

Bepaling van occult bloed in de mest van paarden

Determination of fecal occult blood in horses

N. Van Der Vekens, P. Deprez

Vakgroep Inwendige Ziekten van de Grote Huisdieren
Faculteit Diergeneeskunde, UGent
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Nicky.VanDerVekens@ugent.be

SAMENVATTING

In de humane geneeskunde wordt er frequent gebruik gemaakt van zowel chemische als immunochemische testkits voor het opsporen van fecaal occult bloed. Bij het paard is daarover weinig bekend. Daarom werd in de voorliggende studie de bruikbaarheid van de chemische Hemocult SENSEA-test bij het paard geëvalueerd. Uit de studie bleek dat deze testkit een goede sensitiviteit en specificiteit heeft voor het opsporen van distale intestinale bloedingen bij paarden op stalrantsoen. Bij paarden met weidebeloop gaf de test te veel valspositieve resultaten. Dit was waarschijnlijk te wijten aan de aanwezigheid van plantenperoxidases in het dieet. Deze valspositieve resultaten konden, in tegenstelling tot bij het humane testprotocol, niet geëlimineerd worden door de testkaart op een later tijdstip te ontwikkelen. De specificiteit van de test kon daarentegen verhoogd worden door de analyse uit te voeren nadat de dieren minstens vier dagen werden opgesteld. De detectielimiet van de Hemocult SENSEA-test ligt lager bij het paard dan bij de mens. In de voorliggende studie kon tot 1% bloedverlies in de mest opgespoord worden. Dit komt overeen met 120 ml bloedverlies per dag.

ABSTRACT

Chemical and immuno-chemical test kits are frequently used in human medicine for the detection of fecal occult blood loss. Since only limited data on the use of these test kits in equine medicine are available, the chemical Hemocult SENSEA test was evaluated for the detection of fecal occult blood loss in the horse. The results show that the Hemocult SENSEA test kit has a good sensitivity and specificity for the detection of distal intestinal blood loss in stabled horses. In horses at pasture, many false positive reactions were observed, probably due to the presence of plant peroxidases in the diet. This high rate of false positive reactions could, in contrast to the human analyses, not be eliminated by a delayed development of the test. Stabling the horses for at least four days before testing drastically improved the specificity. In comparison to humans, the detection limit of the Hemocult SENSEA test appears to be lower in horses. In the present study, up to 1% of the blood loss could be detected in the feces. This corresponds to 120 ml blood loss a day.

INLEIDING

Bij paarden zijn er verscheidene aandoeningen die gastro-intestinaal bloedverlies kunnen veroorzaken. Meestal is dit bloedverlies niet macroscopisch zichtbaar en wordt dan ook omschreven als fecaal occult bloedverlies (Rockey, 2005).

De belangrijkste aandoeningen die fecaal occult bloedverlies kunnen veroorzaken bij paarden zijn het *equine gastric ulcer syndrome* (EGUS), colitis en traumatische darmwandletsels. Het EGUS is een veelvoorkomende aandoening bij intensief getrainde, intermitterend gevoederde paarden op stal en wordt gekenmerkt door ulceraties in de maag, het duodenum en soms in de oesophagus (Picavet, 2002; Videla en Andrews, 2009). Ook bij colitis, en vooral bij de fenylbutazonegeïnduceerde rechter dorsale colitis zijn ulceratieve mucosaletsels aanwezig waarbij discreet tot uitgesproken bloedverlies kan optreden (Campbell *et al.*, 2002; Cohen, 2002). Traumatische darmwandlet-

sels, zoals strangulatie van darmsegmenten bij koliek en intestinale chirurgie, kunnen uiteraard ook intestinaal bloedverlies veroorzaken.

De klinische diagnose van bovenstaande aandoeningen is niet altijd eenvoudig en het aantonen van intestinaal bloedverlies aan de hand van bijvoorbeeld de beschikbare "fecaal occult bloedtesten" (FOBT) in de humane geneeskunde zou daarbij kunnen helpen. Bij mensen worden deze FOBT met succes gebruikt om colorectale kanker in een vroeg stadium op te sporen (Otto en Eckhardt, 2000). Over het gebruik van deze testen bij paarden is in de literatuur slechts beperkte informatie te vinden. Pellegrini gebruikte de test in 2005 reeds om ulceraties ter hoogte van het maagdarmstelsel op te sporen bij sportpaarden. Volgens deze studie worden ulceraties door middel van FOBT frequent te weinig gerapporteerd. De bedoeling van dit onderzoek was dan ook verder na te gaan in hoeverre deze FOBT bruikbaar zijn bij paarden om occult bloedverlies op te sporen.

