variërend van 1% tot 48,6% in een endemisch gebied (Saeed, 2006; Poli, 1984; Simpson, 1996; Morgan 2008; Segovia 2004; Mañas 2005; Rajković-Janje, 2002; Sréter, 2003). Naast *A. vasorum* kunnen er ook andere longwormen worden gevonden bij vossen en hondachtigen namelijk *Crenosoma vulpis*, *Eucoleus aerophilus* (syn. *Capillaria aerophila*), *Oslerus osleri* en *Filaroides hirthei*.

Crenosoma vulpis is een tot de longwormen (superfamilie Metastrongyloidea) behorende nematode die wordt gevonden in de bronchi en trachea van verschillende diersoorten. Als eindgastheer komen hondachtigen (*Canidae*), beren (*Ursidae*), wasbeerachtigen (*Procyonidae*) en marterachtigen (*Mustelidae*) in aanmerking (Kriegleder, 1988). L1-larven worden met de feces uitgescheiden en ontwikkelen tot L3-larven in verschillende als tussengastheer fungerende landslakken. Na opname door de eindgastheer dringen de L3-larven door de darmwand heen en migreren ze via portale circulatie, lever, vena hepatica, vena cava en het rechter hart naar de longen. In het longparenchym vinden de laatste twee vervellingen plaats en na ongeveer een week zijn



Figuur 2 Verspreiding vossen in Nederland (Montizaan, 2007)

er jong adulten te vinden. Tijdens de ontwikkeling kruipen de larven en later jonge adulten steeds hoger in de bronchiale boom richting de bronchiën. De prepatente periode is 18-20 dagen en de volwassen wormen leven ongeveer tien maanden (Stockdale, 1970; Conboy, 2004).

Crenosoma vulpis komt over de hele wereld voor en is in een onderzoek van Borgsteede (1984) ook gevonden in Nederlandse vossen waarbij 4,5% was geïnfecteerd (Cobb, 1992). Het aantal geïnfecteerde vossen in Europa varieert van 2% in Groot-Brittannië tot 58% in Noorwegen (Morgan, 2008; Davidson, 2006). Af en toe raken honden ook geïnfecteerd met *C. vulpis* wat vaak een chronische hoest veroorzaakt. Het chronisch hoesten lijkt veel op een allergische respiratoire aandoening. De diagnose kan gesteld worden door het aantonen van L1-larven in de feces met behulp van de Baermann techniek of door het microscopisch aantonen van larven in een bronchiaal spoelsel (Bihr, 1999; Hoff, 1993). De L1-larven worden tot ongeveer 265 (240-290) dagen na infectie nog gevonden in de feces (Anderson, 1992). Conboy (2004) heeft onderzoek gedaan naar het behandelen van *C. vulpis* infecties bij honden. Een eenmalige toediening van milbemycine oxime (0,5 mg/kg) bleek effectief te zijn. Behandelen met fenbendazol (Panacur[®]), levamisol, ivermectine en febantel (Drontal[®]) is ook effectief (Bihr, 1999; Georgi, 1992; Krieglleder, 1988; Hoff, 1993).

Eucoleus aerophilus werd door Borgsteede in 46,8% van de Nederlandse vossen gevonden (Borgsteede, 1984). In andere Europese vossen worden ook hoge percentages gevonden: tussen de 39% in Groot-Brittannië en 88% in Noorwegen. De laagste percentages zijn gevonden in Kroatië (4,7%) en Wit-Rusland (9,6%) (Morgan, 2008; Davidson, 2006; Rajković-Janje, 2002; Shimalov, 2003). In de eindgastheren zitten de adulte wormen in het epitheel van neusgangen, trachea, bronchi en bronchioli en soms worden ze gevonden in de sinus frontalis. De vrouwtjes leggen eieren die worden opgehoest, doorgeslikt en via de feces worden uitgescheiden. De cyclus kan direct of indirect verlopen en na 30-45 dagen zijn de eieren infectieus geworden in de buitenwereld of in regenwormen. Door het eten van infectieuze geëmbryoneerde eieren of door het eten van regenwormen met infectieve stadia raakt een eindgastheer geïnfecteerd. In de dunne darm dringen de larven door de darmwand heen. Via lymfe en het bloed komen ze in de luchtwegen terecht waar ze de mucosa binnendringen. (Taylor, 2007; Traversa, 2009a; Georgi, 1987)

Als eindgastheer heeft *Eucoleus aerophilus* carnivoren zoals vossen en marterachtigen en soms raken honden, katten en mensen geïnfecteerd. Vaak zijn de infecties bij huisdieren mild en verlopen dan asymptomatisch. Ernstigere infecties geven een rhinotracheïtis of bronchitis met verschijnselen als dyspneu, neusuitvloeiing, productieve hoest, niezen en piepen. De diagnose kan gesteld worden door middel van feces onderzoek met de sedimentatieflotatiemethode met suiker-oplossing met een soortelijk gewicht (s.g.) van 1.30 g/m³ of zink-sulfaat met s.g. 1.35 g/m³. De eieren zijn 59-80 x 30-40 µm groot, hebben twee poolproppen en een dikke wand. Behandelen kan met benzimidazolen, ivermectine, of levamisol. Bij mensen wordt capillariasis zeer zelden gezien, de symptomen zijn bronchitis, hoesten, koorts en dyspneu en de infectie kan lijken op een bronchiaal carcinoom (Traversa, 2009a; Taylor, 2007; Georgi, 1987).

Oslerus osleri is een metastrongyloïde nematode met een directe levenscyclus. Adulte wormen leven in de trachea, voornamelijk ter hoogte van de bifurcatie, en in omliggende grote bronchi. De vrouwtjes leggen eieren waarvan een deel uitkomt in de

trachea. De larven en eieren worden opgehoest en kunnen worden doorgeslikt of uitgespuugd. Honden kunnen elkaar besmetten met L1-larven in speeksel of sputum, feces, braaksel en ander materiaal dat L1-larven bevat. Daarnaast is ook autoinfectie mogelijk aangezien de L1-larven infectieus zijn. In de dunne darm vervellen de L1 tot L2 larven en deze migreren via lymfe- en bloedvaten naar de longen. In alveoli en bronchi ontwikkelen ze tot jong adulten en als adulte worm migreren ze naar de trachea. Na ongeveer 70 dagen worden er wormknobbeltjes met adulten gevonden rond de bifurcatie. De knobbeltjes worden steeds groter en er komen er steeds meer. Behandelingen met levamisol, thiabendazole en oxfendazole bleken effectief (Levitan, 1996; Georgi, 1987).

Aangezien de worm een directe levenscyclus heeft en de L1 direct infectieus is wordt deze infectie vooral gezien bij honden die in groepen worden gehouden zoals in kennels en bij zogende puppies (Levitan, 1996). Het meest opvallende symptoom is een harde droge hoest bij inspanning die niet op te wekken is bij larynx palpatie veroorzaakt door een chronische tracheobronchitis (Hare, 1930; Georgi, 1987). Met bronchoscoopie zijn er wormknobbeltjes in de distale trachea en primaire en secundaire bronchiën zichtbaar. Bij een broncho-alveolaire lavage kunnen eieren en L1-larven worden aangetoond in de mucus. In de feces kan men de larven het beste aantonen met zink-sulfaat flotatie maar de uitslag is regelmatig vals negatief (Georgi, 1987)

Filaroides hirthei heeft net als *O. osleri* infectieuze L1-larven en heeft ook geen tussengastheer nodig. Na besmetting met L1-larven is de prepatentperiode 32-35 dagen. De larven kunnen in de feces het best worden aangetoond met zink-sulfaat flotatie, aangezien flotatie met sucrose snel osmotische veranderingen geeft waardoor de larven onherkenbaar zijn. De infectie is feco-oraal overdraagbaar en de L1 is direct infectieus waardoor honden zichzelf kunnen blijven besmetten. Naast het uitscheiden met de feces kunnen de L1-larven ook in het speeksel zitten. Tijdens de zoogperiode kan *F. hirthei* door de teef worden overgedragen door het likken van de puppies. De infectie verloopt bijna altijd asymptomatisch maar in zeldzame gevallen kan er een zeer ernstige infectie ontstaan met tachypneu (Taylor, 2007; Georgi 1987). Behandeling is effectief gebleken met fenbendazole al werden de verschijnselen eerst erger voordat ze verdwenen. Behandeling met albendazole is alleen nog maar gegeven bij honden met een asymptomatische infectie, of dit ook werkt bij dieren met een ernstige infectie is nog onduidelijk (Georgi, 1987).

Morfologie van nematode longworm larven

De verschillende nematode longworm larven zijn te onderscheiden door ze op te meten en te kijken naar de lengte maar voornamelijk door het verschil in de staarten. L1-larven van *Crenosoma vulpis* zijn 265-330 µm lang en hebben een zeer puntige staart (Fig. 3). De staart van L1-larven van *Oslerus osleri* hebben een dorsale inkeping (pijl) en daarna een golvend verloop (Fig. 4). De lengte varieert van 232 tot 266 µm. De L1-larven van *Filaroides hirthei* zijn 240-290 µm lang en hebben een



Figuur 3. Staart *C. vulpis* (McGarry, 2009)

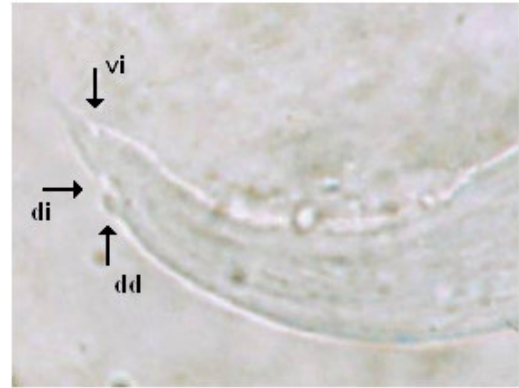
dorsale inkeping (pijl) waarna de staart recht is (Fig. 5). *Angiostrongylus vasorum* L1-larven zijn naar verhouding iets langer namelijk 310-400 µm. De staart heeft een dorsale doorn (dd) en een dorsale (di) en ventrale inkeping (vi)(Fig. 6) (Schnieder, 2006; McGarry, 2009; Conboy, 2000).



Figuur 4 Staart *O. osleri* (McGarry, 2009)



Figuur 5 Staart *F. hirthi* (McGarry, 2009)



Figuur 6 Staart *A. vasorum* (McGarry, 2009)

Doel van de studie

Uit onderzoek van Van Doorn et al.(2009) is gebleken dat angiostrongylose tegenwoordig een autochtone infectie is in Nederland. Deze pilot studie wordt uitgevoerd om er achter te komen of *A. vasorum* inderdaad in Nederland is te vinden in slakken en vossen en op welke manieren dit het best kan worden onderzocht. Om de meeste kans te hebben om *A. vasorum* te vinden zullen er slakken worden onderzocht uit een endemische focus in Nederland: Den Haag. Het verkrijgen van vossen voor het onderzoek is minder makkelijk en daarom zal de meerderheid niet uit Den Haag komen.