PRINCIPES VAN DE FOBT

In het hiervolgende wordt aangegeven welke testen in de humane geneeskunde beschikbaar zijn en welke het meest geschikt lijken voor gebruik bij het paard. De meest gebruikte fecaal occult bloedtesten zijn gebaseerd op chemische of immunochemische technieken.

De chemische testen

Hiertoe behoren de guajak fecaal occult bloedtesten (gFOBT) die gebaseerd zijn op de oxidatie van guajak tot een blauwgekleurd quinone door de pseudoperoxidase activiteit van heem (Gordon *et al.*, 2004). Een voorbeeld hiervan is de Hemocult SENSEA-test (Beckman Coulter, Palo Alto, Californië).

Om tot een positieve test te komen, is een intacte hemoglobinemolecule nodig. Bij hogere gastro-intestinale bloedingen, zoals maagulcera bij het paard, worden de hemoglobinemoleculen verteerd bij de passage door het maag-darmstelsel (Rockey, 2005). De gFOBT kunnen dus beter lagere intestinale bloedingen detecteren. Toch bewezen Rocky *et al.* in 1999 dat hoog-sensitieve testen ook hogere bloedingen bij de mens kunnen aantonen.

Daarnaast zijn er ook een aantal factoren die vals-positieve resultaten kunnen veroorzaken. Peroxidasen afkomstig van planten zijn (net als hemoglobine zelf) hemoproteïnen. De aanwezigheid van deze enzymen in het dieet kunnen dus vals-positieve resultaten geven (Sinatra *et al.*, 1999). Om het effect van de voeding uit te schakelen, wordt de humane Hemocult SENSEA-test pas 48 uur na stalname ontwikkeld (gebruiksaanwijzing Hemocult SENSEA-test; Rozen *et al.*, 1999; Sinatra *et al.*, 1999). Gedurende die tijdsperiode gebeurt een afbraak van de plantenperoxidasen, terwijl de heemmoleculen relatief stabiel blijven. Over de invloed van het dieet op de testresultaten bij paarden is er in de literatuur weinig te vinden. Pellegrini vermeldde in 2005 dat, in tegenstelling tot bij mensen, het dieet bij paarden de resultaten van de gFOBT weinig beïnvloedt. Nochtans komen deze plantenperoxidasen volgens Passardi *et al.* (2005) in alle landplanten voor.

Een groot voordeel van deze testen is hun lage kostprijs, namelijk minder dan één euro per analyse. Hiermee zijn ze heel wat goedkoper dan de immunochemische testen.

De immunochemische testen

Deze immunochemische fecaal occult bloedtesten (iFOBT) maken gebruik van monoklonale antistoffen om het globinegedeelte van de hemoglobinemolecule te detecteren, waardoor een hogere sensitiviteit en specificiteit bekomen worden (Levin *et al.*, 2003). Bij passage doorheen het gastro-intestinaal stelsel wordt de globinemolecule echter afgebroken door enzymen, waardoor de iFOBT minder geschikt zijn om hoge gastro-intestinale bloedingen te detecteren (Saito, 1996; Rocky *et al.*, 1999). De gebruikte antistoffen zijn speciesspecifiek en reageren dus alleen met het humane hemoglobine.

Recentelijk werd echter een iFOBT op de markt gebracht die gebruik maakt van antistoffen gericht tegen albumine en hemoglobine van paarden (Videla en Andrews, 2009). Deze SUCCEED *equine fecal blood test* (Freedom Health LLC., Aurora, Ohio) reageert, zoals de humane immunochemische testen, niet op plantenperoxidasen en zou daardoor een hogere specificiteit en sensitiviteit hebben dan de chemische FOBT. Daarnaast zou de bijkomende analyse op albumine toelaten een onderscheid te maken tussen hogere en lagere gastro-intestinale bloedingen. Een nadeel van deze test is echter de kostprijs. Eén test kost ongeveer 29 euro. Bovendien is verder onderzoek omtrent het gebruik van deze test noodzakelijk, vermits het aantal gepubliceerde gegevens beperkt is (Carter en Pellegrini, 2007).