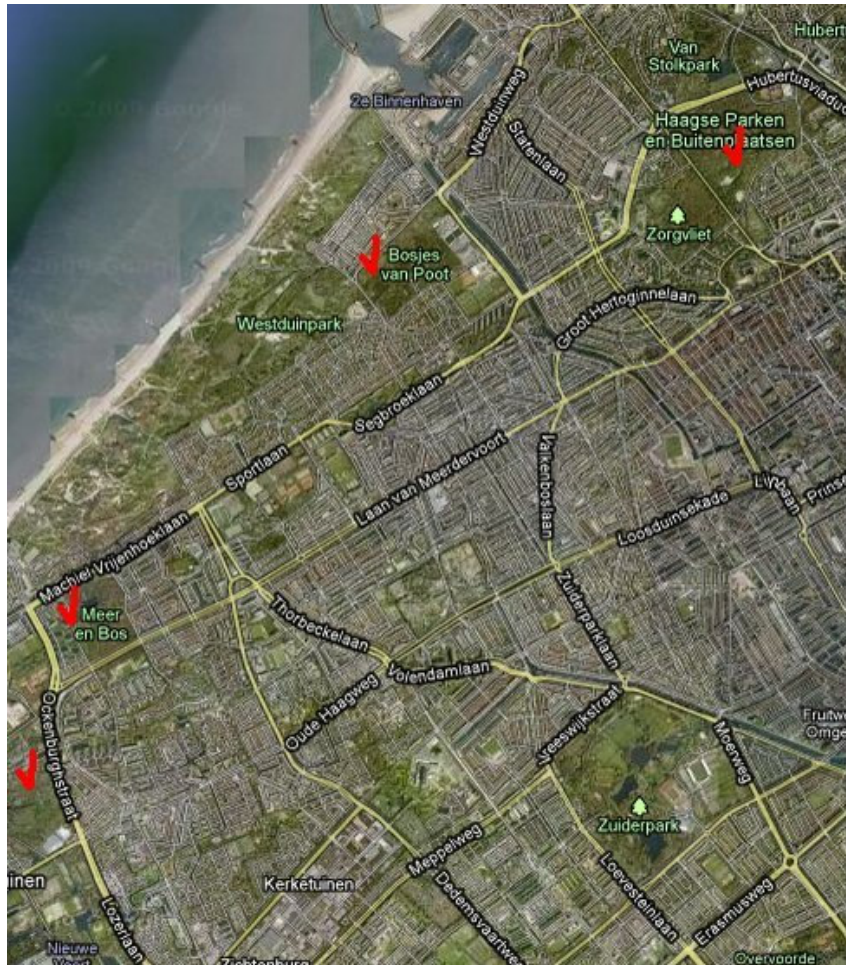
Aangezien *A. vasorum* zich in Nederland gevestigd lijkt te hebben verwachten we dat er een aantal positieve slakken en vossen gevonden worden. In de levenscyclus van *Crenosoma vulpis* nemen slakken en vossen ook een belangrijke plaats in, daarom verwachten we deze nematode mogelijk ook tegen te komen.

Door het in kaart brengen van het voorkomen van *A. vasorum* in een endemische focus in Nederland kunnen dierenartsen op de hoogte worden gebracht van de waarschijnlijkheid dat Nederlandse honden een *A. vasorum* infectie kunnen hebben. Hierdoor zal *A. vasorum* hoger op de differentiaal lijst komen te staan bij een hond met passende verschijnselen.

Materiaal en methode

Slakken verzamelen

Begin oktober 2009 zijn er in Den Haag slakken verzameld. De slakken komen uit vier verschillende parken: park bij Ockenburgh, Bosjes van Poot, Scheveningse bosjes en Meer en bos (Fig. 7). De parken worden gebruikt als recreatiegebied en honden zijn er toegestaan. Het park bij Ockenburgh was het uitlaatgebied van een hond met een dubbelinfectie met *Crenosoma vulpis* en *Angiostrongylus vasorum* en is daarom uitgekozen.



Figuur 7 Verschillende locaties in Den Haag waar slakken zijn verzameld (Google maps).

Slakken houden en determineren

De slakken werden gehouden in plastic bakjes met luchtgaten in de deksels. Op de bodem lagen natte tissues en wat verse bladeren of sla en later alleen komkommer. De slakken zaten per locatie bij elkaar en zijn een aantal dagen na het verzamelen gedetermineerd volgens Gittenberger (1984) en Cameron (1983). Aangezien *Arion lusitanicus* en *Arion rufus* niet op basis van uitwendige kenmerken uit elkaar gehouden kunnen worden zijn er een paar slakken naar het Nationaal Natuurhistorisch Museum Naturalis in Leiden gegaan voor determinatie. Een aantal slakken is gestorven voordat ze gedetermineerd waren, deze slakken zijn wel gebruikt voor het onderzoek.

Parasitologisch onderzoek van slakken

De meerderheid van de slakken is individueel onderzocht. Ongeveer een kwart van de slakken is onderzocht in batches bestaande uit slakken van dezelfde soort en herkomst.

Om larven uit de slakken te isoleren zijn er verschillende methodes gebruikt. Allereerst zijn de slakken die dood zijn gevonden in hun bakje op een grove zeef in stukjes geknipt en in een Baermann glas gelegd, zo dat het zeefje onder water ligt (methode 1a). Een deel van de nog levende slakken is op twee verschillende manieren ook op een grove zeef in een Baermann glas gelegd. Bij de eerste methode zijn de slakken levend op de zeef in stukjes geknipt waarna het Baermann glas is gevuld met water (methode 1b). Bij de andere methode zijn de slakken gedood in 23% alcohol waarna ze met de alcohol waar ze in zijn gedood op de zeef zijn gelegd. Op de zeef zijn de slakken in stukjes geknipt waarna het glas verder gevuld is met water (methode 1c). Bij alle drie de methodes zijn er de volgende dag monsters uit de punt van het Baermann glas opgezogen met een glazen pipet en in een embryoblokje onder de stereomicroscop bij 40x bekeken (Bijlage 1).

Daarnaast is er gebruik gemaakt van weefseldigestie. De verteringsvloeistof die is gebruikt bestond uit 1 liter water met daarin 15 mililiter van 25% HCl –oplossing en 1,5 gram pepsine (0,50 – 0,70 FIP-eenheden/mg) en is in een stoof op 37°C gehouden (Yousif, 1975)(Bijlage 4). Een aantal slakken zijn levend in stukjes geknipt en daarna 24 uur in de stoof bij 37°C in een bakje met verteringsvloeistof gelegd (methode 2a). Een ander deel van de slakken is levend in stukjes geknipt en daarna 30 minuten lang in verteringsvloeistof in de stoof op een schudmachine geplaatst (methode 2b). Vervolgens werd bij beide methodes de vloeistof over een grove zeef in een Baermann glas gegoten om de grote stukken onverteerde slak kwijt te raken. Na ongeveer een half uur werd de bovenste laag vloeistof afgegoten en aangevuld met water om de verteringsvloeistof te verdunnen. Het bezinksel werd onder een stereomicroscop bij 40x bekeken (Bijlage 2).

De weefseldigestie is ook op een andere manier toegepast. Hierbij werd een deel van de slakken gedood in 23% alcohol en daarna in stukjes geknipt op een katoenen gaasje (methode 3a). De rest van de slakken werd levend in stukjes geknipt op een katoenen gaasje (methode 3b). Het gaasje met slakkenstukken werd in een met verteringsvloeistof gevulde Falconbuis gehangen. De Falconbuis werd twee tot drie uur in de stoof bij 37°C geplaatst waarna het gaasje met de slak werd verwijderd. De falconbuis werd 2 minuten gecentrifugeerd met een snelheid van 3000 rpm (zonder stop). Na het centrifugeren werd de buis afgegoten en het sediment met behulp van een vortex geresuspendeerd en in een embryoblokje gegoten. De Falconbuis werd nog een keer omgespoeld met 2 mililiter water en wederom even op de vortex en in een embryoblokje gegoten. De embryoblokjes werden onder een stereomicroscop bij 40x bekeken (Bijlage 3).

Wanneer er veel vrijlevende larven aanwezig zijn in de embryoblokjes, worden deze aangekleurd met jodiumoplossing (5% I₂, 10% KI, 10 x verdund) voor het bekijken onder de stereomicroscop. Nadat de kleurstof is ingetrokken worden de larven ontkleurd met natriumthiosulfaat (40 g/L). De niet parasitaire larven zullen sneller ontkleuren dan de parasitaire larven op deze manier is het duidelijk te zien onder de stereomicroscop welke larven bestudeerd moeten worden.

Vossen

Zeventien van de onderzochte vossen zijn afkomstig van de Sallandse heuvelrug waar ze zijn geschoten door jagers. Gegevens zoals leeftijd en geslacht van deze vossen staan in bijlage 6. De vossen zijn opgestuurd naar het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) voor screening op *Echinococcus multilocularis*. De vossen zijn minstens één week ingevroren geweest bij -80°C voor er sectie werd gedaan. Daarnaast zijn er drie vossen van de dierenambulance in Den Haag onderzocht. Deze vossen waren verkeersslachtoffers en zijn in de vriezer bij -20 °C bewaard tot de dag van sectie op de Faculteit Diergeneeskunde, afdeling Pathologie. Ook is er één vos onderzocht die is geschoten door jagers in de Wieringermeer. Deze vos is een tijd in de vriezer bewaard bij -20 °C tot de sectie op de Faculteit Diergeneeskunde. Aan het einde van het onderzoek zijn er bij de afdeling Pathologie twee vossen uit het Nationaal Park de Hoge Veluwe ter sectie aangeboden. Deze vossen zijn ook opgenomen in het onderzoek.

Longwormen uit vossenlongen verzamelen

Longspoelen

Van alle vossen van de Sallandse heuvelrug zijn de longen op het RIVM gespoeld volgens een gemodificeerde Inderbitzen techniek (Bihr, 1999)(Bijlage 5). Tijdens de sectie zijn hart en longen met de trachea eraan verwijderd. Het hele pakket werd op een 150 µm zeef geplaatst die weer op een 38 of 20 µm zeef stond. Het pericardium werd geopend met een schaar waarna met een scalpel een incisie werd gemaakt in het rechter ventrikel. Met een schaar werd het rechter ventrikel verder open geknipt. Een 1 milliliter pipet, via een slang verbonden met een waterpomp, werd in de arterie pulmonalis geplaatst waardoor de longen werden gespoeld met fysiologisch zout (0,9% NaCl). De longen werden ongeveer 2 minuten gespoeld totdat ze helemaal bleek wit waren geworden. Na het spoelen zijn de longen in een plastic zakje bewaard voor verder onderzoek.