Conclusie

De lagere kostprijs van de gFOBT, de eventuele mogelijkheid om hogere bloedingen te detecteren en de momenteel nog beperkte literatuur over de recentere SUCCEED-test maken dat er in het onderhavig onderzoek gekozen werd om gebruik te maken van de Hemocult SENSEA-test.

DOELSTELLING

Het doel van dit onderzoek was na te gaan in hoeverre de humane Hemocult SENSEA-test kan gebruikt worden om gastro-intestinaal bloedverlies bij paarden op te sporen en meer bepaald om de sensitiviteit en de specificiteit van deze test bij paarden te bepalen.

MATERIAAL EN METHODEN

Testprocedure en -interpretatie

De ontwikkeling van de Hemocult SENSEA-test gebeurt volgens de aanwijzingen van de bijsluiter. Zoals in Figuur 1a wordt aangetoond, wordt de mest uitgesmeerd op de voorzijde van de met guajak geïmpregneerde testkaarten. Vervolgens worden de testkaarten omgedraaid en wordt een druppel Hemocult SENSEA-oplossing toegevoegd aan elk testvakje (Figuur 1b). Aan elk vakje worden druppels toegevoegd tot de vloeistofcirkel het vakje waarop de feces zich bevindt, overschrijdt. Op elke testkaart is eveneens een positieve en negatieve controle aanwezig om de kwaliteit van elke individuele testkaart te garanderen (Figuur 1c).

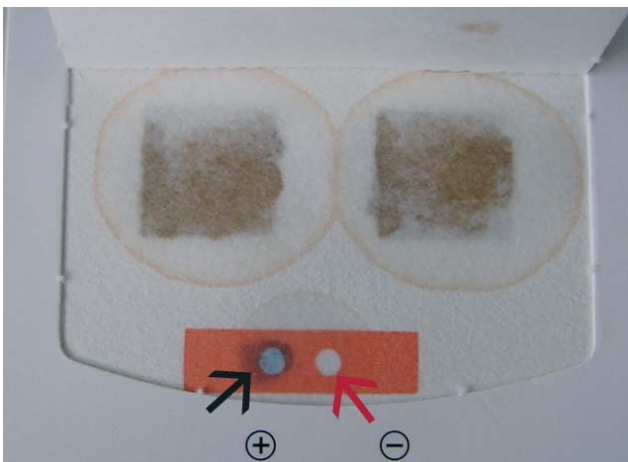
Bij aanwezigheid van (occult) bloed in de feces treedt er een blauwverkleuring op na de toevoeging van de Hemocult SENSEA-oplossing (Figuur 1d). Elke blauwverkleuring, onafhankelijk van zijn intensiteit, wordt beschouwd als een positief resultaat (gebruiksaanwijzing Hemocult SENSEA, Gordon *et al.*, 2004). Ook blauwgroene verkleuringen worden als positief aanzien. Over de interpretatie van groene resultaten is echter onduidelijkheid. Deze zouden ontstaan door de aanwezigheid van grote hoeveelheden gal in de feces. Indien deze groenverkleuringen niet uitwassen naar de periferie (Figuur 1e), hebben ze volgens Gordon *et*



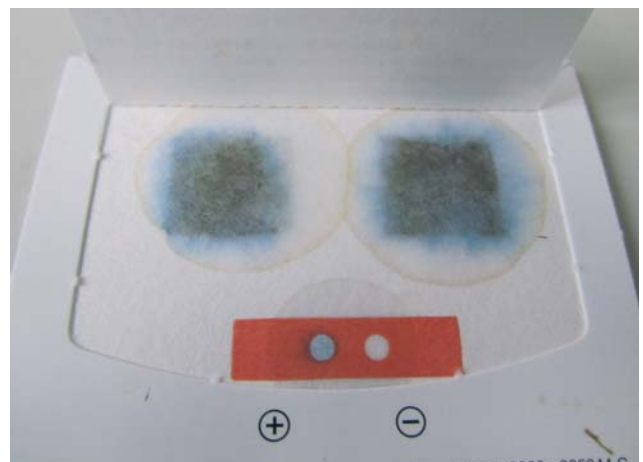
Figuur 1a. De mest wordt uitgesmeerd over de zes testvakjes met een kartonnen applicator.



Figuur 1b. Een druppel Hemocult SENA-oplossing wordt aangebracht in het midden van elk testvakje.



Figuur 1c. Voorbeeld van een negatief resultaat. Er is geen verkleuring opgetreden ter hoogte van de testvakjes. De positieve controle (zwarte pijl) heeft wel een correcte blauwverkleuring. De negatieve controle (rode pijl) vertoont geen kleurverandering.



Figuur 1d. Voorbeeld van een positief resultaat. Ter hoogte van de testvakjes is een duidelijke blauwverkleuring aanwezig.



Figuur 1e. Groenverkleuring die niet uitwast naar de periferie.



Figuur 1f. Groenverkleuring die uitwast naar de periferie (groene ring) en als negatief moet beschouwd worden.

al. (2004) toch een hoge predictieve waarde voor een pathologie aan het maagdarmkanaal. Daarom worden in deze studie dergelijke resultaten ook als positief aanzien. Groenverkleuringen die wel uitwassen naar de periferie (Figuur 1f) worden als negatief geïnterpreteerd (gebruiksaanwijzing Hemocult II SENA^{elite}).

Dieren

Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van twee groepen dieren. De eerste groep bestond uit een negatieve controlegroep van 43 gezonde paarden. Van deze dieren stonden 21 paarden continu in de weide, de overige bleven continu op stal en kregen een typisch

Tabel 1. Resultaten van de gezonde dieren en de paarden na operatie.

| | Paarden na operatie | Gezonde paarden | Totaal |
|--------------------|---------------------|-----------------|--------|
| Positief resultaat | 12 | 18 | 30 |
| Negatief resultaat | 1 | 25 | 26 |
| Totaal | 13 | 43 | 56 |

Tabel 2. Testkarakteristieken bepaald met Win Episcopo op basis van Tabel 1 met een betrouwbaarheidsinterval (BI) van 95%.

| | |
|---------------|------------------------|
| Sensitiviteit | 92,3% (BI: 77,8-100%) |
| Specificiteit | 58,1% (BI: 43,4-72,9%) |
| PVW | 40,0% (BI: 22,5-57,5%) |
| NVW | 96,1% (BI: 88,8-100%) |

(PVW = positief voorspellende waarde, NVW = negatief voorspellende waarde).

staldieet met hooi, voordroog- en/of krachtvoeder. De paarden waren van verschillende leeftijd en verschillende ras en stonden op twaalf verschillende locaties (zes stalplaatsen en zes weiden). Op elke plaats werden minimum drie dieren bemonsterd.

Een tweede groep dieren bestond uit dertien paarden die binnengebracht werden op de Faculteit Diergeneeskunde (UGent) in Merelbeke omwille van kolieksymptomen en een operatie ondergingen. Bij abdominale chirurgie was er trauma van de darmwand door de onderliggende aandoening, door de manipulatie tijdens de operatie en eventueel door de uitgevoerde enterotomie. Bijgevolg was bij deze dieren bloed aanwezig in de darm. Deze paarden werden als positieve controles aanzien.

Sensitiviteits- en specificiteitsbepaling

Voor de bepaling van de sensitiviteit (= de kans dat een paard met gastro-intestinaal bloedverlies positief test) en specificiteit (= de kans dat een paard zonder gastro-intestinaal bloedverlies negatief test) werd er spontaan geproduceerde mest onderzocht van de 43 gezonde paarden. Om trauma van de darmwand te voorkomen, werd rectaal geen mest genomen. Bij de paarden op stal werd de feces rechtstreeks uit de stal verzameld. De meest verse feces werden uitgekozen en waren maximaal één dag oud. Bij de weidepaarden werd op de weide gewacht tot de paarden mest maakten.