De zeven waar het longspoelsel door is opgevangen werden gereinigd met fysiologisch zout uit de waterpomp en het materiaal op de zeven is verzameld in potjes. Het longspoelsel is uiteindelijk in een Baermann glas gegoten om te bezinken. Na 1 uur is 15 mililiter van het bezinksel in een Falconbuisje gepipetteerd en na 24 uur is dit nog een keer herhaald. Het sediment is bekeken onder een stereomicroscop bij 40x vergroting.

Longen knippen

Alle longen verzameld op het RIVM en alle longen na sectie verkregen uit de Den Haagse vossen en de vossen uit het Wieringermeer en het Nationaal Park de Hoge Veluwe zijn opengeknipt om adulte longwormen te vinden. Met een schaar werd eerst de trachea open geknipt en daarna elke bronchi waar een schaar inpast. Ook de arterie pulmonalis en al zijn vertakkingen zijn opengeknipt om *Angiostrongylus vasorum* adulten te vinden. Na het knippen zijn hart en longen in een bak met lauwwarm water goed uitgespoeld. Hierna zijn hart en longen weggegooid. Het spoelwater is over een 20 µm zeef gegaan en de zeef is gereinigd met kraanwater. Alles wat op de zeef is achtergebleven is op een petrischaaltje onder een stereomicroscop bij 10x bekeken.

Feces monsters vossen

Van alle vossen die zijn onderzocht op de afdeling Pathologie zijn er fecesmonsters onderzocht. Ook de feces van een aantal vossen van de Sallandse heuvelrug is onderzocht. Daarnaast zijn er in twee natuurgebieden, de Oostvaardersplassen en het Nationaal Park de Hoge Veluwe, vossenkeutels geraapt voor fecesonderzoek. Op de Oostvaardersplassen zijn er drie fecesmonsters verzameld en in het Nationaal Park de Hoge Veluwe tien fecesmonsters. De fecesmonsters van de vossen onderzocht bij de afdeling Pathologie en van de vossen van de Sallandse heuvelrug zijn verkregen uit de darmen tijdens de sectie. Alle monsters zijn met de suikerflotatiemethode (s.g. 1.30 g/m³) onderzocht. Allereerst zijn de monsters onderzocht in het kader van de veiligheid om *Taenia* type eieren op te sporen, gezien het risico op *Echinococcus multilocularis*. Daarnaast kon er vast gekeken worden of er larven in de ontlasting zaten. Vervolgens is er van de meeste monsters ook een Baermann ingezet.

Wanneer er veel vrijlevende larven in het te bekijken Baermann-product aanwezig zijn, worden deze aangekleurd met jodiumoplossing voor het bekijken onder de stereomicroscoop. Nadat de kleurstof grotendeels is ingetrokken worden de larven ontkleurd met natriumthiosulfaat. De niet parasitaire larven zullen sneller ontkleuren dan de parasitaire larven en op deze manier is het duidelijk te zien onder de stereomicroscoop welke larven bestudeerd moeten worden.

Resultaten

Slakken verzamelen en determineren

In totaal zijn er 70 slakken verzameld in vier parken in Den Haag. De meeste slakken zijn verzameld in het park bij Ockenburgh. Er zijn negen verschillende soorten slakken gevonden waarvan de meerderheid behoorde tot *Arion spp.* en *Tandonia spp.* Tussen *Arion lusitanicus* en *A. rufus* kan er op basis van uiterlijke kenmerken geen onderscheid gemaakt worden en daarom zijn er een aantal slakken van deze soort op inwendige organen gedetermineerd. De slakken bleken van het soort *Arion lusitanicus* te zijn. Aangezien na deze determinatie de slakken niet meer bruikbaar zijn voor het onderzoek, is besloten verder geen slakken meer te determineren. Daarom wordt in het vervolg van het onderzoek gesproken over *Arion spp.*

Van de 70 slakken zijn er 56 onderzocht omdat er een aantal zijn opgeofferd voor determinatie en een paar slakken zijn helemaal uitgedroogd waardoor ze niet meer bruikbaar waren voor onderzoek.

Parasitologisch onderzoek van slakken

In een groot deel van de slakken zijn er vrijlevende nematode larven gevonden en in een aantal slakken is geen enkele larve gevonden. Het is van belang hierbij te vermelden dat er niet specifiek naar *Crenosoma vulpis* is gekeken.

In een batch van ongedetermineerde naaktslakken die onderzocht is volgens methode 1a, waarbij dode slakken op een Baermann in stukjes werden geknipt, zijn twee larven gevonden die erg lijken op L3-larven van *Angiostrongylus vasorum*. Bij een 40x vergroting was de lengte van een van de larven 525 µm en de slokdarm was 210 µm lang. Deze maten vallen precies binnen de lengtes die Ash (1970) heeft gemeten: lengte gemiddeld 551 µm (508-610 µm) en gemiddelde lengte van de slokdarm 190 µm (170-212 µm). Het is zeer waarschijnlijk dat deze larven inderdaad L3 van *A. vasorum* zijn maar dit is niet bevestigd met PCR.

In vier van de acht *Tandonia sowerbyi* slakken gevonden in de Bosjes van Poot, alle vier onderzocht volgens methode 1c, zijn metacercariën gevonden. Deze metacercariën behoren tot het genus *Brachylaima* (Trematoda, Brachylaimidae) en worden vaker in *T. sowerbyi* slakken gevonden (Cragg, 1957). Naast de metacercariën zijn er geen larven in de slakken gevonden (Tabel 1).

Bij methode 1a zijn de dood gevonden slakken in stukken geknipt op een grove zeef en in een Baermann glas geplaatst. In één batch zijn er met deze methode waarschijnlijk L3-larven van *Angiostrongylus vasorum* gevonden. Ook zijn er in drie slakken op deze manier geheel geen larve gevonden. De overige acht keer zijn er met deze techniek vrijlevende larven gevonden. Methode 1b is slechts één maal uitgevoerd, hierbij werd een slak levend in stukjes geknipt op een grove zeef en in een Baermann glas geplaatst. Dit resulteerde de volgende dag in larven die dreven in het water in het Baermann glas. Alle andere slakken zijn gedood in de alcohol om het slijm kwijt te raken voordat ze op de Baermann werden geknipt, methode 1c. Met deze methode zijn er geen drijvende larven meer ontstaan. Van de vijftien keer dat deze methodiek is gebruikt zijn er dertien keer vrijlevende larven gevonden en twee keer helemaal geen larven.

Tabel 1 Slakken soorten en geïsoleerde larven

Park in Den Haag	Slakken soort	Gevonden larven
Ockenburgh	<i>Arion subfuscus</i>	Vrijlevende nematoden
	<i>Arion spp.</i>	Vrijlevende nematoden
	<i>Tandonia sowerbyi</i>	Vrijlevende nematoden
	<i>Tandonia spp.</i>	
	<i>Cepaea nemoralis</i>	Metacercari van <i>Postharmostomum sp.</i>
	<i>Limax maximus</i>	
Bosjes van Poot	Ongedetermineerde naaktslakken	Vrijlevende nematoden en <i>A. vasorum</i> L3
	<i>Tandonia sowerbyi</i>	Metacercariën van <i>Brachylaima sp.</i>
	<i>Arion spp.</i>	
Meer en bos	Ongedetermineerde naaktslak	
	<i>Arion hortensis</i>	Vrijlevende nematoden
	<i>Deroceras laeve</i>	
	<i>Cepaea nemoralis</i>	Vrijlevende nematoden
Scheveningse bosjes	Ongedetermineerde slak	
	<i>Arion spp.</i>	Vrijlevende nematoden

Methode 2a is zestien keer toegepast waarbij er batches slakken 24 uur in verteringsvloeistof in de stoof (37°C) geplaatst werden. Bij deze methode zijn er uiteindelijk helemaal geen larven gevonden. Methode 2b is één keer gebruikt en daarbij is een slak in stukjes geknipt en verteerd in de stoof op de schudmachine. Dit leverde vrijlevende nematode larven op.

Methode 3a is negen keer toegepast waarbij er slakken gedood zijn in de alcohol en daarna geknipt op een katoenen gaasje. Bij deze methodiek is er drie keer helemaal geen larve gevonden. De andere zes keer zijn er vrijlevende larven gevonden. Twee slakken zijn levend op het katoenen gaasje in stukken geknipt, methode 3b, en bij beide werden er geen larven gevonden (Tabel 2).

Ten slotte moet genoemd worden dat de gebruikte methodes moeilijk met elkaar te vergelijken zijn. Naast het onderzoeken van de verzamelde slakken zijn er namelijk geen controles ingezet om de methode te controleren.

Tabel 2 Methodes isolatie larven uit slakken

Methoden	Aantal keer uitgevoerd	Resultaten
1 Grove zeef op Baermann		
a Dood gevonden	13	3x geen larven, 1x mogelijk <i>A. vasorum</i> L3, 8x vrijlevende nematoden
b Levend geknipt	1	drijvende larven
c Gedood in alcohol	15	2x geen larven, 13 x vrijlevende nematoden
2 Vertering in bak		
a 24 uur verteerd	16	16 x geen larven
b 30 min schuddend verteerd	1	vrijlevende nematoden
3 Verteerd op katoenen gaasje		
a Gedood in alcohol	9	3x geen larven, 6x vrijlevende nematoden
b Levend geknipt	2	2x geen larven

Longwormen uit vossenlongen verzamelen

In de longen van de Sallandse vossen zijn een aantal (long)wormen gevonden. Het meest gevonden is *Eucoleus aerophilus*. In zes verschillende longen zijn er adulten van deze longworm gevonden na het knippen van de longen. In drie longspoelsels zijn er

Capillaria eieren gevonden waarvan er één keer ook adulten zijn gevonden tijdens het knippen. In totaal waren er acht van de zeventien vossen (47%) positief voor *Eucoleus aerophilus*. In één longspoelsel zaten een paar *Crenosoma vulpis* adulten en bij het knippen van de longen zijn er ook één keer *C. vulpis* adulten gevonden. Tijdens het spoelen kwam er bij een vos een adulte *Toxocara canis* uit de longen en in een ander spoelsel van een twee maanden oud vosje zijn er meerdere *T. canis* larven gevonden. Van de zeventien vossen zijn er bij zeven vossen geen parasitaire wormen in hart of longen gevonden.

De longen van de vossen uit Den Haag zijn wegens omstandigheden niet gespoeld, deze zijn na de sectie gelijk geknipt. In alle drie de vossen zijn adulten *Angiostrongylus vasorum* gevonden. In twee vossen zijn er vijf adulten gevonden en in de derde vos is er alleen een stukje adult gevonden met de karakteristieke bursa van een *A. vasorum* mannetje. Één vos had naast de *A. vasorum* adulten ook adulten van *Eucoleus aerophilus* en *Crenosoma vulpis*. De andere hadden alleen *A. vasorum*. De longen van de vos uit Wieringermeer zijn ook alleen geknipt na de sectie en er is geen enkele worm gevonden.