Ook van de dertien paarden die de dierenkliniek binnengebracht werden met kolieksymptomen en een operatie ondergingen, werd mest verzameld. Dit gebeurde bij de meeste dieren daags na aankomst. De mest werd ook hier rechtstreeks uit de stal verzameld.

Alle meststalen werden op de dag van staalname gecontroleerd op de aanwezigheid van bloed met de Hemocult SENSEA-test door middel van de bovenstaande testprocedure.

De sensitiviteit werd berekend door het aantal paarden met een positieve test na operatie te delen door het totaal aantal paarden die een operatie ondergaan hadden. Om de specificiteit te berekenen werd het aantal gezonde dieren met een negatieve test gedeeld door het totaal aantal gezonde dieren.

Invloed van het dieet op de sensitiviteit en de specificiteit

Invloed van vers groenvoeder op de testresultaten

Omdat over de invloed van het dieet bij paarden nog weinig bekend is, werd in dit onderzoek eerst nagegaan in hoeverre vers groenvoeder een invloed kan hebben op de testresultaten. Daarom werd in de eerste plaats een vergelijking gemaakt tussen het aantal (vals)positieve resultaten bij de gezonde dieren op staldieet en bij de gezonde dieren op weiderantsoen. Zoals eerder vermeld, bevatten de weideplanten namelijk peroxidasen die valspositieve resultaten kunnen veroorzaken.

Uitschakelen van valspositieve resultaten ten gevolge van het dieet

Hierbij werd nagegaan in hoeverre de valspositieve resultaten veroorzaakt door het dieet kunnen omzeild worden. In de eerste plaats werd een hertest uitgevoerd volgens de instructies van de producent.

Elk meststaal dat een positief resultaat gaf, werd opnieuw getest, waarbij de Hemocult SENSEA-oplossing pas drie dagen na het uitsmeren van de feces op de testkaarten toegevoegd werd. De testkaarten bleven dus na het uitsmeren van de mest drie dagen bewaard op kamertemperatuur. Ook bij aanwezigheid van een groene ring (Figuur 1f) werd een hertest uitgevoerd.

Vervolgens werd nagegaan hoelang de peroxidase-activiteit afkomstig van vers groenvoeder aanwezig blijft in de mest van paarden na de overgang naar een stalrantsoen. Van de bovenvermelde 43 gezonde dieren werden daarom vier paarden met een positieve gFOBT op de weide opgesteld, waarna dagelijks een Hemocult SENSEA-test werd uitgevoerd tot een negatief resultaat bekomen werd.

Bepaling van de detectielimiet

Om conclusies te kunnen trekken over de gevoeligheid van deze test, is kennis nodig over de detectielimiet bij paarden. Hierover is nog geen literatuur beschikbaar. Daarom werd deze detectielimiet in vitro bepaald.

Uitgaande van verse paardenmest van gezonde paarden werden 55 recipiënten met 10,0 g mest gevuld. Er werd een verdunningsreeks aangelegd, waarbij telkens aan vijf recipiënten vers bloed werd toegevoegd in dalende hoeveelheid, namelijk 1,0 ml; 0,5 ml; 0,2 ml; 0,1 ml; 0,05 ml; 0,025 ml; 0,015 ml; 0,010 ml en 0,005 ml. Als controlegroep werden tien recipiënten gevuld met 10,0 g mest zonder bloedtoevoeging.

Alle mestmonsters werden 10 minuten gehomoge-

Tabel 3. Resultaten van de gezonde paarden op weide en op stal.

| | Weidepaarden | Stalpaarden | Totaal |
|--------------------|--------------|-------------|-----------|
| Positief resultaat | 17 (81%) | 1 (5%) | 18 (42%) |
| Negatief resultaat | 4 (19%) | 21 (95%) | 25 (58%) |
| Totaal | 21 (100%) | 22 (100%) | 43 (100%) |

Tabel 4. Resultaten van de gezonde paarden en de stalpaarden na operatie.

| | Stalpaarden na operatie | Gezonde stalpaarden | Totaal |
|--------------------|-------------------------|---------------------|--------|
| Positief resultaat | 6 | 1 | 7 |
| Negatief resultaat | 0 | 21 | 21 |
| Totaal | 6 | 22 | 28 |

Tabel 5. Testkarakteristieken bepaald met Win Episcopy 2.0 op basis van Tabel 4 met een betrouwbaarheidsinterval (BI) van 95%.

| | |
|---------------|---------------------------|
| Sensitiviteit | 100,0% (BI: 100,0-100,0%) |
| Specificiteit | 95,5% (BI: 86,8-100,0%) |
| PVW | 85,4% (59,8-100,0%) |
| NVW | 100,0% (100,0-100,0%) |

PVW = positief voorspellende waarde, NVW = negatief voorspellende waarde

niseerd op een proefbuisrotator (Roller Mixer - RRM-105). Tenslotte werden alle meststalen in zesvoud getest met de Hemocult SENSEA-test. Dertig analyseresultaten per verdunning werden bekomen.

RESULTATEN

Sensitiviteits- en specificiteitsbepaling

In Tabel 1 worden de resultaten van de testen weergegeven uitgevoerd bij alle gezonde dieren (negatieve controlegroep) en bij de paarden na hun koliekoperatie (positieve controlegroep).

Aan de hand van het programma Win Episcopy 2.0 werden de specificiteit, sensitiviteit en de predictieve waarden berekend. Er werd gebruik gemaakt van een 95% betrouwbaarheidsinterval. De resultaten worden weergegeven in Tabel 2.

De specificiteit bedroeg 58,1 % en was dus duidelijk te laag. Er waren teveel valspositieve resultaten aanwezig: achttien gezonde dieren gaven een positief resultaat. Valsnegatieve resultaten waren uitzonderlijk: slechts één dier testte negatief ondanks een vermoedelijk bloedverlies. Daardoor was de positief voorspellende waarde slechts 40,0% terwijl de negatief voorspellende waarde 96,1% bedroeg.

Invloed van het dieet op de sensitiviteit en de specificiteit

Invloed van verse groenvoeders op de testresultaten

In Tabel 3 wordt het aantal positieve resultaten bij gezonde paarden op stal en bij gezonde paarden met weidebeloop met elkaar vergeleken.

In Tabel 3 wordt aangegeven dat slechts 5% van de stalpaarden positieve resultaten gaf. Daartegenover staat dat 81% van de weidepaarden positief testte. Univariate logistische regressie, waarbij staldieren als referentie gebruikt werden (significantie: $P < 0,05$), gaf een *odds ratio* van 89,3 % aan voor een positief testresultaat bij paarden met weidebeloop. Een mogelijke verklaring daarvoor is de aanwezigheid van plantenperoxidase in het verse groenvoeder.

Bepaling van de sensitiviteit en specificiteit bij stalpaarden

Om de invloed van de weide en eventueel aanwezige plantenperoxidase uit te schakelen, werden in Tabel 4 alleen de gegevens van de dieren op stal gebruikt.

Op basis van Tabel 5 kan geconcludeerd worden dat de sensitiviteit en de specificiteit bij de stalpaarden zeer hoog waren en de test dus goed bruikbaar is. Er waren geen valsnegatieve resultaten en slechts één paard gaf een valspositief resultaat.

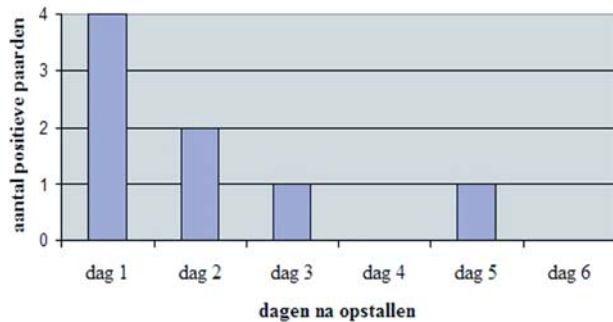
Uitschakelen van valspositieve resultaten ten gevolge van het dieet

In het voorgaande werd aangetoond dat de paarden op weide vaak valspositieve resultaten vertoonden, waarschijnlijk door toedoen van plantenperoxidase. Om deze enzymactiviteit uit te schakelen, werd volgens de instructies op de bijsluiter een hertest uitgevoerd, waarbij de testontwikkeling pas drie dagen na het uitsmeren van de feces gebeurde.