Op de afdeling Pathologie is er sectie gedaan op twee vossen uit het Nationaal Park de Hoge Veluwe. Bij de eerste vos zijn er bij het openknippen van het hart meerdere adulten van *Angiostrongylus vasorum* gevonden en bij het knippen van de longen zijn er adulten van *Eucoleus aerophilus* gevonden. Bij de tweede vos zijn er 4 adulten van *A. vasorum* gevonden tijdens het spoelen van de longen en daarnaast ook *Eucoleus aerophilus* adulten.

In totaal hadden elf van de 23 vossen (48%) *Eucoleus aerophilus*, drie (14%) *Crenosoma vulpis*, twee (10%) *Toxocara canis* en vijf (22%) *Angiostrongylus vasorum* (Tabel 3). Alle overige gevonden wormen bij de vossen staan in bijlage 7.

Capillaria eieren zijn alleen gevonden in de longspoelsels terwijl de adulten alleen zijn gevonden bij het knippen van de longen. In monsters waar *Capillaria* eieren zijn gevonden zijn in de bij behorende longen niet altijd adulten gevonden en in de spoelsels zijn niet altijd *Capillaria* eieren gevonden wanneer er adulten zijn gevonden in de longen. *Crenosoma vulpis* adulten zijn gevonden in een longspoelsel en bij het knippen.

Feces monsters vossen

Van drie vossen van de Sallandse heuvelrug is er feces uit de dikke darm onderzocht met de suikerflotatiemethode. In alle drie de monsters zijn er *Toxocara* eieren gevonden en in twee van de monsters zaten ook een aantal *Capillaria* eieren.

Tijdens de sectie op de vossen uit Den Haag zijn er ook fecesmonsters uit het colon gehaald. Een van de vossen had maar een heel klein beetje ontlasting in het colon. Alle drie de fecesmonsters zijn onderzocht met de suikerflotatiemethode. Het kleine fecesmonster was negatief. In één van de drie monsters zaten *Capillaria* eieren en een enkel *Strongylus* type ei. Het laatste monster bevatte L1-larven van *Angiostrongylus vasorum*. De larven waren duidelijk te herkennen aan hun karakteristieke staart met een duidelijke knik en dorsale doorn (Conboy, 2000; Barutzki, 2009; Schnieder, 2006). De rest van de feces is onderzocht met de Baermann techniek maar de volgende dag waren er geen larven te vinden.

De feces uit de darmen van de vossen uit het Nationaal Park de Hoge Veluwe zijn onderzocht met de suikerflotatiemethode. Bij de eerste vos zaten er L1-larven van *Angiostrongylus vasorum*, twee soorten *Capillaria* eieren (*E. aerophila* en *C. plica*), *Toxascaris* eieren en Strongylus type eieren in. Bij de tweede vos zijn er L1-larven van *Angiostrongylus vasorum*, *Toxascaris* eieren en *Capillaria* eieren gevonden

In de feces van de vos uit Wieringermeer zijn er met de suikerflotatiemethode *Capillaria* eieren en Strongylus type eieren gevonden.

De drie fecesmonsters geraapt in Oostvaardersplassen zijn onderzocht in de Baermann. De volgende dag is het sediment uit de punt van de Baermann bekeken en één monster zat vol met *Angiostrongylus vasorum* L1-larven. In een van de andere monsters zaten een heleboel larven van vrijlevende nematoden met daar tussen ook L1-larven van *Angiostrongylus vasorum*. In het laatste monster zijn alleen vrijlevende nematoden gevonden.

In het Nationaal Park de Hoge Veluwe zijn er tien vossenkeutels geraapt waarvan een mengmonster is gemaakt dat is onderzocht met de suikerflotatiemethode. In dit mengmonster zaten L1-larven van *Angiostrongylus vasorum*, *Toxascaris* eieren en twee soorten *Capillaria* eieren (*E. aerophila* en *C. plica*). Van de individuele monsters is een Baermann ingezet. De volgende ochtend bleken acht van de tien fecesmonsters L1-larven van *A. vasorum* te bevatten.

Tabel 3 Gevonden longwormen bij de vossen met longonderzoek

	Aantal positieve vossen (aantal onderzocht)	Gevonden stadia		
		eieren	larven	adulten
Sallandse heuvelrug				
<i>Eucoleus aerophilus</i>	8 (17)*	V		V
<i>Crenosoma vulpis</i>	2 (17)			V
<i>Toxocara canis</i>	2 (17)		V	V
Den Haag				
<i>Eucoleus aerophilus</i>	1 (3)			V
<i>Crenosoma vulpis</i>	1 (3)			V
<i>Angiostrongylus vasorum</i>	3 (3)			V
Wieringermeer	0 (1)			
Hoge Veluwe				
<i>Angiostrongylus vasorum</i>	2 (2)			V
<i>Eucoleus aerophilus</i>	2 (2)			V
Totaal				
<i>Eucoleus aerophilus</i>	11 (23)	V		V
<i>Crenosoma vulpis</i>	3 (23)			V
<i>Angiostrongylus vasorum</i>	5 (23)			V

* Bij het spoelen zijn bij 3 vossen eieren gevonden en bij het knippen bij 6 vossen adulten. Bij 1 vos zijn er bij het spoelen eieren en bij het knippen adulten gevonden.

Discussie

Slakken onderzoek

Bij het onderzoeken van de slakken is er op één batch na geen *Angiostrongylus vasorum* gevonden. Of er inderdaad geen L3 in de slakken zat of dat de gebruikte onderzoeksmethoden niet goed waren, was niet mogelijk tijdens deze studie te onderzoeken. Ferdushy et al.(2009) hebben in Denemarken in verschillende parken slakken verzameld en hebben daar verschillende prevalenties L3 gevonden. De percentages varieerden van 0% tot 26% met een gemiddelde prevalentie van 9%. Het zou dus kunnen zijn dat de prevalentie in slakken zo laag is dat het aantal onderzochte slakken in deze studie te laag is geweest om geïnfecteerde slakken te vinden. Een andere mogelijkheid is dat de gebruikte onderzoeksmethodes niet goed hebben gewerkt. Om dit te onderzoeken zouden in een vervolg onderzoek slakken moeten worden ingespoten met bijvoorbeeld L1 van *Muellerius capillaris*. Gedurende verschillende tijdstippen na infectie moeten de slakken worden onderzocht. Bij het toepassen van onze gebruikte methodes zal uit deze infectieproef blijken of de L2 en L3 teruggevonden kunnen worden en zo ja wanneer in de cyclus.

Aangezien er zeer verschillende methodes zijn gebruikt in het slakkenonderzoek en er geen controles zijn uitgevoerd, is het niet mogelijk deze op basis van de resultaten met elkaar te vergelijken. Er zijn echter wel verschillen in de uitvoerbaarheid van de verschillende methodes. De methode waarbij dood gevonden slakken in stukjes worden geknipt op een grove zeef in een Baermann glas (1a), is makkelijk uitvoerbaar. Een nadeel is echter dat het regelmatig een heleboel larven oplevert in de punt van het Baermann glas. Deze larven zijn vaak verschillende soorten vrijlevende larven met mogelijk wat parasitaire larven van de slak. Het is lastig en kost veel tijd om deze larven allemaal goed te bekijken en er mogelijke L3-larven van *Angiostrongylus vasorum* tussen uit te halen. Een goed hulpmiddel hierbij is echter het aankleuren van de larven met jodiumoplossing en na een tijdje ontkleuren met natriumthiosulfaat. Hierdoor vallen de parasitaire larven makkelijk op doordat zij langer de kleurstof vasthouden. Methode 1b, waarbij een levende slak op een zeef in een Baermann glas in stukjes wordt geknipt, is net zo makkelijk uitvoerbaar maar heeft als nadeel dat de levende slak veel slijm bij zich heeft. Na 24 uur staan kunnen de larven door al het slijm zijn gaan zweven door het hele Baermann glas waardoor het heel moeilijk is om alle larven te kunnen bekijken. Om dit op te lossen zou je de inhoud van het Baermann glas kunnen centrifugeren zodat alle larven toch naar de bodem zinken en ze allemaal in één keer kunnen worden bekeken. Bij methode 1c zijn de slakken gedood in alcohol om van het slijmprobleem af te komen. Er zit wel een nadeel aan deze methode, Barçante et al.(2003) hebben namelijk gevonden dat externe irriterende stimuli ervoor kunnen zorgen dat er meer infectieuze *A. vasorum* larven uit een slak vrijkomen. Of alcohol een stimulus is die dit kan veroorzaken is niet bekend maar het zou goed mogelijk kunnen zijn en dus moet de alcohol ook onderzocht worden. Bij methode 1c is dit gedaan door de alcohol in het Baermann glas erbij te gooien. Het is weliswaar niet duidelijk of de alcohol de larven aantast waardoor ze niet meer herkenbaar zouden zijn.

Methode 2a kost veel wachttijd omdat het 24 uur in de stoof staat en kost daarna nog tijd door het spoelen van het sediment. Door het lange verteren is het mogelijk dat de larven ook helemaal verteerd worden en je ze niet meer terugvindt. Volgens Yousif et al.

(1975) is drie uur verteren voldoende maar aangezien de slakken niet voldoende verteerd leken, is er voor gekozen de slakken langer in de verteervloeistof te laten staan. De schudmachine waarop de slakken in de verteervloeistof staan bij methode 2b, neemt veel ruimte in in de stoof en is daardoor ook wat onhandig in het gebruik. Een voordeel van de schudmachine is dat het verteringsproces een stuk sneller verloopt. Door het verteren blijven de larven die bestand zijn tegen de vloeistof over. Hierdoor raak je een groot deel van de vrijlevende larven kwijt en is de zoektocht naar *A. vasorum* wat makkelijker.

Methode 3a en b zijn makkelijk praktisch uitvoerbaar, hierbij worden de slakken in stukjes geknipt op een katoenen gaasje waarna ze op het gaasje in een Falconbuis met verteringsvloeistof worden gehangen. Na twee tot drie uur verteren in de stoof worden de slakkenresten met het katoenengaasje verwijderd en wordt de Falconbuis gecentrifugeerd. Na het centrifugeren kan de verteringsvloeistof worden afgegoten en nadat het sediment is geresuspendeerd met 2 mililiter water kan het worden bekeken onder de stereomicroscop.