Bij deze uitgestelde testontwikkeling testten alle 21 paarden op weiderantsoen nog steeds positief. Het enige positieve stalpaard werd negatief. Een uitgestelde testontwikkeling bleek dus geen of een onvoldoende daling te veroorzaken van de plantenperoxidaseactiviteit bij de paarden op weiderantsoen.

In Figuur 2 wordt weergegeven hoelang de gezonde paarden met een weidegerelateerde valspositieve gFOBT positief bleven reageren na de overgang van weide naar stal.

Uit dit beperkte onderzoek kan voorzichtig besloten worden dat valspositieve reacties vier tot vijf dagen na voederwijziging verdwijnen.



Figuur 2. Evolutie van positieve resultaten bij het opstallen van weidepaarden.

Bepaling van de detectielimiet

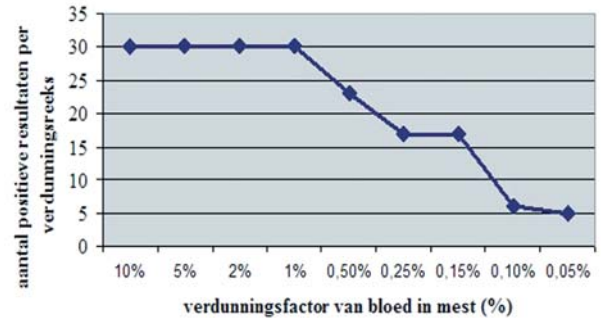
De resultaten van de verdunningsreeks van vers paardenbloed in mest worden weergegeven in Figuur 3. Alle testvakjes gaven tot 1% verdunning een positief resultaat. Daarna was er een progressieve daling van het aantal positieve testen te zien. Zelfs bij een 0,05% verdunning, bleek de test toch nog positieve resultaten te geven.

DISCUSSIE

De Hemocult SENSEA-test blijkt, zoals in de literatuur beschreven is, een gemakkelijk uit te voeren en goedkope test te zijn. De toepassing in de diergeneeskunde moet echter gebeuren met de nodige aandacht voor een aantal specifieke punten.

Uit de resultaten van de voorliggende studie bleek dat het rantsoen een duidelijke invloed kan hebben op de testresultaten. Paarden die op een dieet stonden met vers groenvoeder, gaven veel valspositieve resultaten met de gFOBT. In het enige artikel over het gebruik van gFOBT bij paarden werd het dieet daarentegen niet vermeld als belangrijke oorzaak van valspositieve resultaten (Pellegrini, 2005). In dit onderzoek werd echter geen informatie gegeven over het rantsoen van de dieren. De kans bestaat dus dat de meeste paarden een stalrantsoen kregen.

In de humane geneeskunde lijkt het probleem van dieetgeïnduceerde valspositieve resultaten omzeilbaar door de ontwikkeling van de test 48 uur uit te stellen. Uit de resultaten van de onderhavige studie bleek dat dit bij paarden zelfs na 72 uur niet het geval was. Dit zou enerzijds kunnen verklaard worden door de zowel absoluut als relatief grotere hoeveelheid vers groenvoeder die paarden opnemen dan de mens: een paard van 500 kg kan dagelijks tot 12,5 kg droge stof opnemen (2,5% van het lichaamsgewicht). Daarnaast kan het soort voedsel een rol spelen. Bij de mens is bekend dat vooral broccoli, rapen, bananen, ananas en rode vruchten valspositieve resultaten veroorzaken (Caligiore *et al.*, 1982; Gnauck *et al.*, 1984). Deze voedingsmiddelen behoren niet noodzakelijk tot het dagelijkse dieet van mensen, maar worden eerder sporadisch opgenomen. Paarden op weide eten daarentegen dagelijks een grote hoeveelheid plantenperoxidaserijke voedingsmiddelen (grassen).



Figuur 3. Resultaten van de verdunningsreeks van bloed in paardenmest (30 analyses per verdunning).

De enige manier om deze valspositieve resultaten te vermijden, lijkt volgens de resultaten van het huidige onderzoek, het aanpassen van het dieet te zijn. Bij weidepaarden betekent dit dus het opstallen van de dieren, waarbij ze gedurende minstens vier tot vijf dagen geen toegang tot vers groenvoeder meer hebben.