Deze methode heeft de volgende voordelen. Het centrifugeren na het verteren heeft als voordeel dat er geen dag gewacht hoeft te worden op het bezinken van de larven en dat er dezelfde dag nog gekeken kan worden naar de larven in de slak. Door de verteringsvloeistof raak je weer een groot deel van de vrijlevende larven kwijt. Bij deze methode zijn er na het verteren nog regelmatig vrijlevende larven gevonden. Dit zou erop kunnen wijzen dat een aantal vrijlevende larven bestand zijn tegen de verteringsvloeistof of dat de verteringsmethode nog niet optimaal is. Het verteren zou misschien langer moeten of de verteringsvloeistof bevat mogelijk niet de juiste hoeveelheid HCl en/of pepsine. Bij methode 3a is het advies om de alcohol waarin de slak is gedood apart te onderzoeken omdat het niet duidelijk is of de alcohol effect heeft op de verteringsvloeistof.

Bij bijna alle methodes (1b en 2b niet) zijn er bij een aantal slakken helemaal geen larven gevonden. Gezien de vrijlevende larven en de eigen parasieten van de slak lijkt dit erg vreemd. Zeker bij methode 1a en c, waarbij er geen verteringsvloeistof aan te pas komt die de larven kan aantasten, is het vreemd dat er geen larven in de slak lijken te zitten. Het is misschien mogelijk dat door het langdurig houden van de slakken in plastic bakjes op vochtige tissues, een wormvrije omgeving, dat de slakken de larven kwijt raken. Gedurende de gehele periode van dit onderzoek is het een aantal malen voorgekomen dat er slakken zonder larven werden gevonden. Het is dus niet waarschijnlijk dat slakken hun larven kwijt raken wanneer ze op tissues gehuisvest worden.

Vossen onderzoek

Bij alle drie de Den Haagse vossen zijn er adulten van *A. vasorum* gevonden. In twee vossen zijn er vijf adulten gevonden en in de laatste vos is er alleen een achterste deel met bursa van een *A. vasorum* mannetje gevonden. Of deze vos ook daadwerkelijk besmet was valt te betwijfelen, het zou ook mogelijk kunnen zijn dat dit wormstukje van één van de andere vossen uit Den Haag afkomstig is. De zeven en petrischalen zijn tussen door zo goed mogelijk omgespoeld maar het zou kunnen dat er toch een stukje is achtergebleven.

De vossen uit Den Haag zijn gestorven door een verkeersongeluk, alle andere vossen zijn gedood door jagers. Twee van de aangereden vossen hadden sowieso *A. vasorum* dus misschien zijn deze dieren enigszins verzwakt en is de kans groter dat een

vos met *A. vasorum* wordt aangereden. Het gevonden infectie percentage van 100% bij de Den Haagse vossen is dus mogelijk hoger dan dat het in werkelijkheid is.

Bij het onderzoeken van de vossenlongen zijn er twee verschillende methodes gebruikt. De meeste longen zijn gespoeld met behulp van een waterpomp en zijn later nog geknipt. De longen van vossen die in hun thorax zijn geschoten zijn meestal niet gespoeld. Bij deze longen komt de spoelvloeistof niet alleen uit de trachea maar spuit uit allerlei gaten in verschillende longlobben en hierdoor kunnen niet alle lobben goed worden gespoeld. Deze longen en de longen van de vossen uit Den Haag zijn alleen geknipt. Door het spoelen van de longen kunnen vooral eieren en larven in de longen gevonden worden. Bij het knippen worden meestal de adulten gevonden. In sommige gevallen zijn bij het spoelen wel eieren van *E. aerophilus* gevonden terwijl bij het knippen van de bijbehorende longen geen adulten zijn gevonden. Ook andersom is het voorgekomen dat er wel adulten zijn gevonden maar geen eieren. Het is dus aan te raden om het spoelen en knippen van de longen te combineren zodat er een grotere kans is dat de aanwezige longwormen gevonden worden.

Beide methodes zijn makkelijk uit te voeren, mits bij het spoelen de longen niet zijn doorzeeft met kogels. De adulten van *Eucoleus aerophilus* zijn alleen maar gevonden bij het knippen van de longen, spoelen brengt ze niet tevoorschijn. Daarnaast is het ook mogelijk dat de adulten zich in de neusholte of sinussen bevinden en niet in de longen. *Crenosoma vulpis* adulten zijn met allebei de methoden gevonden. Van de longen die alleen geknipt zijn waren de adulten die hierbij zijn gevonden goed intact gebleven. De *Crenosoma* adulten die gevonden zijn na het spoelen waren in twee stukken gescheurd.

In één van de longen is tijdens het spoelen een *Toxocara canis* adult gevonden. De longen zijn echter niet de plek waar je *T. canis* adulten zou verwachten. Mogelijk is tijdens de agonie een adult opgebraakt en ingeademd waardoor deze in de longen terecht is gekomen. In een longspoelsel van een andere vos zijn er *Toxocara* larven gevonden. Gezien de levenscyclus van deze worm is het niet vreemd dat er larven zijn gevonden in de longen.

Tijdens het onderzoeken van de vossenlongen zijn er helemaal geen larven van longwormen gevonden. In een aantal longen zijn er tijdens het knippen adulte vrouwtjes vol met eieren of larven (eieren bij *A. vasorum*, larven in *C. vulpis*) gevonden. In het spoelsel van deze longen is echter geen enkele larve gevonden. Er zijn dus alleen adulten gevonden en geen larven. Alle vossen zijn ingevroren geweest en soms zijn de longen nog een keer ingevroren als deze niet direct onderzocht konden worden. Het is mogelijk dat de larven niet goed bestand zijn tegen het invriezen waardoor ze niet meer gevonden worden bij het spoelen en knippen van de longen. Dit in tegenstelling tot persoonlijke communicatie met Gary Conboy die in Canada nog larven van *Crenosoma vulpis* heeft gevonden die een tijd bij -80 C ingevroren zijn geweest. Het zou kunnen zijn dat de longwormstammen in Canada beter zijn aangepast aan koude temperaturen dan de stammen in Nederland.

Van de fecesmonsters die geraapt zijn op de Oostvaardersplassen en in het Nationaal Park de Hoge Veluwe waren er een aantal positief voor *A. vasorum*. Aangezien we niet weten van hoeveel vossen deze monsters afkomstig zijn is het moeilijk om het aantal positieve vossen in deze gebieden in te schatten. Verder onderzoek naar vossen in deze gebieden is nodig om een beter beeld te krijgen van het voorkomen van *Angiostrongylus vasorum* ter plaatse.

In totaal hadden vijf van de 23 vossen waarvan de longen zijn onderzocht *Angiostrongylus vasorum*. Dit is 22% van het totaal en in Den Haag en het Nationaal Park de Hoge Veluwe een percentage van 100%, hier kwamen dus alle besmette vossen vandaan. Het gevonden percentage van 100% is mogelijk hoger dan de werkelijkheid gezien het lage aantal onderzochte vossen in deze gebieden. In Europa variëren de percentages geïnfecteerde vossen van 1% in Kroatie tot 48,6% in Denemarken (Saeed, 2006; Rajković-Janje, 2002). Bij de meeste van deze onderzoeken is het echter niet duidelijk of de onderzochte vossen wel of niet uit een endemische focus komen. In een deel van deze onderzoeken is het percentage voortgekomen uit onderzoek van vossen binnen en buiten een endemische focus, waardoor het gevonden percentage lager uitkomt dan ons percentage van 100%. Concluderend zijn de verschillende percentages uit de verschillende landen en de verschillende onderzoeken moeilijk te vergelijken.

Borgsteede (1984) heeft eind jaren '70 139 vossen onderzocht, afkomstig uit Nederlands grensgebied met Duitsland. Toen is er geen *Angiostrongylus vasorum* gevonden in Nederlandse vossen. Dit zou kunnen komen doordat er vossen buiten endemische gebieden zijn onderzocht. Een andere mogelijkheid is dat *A. vasorum* ergens in de periode tussen het onderzoek van Borgsteede en nu in Nederland is geïntroduceerd.

Conclusie

Op verschillende plaatsen in Nederland (Den Haag, Oostvaardersplassen en het Nationaal Park de Hoge Veluwe) is *Angiostrongylus vasorum* aangetoond in slakken, vossen of fecesmonsters van vossen (Figuur 8). Het is belangrijk om verder onderzoek te doen naar het voorkomen van *A. vasorum* in Nederland om uit te vinden of er nog meer endemische foci zijn.

Uit het slakken onderzoek is gebleken dat methode 1a en methode 3b praktisch goed uitvoerbare methoden zijn. Er moet echter nog wel onderzoek gedaan worden naar de mogelijkheid van deze methodieken om de larven daadwerkelijk aan te tonen. Dit kan het best gebeuren door middel van een infectieproef in een periode dat er veel slakken te vinden zijn, in de lente of de herfst. Deze infectieproef is reeds in de discussie besproken.

Het onderzoeken van vossenlongen met het spoelen en knippen is een uitstekende methode om longwormen aan te tonen. Aangezien er bij het spoelen en bij het knippen respectievelijk larven en adulten kunnen worden gevonden is het aan te raden deze methoden te combineren.

Van Doorn et al.(2009) heeft aangetoond dat Nederlandse honden die nooit in het buitenland zijn geweest, besmet zijn met *Angiostrongylus vasorum*. Het vinden van positieve vossen is wederom een aanwijzing dat *Angiostrongylus vasorum* in Nederland aanwezig is.



Figuur 8 *Angiostrongylus vasorum* in Nederland

Dankwoord

Graag wil ik in dit dankwoord als eerste Herman Cremers bedanken voor zijn kennis en kunde, maar bovenal voor zijn enthousiaste begeleiding. Daarnaast wil ik natuurlijk de afdeling Parasitologie van de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Utrecht, bedanken. In het bijzonder wil ik hier Rolf Nijse, Harm Ploeger en Frans Kooyman bedanken voor hun dagelijkse begeleiding.

Er zijn ook nog een aantal mensen die mij hebben geholpen met de praktische uitvoering van dit onderzoek. Eerst wil ik Dr. A.J. de Winter bedanken, werkzaam bij het Naturalis in Leiden, voor het determineren van een deel van mijn slakken. Deze slakken heb ik gezocht met Renée Span en Hanneke Spieker in Den Haag, dus mijn dank gaat ook naar hen uit. Ook wil ik mijn moeder, Ellie Sabbé, bedanken voor het ophalen van de vossen uit Den Haag. Dankzij de afdeling Pathologie, die voor de sectie op de vossen ruimte en materialen beschikbaar hebben gesteld, hebben wij *Angiostrongylus vasorum* uit de vossen kunnen halen. Ook gaat mijn dank uit naar het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, met name naar mevrouw Dr. J.W.B. van der Giessen, voor het beschikbaar stellen van een groot deel van de vossen en een sectieruimte. Als laatste wil ik Drs. J.L. Mulder bedanken voor de tijd die hij extra kwijt was door ons en voor alle informatie over de vossen.

Referenties

- ANDERSON, R.C. (2000) Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission, 2nd edition, Wallingford, Oxon, pp. 154-155
- ASH, L.R. (1970) Diagnostic morphology of the third-stage larvae of *Angiostrongylus cantonensis*, *Angiostrongylus vasorum*, *Aelurostrongylus abstrusus* and *Anafilaroides rostratus* (nematode: metastrongyloidea), *The Journal of Parasitology* **56**, pp. 249-253
- BARÇANTE, T.A., BARÇANTE, J.M.P., DIAS, S.R.C. & LIMA, W.S. (2003) *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Kamensky, 1905: emergence of third-stage larvae from infected *Biomphalaria glabrata* snails. *Parasitology Research* **91**, pp. 471-475.
- BARUTZKI, D. & SCHAPER, R. (2009) Natural infections of *Angiostrongylus vasorum* and *Crenosoma vulpis* in dogs in Germany (2007-2009), *Parasitology Research* **105 suppl 1**: S39-S48
- BIHR, T. & CONBOY, G.A. (1999) Lungworm (*Crenosoma vulpis*) infection in dogs on Prince Edward Island, *Canadian Veterinary Journal* **40**, pp. 555-559
- BOLT, G., MONRAD, J., HENRIKSEN, P., DIETZ, H.H., KOCH, J., BINDSEIL, E. & JENSEN, L. (1992) The fox (*Vulpes vulpes*) as a reservoir for canine angiostrongylosis in Denmark, *Acta Veterinaria Scandinavica* **33**, pp. 357-362
- BOLT, G., MONRAD, J., FRANDBSEN, F., HENRIKSEN, P. & H.H. DIETZ (1993) The common frog (*Rana temporaria*) as a potential paratenic and intermediate host for *Angiostrongylus vasorum*, *Parasitology Research* **79**, pp. 428-430
- BOLT, G., MONRAD, J., KOCH, J. & JENSEN, A.L. (1994) Canine angiostrongylosis: a review, *Veterinary Record* **135**, pp. 447-452
- BORGSTEEDE, F.H.M. (1984) Helminth parasites of wild foxes (*Vulpes vulpes* L.) in The Netherlands, *Zeitschrift für Parasitenkunde* **70**, pp. 281-285
- BOURQUE, A., CONBOY, G., MILLER, L., WHITNEY, H. & RALHAN, S. (2002) *Angiostrongylus vasorum* infection in 2 dogs from Newfoundland, *Canadian Veterinary Journal* **43**, pp. 876-879
- CAMERON, R.A.D., EVERS HAM, B. & JACKSON, N. (1983) A field key to the slugs of the British isles, *Field Studies* **5**, pp. 807-824
- CHAPMAN, P.S., BOAG A.K., GUITIAN, J. & BOSWOOD, A. (2004) *Angiostrongylus vasorum* infection in 23 dogs (1999-2002), *Journal of Small Animal Practice* **45**, pp. 435-440
- COBB, M.A. & FISHER, M.A. (1992) *Crenosoma vulpis* infection in a dog, *Veterinary Record* **130**, p. 452
- CONBOY, G. (2004) Natural infections of *Crenosoma vulpis* and *Angiostrongylus vasorum* in dogs in Atlantic Canada and their treatment with milbemycin oxime, *Veterinary Record* **155**, pp. 16-18
- CONBOY, G.A. (2000) Canine angiostrongylosis (French heartworm), In: Companion and exotic animal parasitology, Bowman D.D. (ed), International Veterinary Information Service (www.ivis.org)
- CRAGG, J.B., FOSTER, R. & VINCENT, M. (1957) Larval tramatodes (Brachylaemidae) from the slugs *Milax sowerbii* (Ferussac), *Agriolimax reticulatus* (Muller) and *Arion lusitanicus* Mabilie, *Parasitology* **47**, pp. 396-404

- CURY, M.C., LIMA, W.S., GUIMARÃES, M.P. & CARVALHO, M.G. (2002) Hematological and coagulation profiles in dogs experimentally infected with *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866), *Veterinary Parasitology* **104**, pp. 139-149
- DAVIDSON R.K., GJERDE, B., VIKØREN, T. LILLEHAUG, A. & HANDELAND, K. (2006) Prevalence of Trichinella larvae and extra-intestinal nematodes in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*), *Veterinary Parasitology* **136**, pp. 307-316
- DENK, D., MATIASEK, K., JUST, F.T., HERMANN, W., BAIKER, K., HERBACH, N., STEINBERG, T. & FISCHER, A. (2009) Disseminated angiostrongylosis with fatal cerebral haemorrhages in two dogs in Germany: A clinical case study, *Veterinary Parasitology* **160**, pp. 100-108
- EIRA, C., VINGADA, J., TORRES, J. & MIQUEL, J. (2006) The helminth community of the red fox, *Vulpes vulpes*, in Dunas de Mira (Portugal) and its effect on host condition, *Wildlife. Biology in Practice* **2**, pp. 26-36
- FERDUSHY, T., KAPEL, C.M.O., WEBSTER, P., AL-SABI, M.N.S. & GRØNVOLD, J. (2009) The occurrence of *Angiostrongylus vasorum* in terrestrial slugs from forests and parks in the Copenhagen area, Denmark, *Journal of Helminthology* **00**, pp. 1-5
- GEORGI, J.R. (1987) Parasites of the respiratory tract, *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* **17**, pp. 1421-1442
- GITTENBERGER, E., BACKHUYS, W. & RIPKEN, Th.E.J. (1984) De landslakken van Nederland, uitgegeven door: Koninklijke Nederlandse Natuurhistorische Vereniging, 2^e druk, Amsterdam, pp. 60-65, 76-84, 122, 133
- GORTÁZAR, C., VILLAFUERTE, R., LUCIENTES, J. & FERNÁNDEZ-DE-LUCO, D. (1998) Habitat related differences in helminth parasites of red foxes in the Ebro valley, *Veterinary Parasitology* **80**, pp. 75-81
- GUILHON, J. & CENS, B. (1973) *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) Etude biologique et morphologique, *Annales de Parasitologie* **48**, pp. 567-596
- HARE, T. (1930) Chronic tracheo-bronchitis of the dog due to *Oslerus osleri* (Cobbold, 1879) *Proceedings of the Royal Society of Medicine* **23**, pp. 1715-1718
- HOFF, B. (1993) Lungworm (*Crenosoma vulpis*) infection in dogs, *Canadian Veterinary Journal* **34**, pp. 123-124
- JEFFRIES, R., MORGAN, E.R. & SHAW, S.E. (2009) A SYBR green real-time PCR assay for the detection of the nematode *Angiostrongylus vasorum* in definitive and intermediate hosts, *Veterinary Parasitology* **166**, pp. 112-118
- KOCH, J. & WILLESEN, J.L. (2009) Canine pulmonary angiostrongylosis: An update, *Veterinary Journal* **179**, pp. 348-359
- KRIEGLEDER, H. & BARUTZKI, D. (1988) Lungenwurmbefall (*Crenosoma vulpis*) beim Hund, *Kleintierpraxis* **33**, pp. 17-20
- LEVITAN, D.M., MATZ, M.E., FINDLEN, C.S. & FISTER, R.D. (1996) Treatment of *Oslerus osleri* infestation in a dog: case report and literature review, *Journal of the American Animal Hospital Association* **32**, pp. 435-438

- MAÑAS, S., FERRE, D., CASTELLÀ, J. & LÓPEZ-MARTÍN, J.M. (2005) Cardiopulmonary helminth parasites of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Catalonia, northeastern Spain, *Veterinary Journal* **169**, pp. 118-120
- McGARRY, J.W. & MORGAN, E.R. (2009) Identification of first-stage larvae of metastrongyles from dogs, *Veterinary Record* **165**, pp. 258-261
- MONTIZAAN, M.G.E. en SIEBENGA, S. (2007) Fauna in cijfers, Koninklijke Nederlandse Jagers Vereniging, WBE-databank, nieuwsbrief 7, pp. 17-18
- MORGAN, E.R., SHAW, S.E., BRENNAN, S.F., DE WAAL, T.D., JONES, B.R. & MULCAHY, G. (2005) *Angiostrongylus vasorum*: a real heartbreaker, *Trends in Parasitology* **21**, pp. 49-51
- MORGAN, E.R., TOMLINSON, A., HUNTER, S., NICHOLS, T., ROBERTS, E., FOX, M.T. & TAYLOR, M.A. (2008) *Angiostrongylus vasorum* and *Eucoleus aerophilus* in foxes (*Vulpes vulpes*) in Great Britain, *Veterinary Parasitology* **154**, pp. 48-57
- OLIVEIRA-JÚNIOR, S.D., BARÇANTE, J.M.P., BARÇANTE, T.A., RIBEIRO, V.M. & LIMA, W.S. (2004) Ectopic location of adult worms and first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum* in an infected dog, *Veterinary Parasitology* **121**, pp. 293-296
- PATTESON, M.W., GIBBS, C., WOTTON, P.R. & DAY, M.J. (1993) *Angiostrongylus vasorum* infection in seven dogs, *Veterinary Record* **133**, 565-570
- POLI, A., ARISPICI, M., MARCONCINI, A., MANCIANTI, F. & DE MONTE, D. (1984) *Angiostrongylus vasorum* (Baillet, 1866) in red foxes (*Vulpes vulpes* L.) in Italy, *Journal of Wildlife Diseases* **20**, pp. 345-346
- RAJKOVIĆ-JANJE, R., MARINCULIĆ, A., BOSNIĆ, S. BENIĆ, M., VINKOVIĆ, B. & MIHALJEVIĆ, Ž. (2002) Prevalence and seasonal distribution of helminth parasites in red foxes (*Vulpes vulpes*) from the Zagreb County (Croatia), *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* **48**, pp. 151-160
- SAEED, I., MADDOX-HYTTEL, C., MONRAD, J. & KAPEL, C.M.O. (2006) Helminths of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Denmark, *Veterinary Parasitology* **139**, pp. 168-179
- SCHNIEDER, T. (2006) Veterinär medizinische Parasitologie, 6e editie, uitgeverij Parey, Duitsland, pp. 488-492, 516
- SCHNYDER, M, FAHRION, A., WEBSTER, P., RIOND, B., KRANJC, A., HEINE, J., GLAUS, T. & DEPLAZES, P. (2009) Clinical and laboratory findings in dogs experimentally inoculated with *Angiostrongylus vasorum* and serological follow-up for circulating antigen in ELISA, BAYER angiostrongylosis forum, Porto, Portugal
- SEGOVIA, J.M., TORRES, J. & MIQUEL, J. (2004) Helminth parasites of the red fox (*Vulpes vulpes* L., 1758) in the Iberian Peninsula: an ecological study, *Acta Parasitologica* **49**, pp. 67-79
- SHIMALOV, V.V. & SHIMALOV, V.T. (2003) Helminth fauna of the red fox (*Vulpes vulpes* Linnaeus, 1758) in southern Belarus, *Parasitology Research* **89**, pp. 77-78
- SIMPSON, V.R. (1996) *Angiostrongylus vasorum* infection in foxes (*Vulpes vulpes*) in Cornwall, *Veterinary Record* **139**, pp.443-445
- SRÉTER, T., SZÉLL, Z., MARUCCI, G. POZIO, E. & VARGA, I. (2003) Extraintestinal nematode infections of red foxes (*Vulpes vulpes*) in Hungary, *Veterinary Parasitology* **115**, pp. 329-334

- STOCKDALE, P.H.G. & HULLAND, T.J. (1970) The pathogenesis, route of migration, and development of *Crenosoma vulpis* in the dog, *Pathologia Veterinaria* **7**, pp. 28-42
- TAYLOR, M.A., COOP, R.L. & WALL, R.L. (2007) *Veterinary Parasitology* 3rd edition, *Blackwell Publishing Ltd*, Oxford, pp. 395–399, 410-411
- TRAVERSA, D. & GUGLIELMINI, C. (2008) Feline aelurostrongylosis and canine angiostrongylosis: A challenging diagnosis for two emerging verminous pneumonia infections, *Veterinary Parasitology* **157**, pp. 163-174
- TRAVERSA, D., DI CESARE, A., MILILLO, P., IORIO, R. & OTRANTO, D. (2009a) Infection by *Eucoleus aerophilus* in dogs and cats: Is another extra-intestinal parasitic nematode of pets emerging in Italy?, *Research in Veterinary Science* **87**, pp. 270-272
- TRAVERSA, D. (2009b) Companion animal lungworms – diagnostic challenges, BAYER angiostrongylosis forum, Porto, Portugal
- VAN DOORN, D.C.K., VAN DE SANDE, A.H., NIJSSE, E.R., EYSKER, M. & PLOEGER, H.W. (2009) Autochthonous *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs in The Netherlands, *Veterinary Parasitology* **162**, pp.163-166
- VERZBERGER-EPSTEIN, I., MARKHAM, R.J.F., SHEPPARD, J.A., STRYHN, H., WHITNEY, H. & CONBOY, G.A. (2008) Serologic detection of *Angiostrongylus vasorum* infection in dogs, *Veterinary Parasitology* **151**, pp. 53-60
- WESSMANN, A., LU, D., LAMB, C.R., SMYTH, B., MANTIS, P., CHANDLER, K., BOAG, A., CHERUBINI, G. & CAPPELLO, R. (2006) Brain and spinal cord haemorrhages associated with *Angiostrongylus vasorum* infection in four dogs, *Veterinary Record* **158**, pp. 858-863
- WHITLEY, N.T., CORZO-MENENDEZ, N., CARMICHAEL, N.G. & MCGARRY, J.W. (2005) Cerebral and conjunctival haemorrhages associated with von Willebrand factor deficiency and canine angiostrongylosis, *Journal of Small Animal Practice* **46**, pp. 75-78
- YOUSIF, F. & LÄMMLER, G. (1975) The effect of some biological and physical factors on infection of *Biomphalaria glabrata* with *Angiostrongylus vasorum*, *Zeitschrift für Parasitenkunde* **47**, pp. 191-201

Bijlagen

Bijlage 1 Protocol slakken onderzoek methode 1a, b en c

Methode 1

Benodigdheden:

- | | |
|-------------------------------|---|
| - Baermann glas | - glazen pipet |
| - grove zeef | - fiepje |
| - schaar | - embryoblokje |
| - kraan water | - stereomicroscop |
| - natriumthiosulfaat (40 g/L) | - jodium oplossing (5% I ₂ , 10% KI, 10 x verdund) |
| - Falconbuis (50 ml) | - 70 % alcohol |

Werkwijzen:

Methode 1a

1. Baermann glas met daarin een grove zeef gehangen klaar zetten. Dode slak op de grove zeef leggen en met schaar in stukjes knippen. Daarna glas vullen met kraanwater zo dat de stukken slak onder water staan.
2. Na ongeveer 24 uur met een glazenpipet het bezinksel uit de punt van het Baermann glas opzuigen en in een embryoblokje doen. Het embryoblokje onder een stereomicroscop bij 40x bekijken.
3. Eventueel kunnen de larven gekleurd worden met jodium-oplossing en ontkleurd met natriumthiosulfaat.

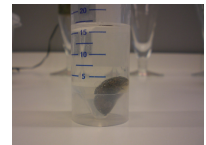


Methode 1b

1. Baermann glas met daarin een grove zeef gehangen klaar zetten. Slak op zeef zetten en met schaar in stukjes knippen. Daarna glas vullen met kraanwater zo dat stukken slak onder water staan.
2. Na ongeveer 24 uur met een glazenpipet het bezinksel uit de punt van het Baermann glas opzuigen en in een embryoblokje doen. Het embryoblokje onder een stereomicroscop bij 40x bekijken.
3. Eventueel kunnen de larven gekleurd worden met jodium-oplossing en ontkleurd met natriumthiosulfaat.

Methode 1c

1. In de Falconbuis 5 ml van 70% alcohol spuiten en dit aanvullen met 10 ml kraanwater (in totaal 15 ml). Een slak in de Falconbuis met alcohol doen totdat deze dood is (strekt zich uit).
2. Baermann glas met daarin een grove zeef gehangen klaar zetten. Slak met de alcohol uit de Falconbuis over de zeef gooien en de slak met schaar in stukjes knippen. Daarna glas verder vullen met kraanwater zo dat stukken slak onder water staan.
3. Na ongeveer 24 uur met een glazenpipet het bezinksel uit de punt van het Baermann glas opzuigen en in een embryoblokje doen. Het embryoblokje onder een stereomicroscop bij 40x bekijken
4. Eventueel kunnen de larven gekleurd worden met jodium-oplossing en ontkleurd met natriumthiosulfaat.



Bijlage 2 Protocol slakken onderzoek methode 2a en b

Methode 2

Benodigheden:

- verteringsvloeistof (zie bijlage 4)
- schaar
- potje met deksel
- Baermann glas
- kraan water
- glazen pipet
- natriumthiosulfaat (40 g/L)
- stereomicroscop
- stoof 37 °C
- bakje
- schudmachine (50 RPM)
- grove zeef
- embryoblokje
- fiepje
- jodium oplossing (5% I₂, 10% KI, 10 x verdund)

Werkwijzen:

Methode 2a

1. Slak in een bakje doen en in stukjes knippen. Het bakje vullen met verteringsvloeistof.
2. Het bakje in de stoof bij 37 °C zetten.
3. Na 24 uur het bakje uit de stoof halen en de inhoud over een grove zeef in een Baermann glas gooien. Na 2 uur de zeef verwijderen en de bovenste laag vloeistof afgieten. Het sediment aanvullen met kraanwater om de verteringsvloeistof te verdunnen. Spoelen met kraanwater nog enkele malen herhalen.
4. Sediment met een glazen pipet opzuigen en in een embryoblokje doen. Sediment onder een stereomicroscop bij 40 x bekijken.
5. Eventueel kunnen de larven gekleurd worden met jodium-oplossing en ontkleurd met natriumthiosulfaat.

Methode 2b

1. Schudmachine in de stoof (37 °C) zetten en instellen op 50 RPM.
2. Slak in stukjes knippen en in een potje doen. Het potje vullen met verteringsvloeistof en de deksel er goed op draaien. Potje op de schudmachine in de stoof leggen.
3. Na 30 minuten potje uit de stoof halen en de inhoud over een grove zeef in een Baermann glas gooien. Na ongeveer een half uur de zeef verwijderen en de bovenste laag vloeistof afgieten. Het sediment aanvullen met kraanwater om de verteringsvloeistof te verdunnen. Spoelen met kraanwater nog enkele malen herhalen.
4. Sediment met een glazen pipet opzuigen en in een embryoblokje doen. Sediment onder een stereomicroscop bij 40 x bekijken.
5. Eventueel kunnen de larven gekleurd worden met jodium-oplossing en ontkleurd met natriumthiosulfaat.

Bijlage 3 Protocol slakken onderzoek methode 3a en b

Methode 3

Benodigheden:

- verteringsvloeistof (zie bijlage 4)
- Falconbuizen zonder sta rand
- schaar
- centrifuge (3000 rpm, zonder stop)
- embryoblokjes
- fiepje
- natriumthiosulfaat (40 g/L)
- pincet
- 70% alcohol
- katoenen gaasjes
- stoof 37 °C
- vortex
- glazen pipetten
- stereomicroscop
- jodium oplossing (5% I₂, 10% KI, 10 x verdund)

Werkwijzen:

Methode 3a

1. In een Falconbuis 5 ml van 70% alcohol spuiten en dit aanvullen met 10 ml kraanwater (in totaal 15 ml). Een slak in de Falconbuis met alcohol doen totdat deze dood is (strekt zich uit).
2. Slak met een pincet uit de buis halen en op een katoenen gaasje in stukjes knippen met een schaar. Het gaasje in een Falconbuis zonder sta rand hangen zo dat de puntjes van het gaasje net over de rand komen. De buis vullen met verteringsvloeistof zodat de hele slak in de vloeistof hangt. Het deksel op de Falconbuis plaatsen zo dat het gaasje klem komt te zitten en blijft hangen. De Falconbuis 2-3 uur in de stoof zetten.
3. De Falconbuis uit de stoof halen en het gaasje met slakkenstukken verwijderen. Deksel goed op de buis draaien en 2 minuten centrifugeren met een snelheid van 3000 rpm zonder stop (duurt zeker 20 minuten voordat de centrifuge tot stilstand komt).
4. De buis afgieten en het sediment resuspenderen met een vortex en daarna in een embryoblokje gieten. De buis nog een keer omspoelen met ± 2 ml water, nog maals vortexen en weer in een embryoblokje gieten. De embryoblokjes onder een stereomicroscop bij 40x bekijken.
5. Eventueel kunnen de larven gekleurd worden met jodium-oplossing en ontkleurd met natriumthiosulfaat.

Methode 3b

1. Slak op een katoenengaasje in stukjes knippen met een schaar. Het gaasje in een Falconbuis zonder sta rand hangen zo dat de puntjes van het gaasje net over de rand komen. De buis vullen met verteringsvloeistof zodat de hele slak in de vloeistof hangt. Het deksel op de Falconbuis plaatsen zo dat het gaasje klem komt te zitten en blijft hangen. De Falconbuis 2-3 uur in de stoof zetten.
2. De Falconbuis uit de stoof halen en het gaasje met slakkenstukken verwijderen. Deksel goed op de buis draaien en 2 minuten centrifugeren met een snelheid van 3000 rpm zonder stop (duurt zeker 20 minuten voordat de centrifuge tot stilstand komt).
3. De buis afgieten en het sediment resuspenderen met een vortex en daarna in een embryoblokje gieten. De buis nog een keer omspoelen met ± 2 ml water, nog

- maals vortexen en weer in een embryoblokje gieten. De embryoblokjes onder een stereomicroscoop bij 40x bekijken.
4. Eventueel kunnen de larven gekleurd worden met jodium-oplossing en ontkleurd met natriumthiosulfaat.

Bijlage 4 Protocol verteringsvloeistof (Yousif, 1975)

Benodigheden

- glazen fles (1 L) met dop
- 15 ml 25% HCl- oplossing
- stoof 37 °C
- plastic bakje
- zuurkast
- 1,5 gram pepsine (0,50 – 0,70 FIP-eenheden/mg)
- hand warm kraanwater
- weegschaal
- glazen trechter
- glazen maatbeker

Werkwijze:

1. De glazen fles vullen met 1 liter hand warm kraanwater.
2. Op een weegschaal 1,5 gram pepsine afwegen in een plastic bakje en vast een beetje water uit de glazen fles bij de pepsine doen zodat het poeder niet zo stuift.
3. 15 ml van 25% HCl in een zuurkast in een glazen maatbeker schenken. Daarna in de zuurkast de 15 ml HCl-oplossing langzaam in de fles met water gieten.
4. Bakje met pepsine en water ook in de fles gieten en daarna goed zwenken.
5. De fles afsluiten en in de stoof bij 37 °C zetten.

Bijlage 5 Protocol vossen longen spoelen

Benodigdheden:

- keukenzout 90 gram
- emmer met 10 liter lauw kraanwater
- waterpomp
- pipet van 1 ml (geel), watje verwijderen
- pipet van 10 ml (oranje), watje verwijderen
- scalpel
- schaar
- zeef van 150 μm
- zeef van 20 μm
- 2 plastic opvangbakken waar de zeven in passen
- trechter
- plastic zakjes
- afsluitbare plastic potten

Werkwijze:

1. 90 gram keukenzout in de emmer met 10 liter lauw kraanwater doen en goed roeren. De gele slang van de waterpomp op de bodem van de emmer leggen. Aan de blauwe slang de oranje pipet bevestigen met een metalen clip en in de oranje pipet de gele pipet drukken.
2. De zeef van 150 μm op de zeef van 20 μm plaatsen en deze in een opvangbak plaatsen.
3. Bij sectie van de vos hart en longen verwijderen waarbij de trachea zo hoog mogelijk wordt afgesneden. Het hele pakketje op de bovenste zeef leggen. Als eerste het pericardium van het hart verwijderen en daarna met het scalpel een snede maken in het rechter ventrikel. Het hele rechter ventrikel openknippen en de kleinste pipet in de arterie pulmonalis schuiven en van buiten goed vasthouden. Pomp aanzetten en doorspoelen totdat de longen helemaal wit zijn geworden, zonodig de pipet tussendoor in een andere vertakking van de a. pulmonalis schuiven zodat alle longkwabben worden gespoeld. De pomp uitzetten en al het vocht uit de longkwabben masseren. Daarna hart en longen in een plastic zakje stoppen.
4. Voor het spoelen van de zeven de kleine gele pipet uit de oranje pipet halen. Eerst de 150 μm zeef spoelen en dat wat op de zeef blijft liggen in een plastic potje doen met behulp van de trechter. Dit herhalen voor de 20 μm zeef. Als laatste alle longinhoud in de plastic opvangbak nog door de 20 μm zeef gooien. Deze zeef nogmaals spoelen en alles erbij in de pot doen.
5. Alles goed afspoelen voor er aan de volgende longen wordt begonnen.

Bijlage 6 Gegevens vossen RIVM (persoonlijke communicatie Jan Mulder)

RIVM- nummer	plaats	gebied	kaartcoördinaten		datum bemachtigd			methode	datum sectie --			oorz.*1	gsl*2	A/J*3	leeftijd (mnd)		schatting lftd*5	conditie G/Z*6
			x	y	dg	mnd	jr		dg	mnd	jr				tand	onzekh*4		
1018	bos tZWv heide	Sallandse Heuvelrug	223,07	482,84	24	1	2009	aardhond	7	10	2009	A	V	A			22	G
1020	Holterheide	Sallandse Heuvelrug	225,07	481,98	2	6	2009	aanzit bij burcht	7	10	2009	A	V	J	2	0		G
1022	Elim	Drenthe					2009		7	10	2009	A	M	A				G
1023	Oude Deventerweg	Sallandse Heuvelrug	224,20	486,60	5	6	2009	aanzit	7	10	2009	A	V	J	2	0		G
1025	Grote Koningsbelt	Sallandse Heuvelrug	225,10	483,58	26	1	2009	aanzit	7	10	2009	A	V	A			10	G
1026		Sallandse Heuvelrug							7	10	2009	A	V	J				G
1027	Heide Sprengenberg	Sallandse Heuvelrug	223,91	483,78	28	5	2009	vangkooitjes	7	10	2009	A	M	J	1,5	0		G
1028	Heide Sprengenberg	Sallandse Heuvelrug	223,91	483,78	28	5	2009	vangkooitjes	7	10	2009	A	M	J	1,5	0		G
1029	Heide Sprengenberg vliegveldhei	Sallandse Heuvelrug	223,91	483,78	28	5	2009	vangkooitjes aanzit bij	7	10	2009	A	V	J	1,5	0		G
1030	Sprengenberg	Sallandse Heuvelrug	223,37	483,84	16	6	2009	voerplek	7	10	2009	A	V	A			15	G
1031	Wolfslenk	Sallandse Heuvelrug	226,24	484,05	31	1	2009	aardhond	7	10	2009	A	V	A			10	G
1032	Poggenbeltweg Noordkant Schelpenpad voor	Sallandse Heuvelrug	220,80	484,22	18	4	2009		29	10	2009	A	M	A				G
1033	Lange Paal	Vlieland			5	10	2009		29	10	2009	A	M	J	6	0	6	G
1034	Berghuisweg	Sallandse Heuvelrug	216,25	481,35	20	3	2009		29	10	2009	A	V	A			12	G
1035	Sprokkelweg	Sallandse Heuvelrug	227,50	480,80	19	5	2009	vangkooitjes	29	10	2009	A	M	J	2	0		G
1036	Sprokkelweg	Sallandse Heuvelrug	227,50	480,80	19	5	2009	vangkooitjes	29	10	2009	A	M	J	2	0		G
1039	Vagevuurschweg Kalkhuisweg/zandhui	Sallandse Heuvelrug	221,40	482,80	7	4	2009		29	10	2009	A	M	A			12	G
1040	sweg	Sallandse Heuvelrug			17	6	2009	kunstlicht	29	10	2009	A	V	A			15	G
1041	w van Rietslenkpad	Sallandse Heuvelrug	226,34	485,30	23	5	2009	vangkooitjes	29	10	2009	A	M	J	2	0		G

*1 oorz = doodsoorzaak: A = afschot V = verkeer P = predatie = doodgebeten door hond Z = ziek of verhonger

*2 gsl = geslacht

*3 A/J = adult/juveniel (tot oktober van geboortejaar)

*4 onzekh = onzekerheid bij de leeftijdsbepaling: 0 = zeker, gevangen als klein jong; 1 = zeker, leeftijdsbepaling nauwkeurig; 2 = ietwat onzeker, leeftijdsbepaling met 1 jr onnauwkeurigheid

*5 schatting leeftijd: op basis van gebitslijtage of van uiterlijk van de schoongemaakte schedel (nog niet microscopisch)

*6 conditie: G = gezond, Z = ziek

Bijlage 7 Alle bevindingen bij parasitologisch onderzoek van vossen

Vos nr	Longen knippen en spoelen	Feces onderzoek flotatie	Blaas	Schedel spoelen	Darm
1018	negatief	x	x	x	<i>Mesocestoides spp.</i>
1020	negatief	x	x	x	x
1022	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x	x	x	x
1023	negatief	x	x	x	x
1025	negatief	x	x	x	x
1026	negatief	x	x	x	x
1027	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x	x	x	x
1028	negatief	x	x	x	x
1029	negatief	x	x	x	x
1030	negatief	x	x	x	x
1031	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x	x	x	x
1032	negatief	x	x	x	x
1033	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x	negatief	x	x
1034	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x	<i>Capillaria plica</i>	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x
1035	negatief	<i>Toxocara</i> eieren	x	x	x
1036	x	<i>Toxocara</i> eieren, <i>Capillaria</i> eieren	negatief	x	x
1039	<i>Eucoleus aerophilus</i> , <i>Crenosoma vulpis</i>	x	negatief	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x
1040	x	x	<i>Capillaria plica</i>	x	x
1041	negatief	<i>Toxocara</i> eieren, <i>Capillaria</i> eieren	x	x	x
Den Haag 1	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	<i>A. vasorum</i> larven (L1)	negatief	x	<i>Uncinaria stenocephala</i> (adulten), <i>Alaria alata</i>
Den Haag 2	<i>Angiostrongylus vasorum</i> , <i>Eucoleus aerophilus</i> , <i>Crenosoma vulpis</i>	negatief	<i>Capillaria plica</i>	<i>Eucoleus aerophilus</i>	<i>Toxocara canis</i> (adulten), <i>Alaria alata</i> , <i>Uncinaria stenocephala</i> (adulten)
Den Haag 3	<i>Angiostrongylus vasorum</i> (bursa)	<i>Capillaria</i> eieren, enkel <i>Strongylus</i> type ei	x	x	<i>Uncinaria stenocephala</i> (adulten)
Wieringermeer	negatief	<i>Capillaria</i> eieren, <i>Strongylus</i> type eieren	<i>Capillaria plica</i>	<i>Eucoleus aerophilus</i>	<i>Uncinaria stenocephala</i> (adulten), <i>Alaria alata</i>
Hoge Veluwe 1	<i>Angiostrongylus vasorum</i> , <i>Eucoleus aerophilus</i>	<i>A. vasorum</i> larven (L1), <i>Capillaria</i> eieren (2 soorten), <i>Toxascaris</i> eieren, <i>Strongylus</i> type eieren	<i>Capillaria plica</i> en <i>Capillaria</i> eieren in urine	x	<i>Toxascaris</i> (adulten), <i>Mesocestoides spp.</i> , <i>Strongyloides spp.</i> (adulten)
Hoge Veluwe 2	<i>Angiostrongylus vasorum</i> , <i>Eucoleus aerophilus</i>	<i>A. vasorum</i> larven (L1), <i>Capillaria</i> eieren, <i>Toxascaris</i> eieren, rijpe proglottis van <i>Mesocestoides spp.</i>	<i>Capillaria plica</i>	<i>Eucoleus aerophilus</i>	x

x = niet uitgevoerd negatief = uitgevoerd, niks gevonden