De uiteindelijke sensitiviteits- en specificiteitsbepaling in deze studie gebeurde daarom bij dieren op gewoon stalrantsoen. Hierbij moet opgemerkt worden dat er geen gebruik gemaakt kon worden van een absoluut betrouwbare gouden standaard. Voor de bepaling van de sensitiviteit en specificiteit werd ervan uitgegaan dat paarden na een koliekoperatie altijd een substantieel intestinaal bloedverlies hebben en bijgevolg positief testen met de gFOBT. Bij deze groep dieren bleek de sensitiviteit in de voorliggende studie zeer hoog, namelijk 100%. Vermits er in de studie geen paarden met maagulcera of rechter dorsale colitis opgenomen werden, waren de bekomen testkarakteristieken moeilijk te extrapoleren naar de specifieke aandoeningen. Er is immers weinig informatie over de hoeveelheid bloed die verloren gaat bij deze pathologieën: indien het gaat over kleinere hoeveelheden bloed dan bij de onderzochte koliekpaarden, zou de sensitiviteit van de detectie van maagulcera en rechter dorsale colitis door middel van de FOBT lager kunnen zijn.

Om een beter idee te krijgen van de hoeveelheid bloed die door de Hemocult SENSEA-test bij het paard kan opgespoord worden, werd daarom via een *in vitro* verdunningsreeks de detectielimiet bepaald. Uit Figuur 3 blijkt dat de test de aanwezigheid van ongeveer 1% bloed in de mest kan detecteren. Voor een volwassen paard met een mestproductie van 12 kg per dag, zou dit ongeveer neerkomen op 120 ml bloedverlies per dag. Bij de mens wordt de gevoeligheid geschat op 2-3 ml, een beduidend beter resultaat. Aangezien het paard echter per kg lichaamsgewicht dagelijks ongeveer tien keer meer mest produceert dan de mens, zou dit verschil door de grotere verdunning van het bloed in paardenmest verklaard kunnen worden.

In ieder geval lijkt de Hemocult SENSEA-test bruikbaar om bloedingen distaal in het maagdarmkanaal op te sporen. Naast de reeds vermelde detectie van ulceratieve darmletsels zou een andere toepassing het opsporen van intestinaal bloedverlies na een koliekoperatie kunnen zijn. Indien de FOBT reeds enkele dagen na de operatie negatief wordt, zou dit kunnen duiden op een

vlug herstel van de darmwand, terwijl dagenlang persisterende positieve testen eerder een negatieve prognostische indicator zouden zijn. Het gebruik van de FOBT als prognostische indicator na koliekchirurgie wordt ook door de producenten van de immunochemische SUCCEED *equine fecal blood test* op hun website vermeld.

Bij het gebruik van de Hemocult SENSEA-test zijn er, naast het dieet en de hoeveelheid bloedverlies, nog een paar andere aandachtspunten. In de humane geneeskunde wordt aangeraden om minstens drie opeenvolgende fecesstalen te onderzoeken. Op die manier wordt gecompenseerd voor intermitterend bloedverlies. Aangezien er bij EGUS en ulceratieve colitis bij het paard waarschijnlijk ook intermitterend of op zijn minst een variabel bloedverlies is, kunnen deze aandoeningen met een éénmalige FOBT makkelijk gemist worden. Zo werd tijdens het onderhavige onderzoek de mest van twee paarden met uitgesproken maagulcera éénmalig onderzocht op de dag van de gastroscopie, maar toch bleken beide dieren negatief te testen voor fecaal occult bloed. Het intermitterende bloedverlies zou dit negatieve analysesresultaat kunnen verklaren, naast de mogelijke vertering van de heem-moleculen bij passage doorheen het gastro-intestinaal kanaal (Rockey *et al.*, 1999). Meer onderzoek is nodig om de diagnostische mogelijkheden van de FOBT in verband met maagulcera te verduidelijken.

Een ander aandachtspunt in verband met de Hemocult SENSEA-test handelt over de standaardisatie van de aflezing van de test. De vele kleurschakeringen die kunnen optreden, kunnen aanleiding geven tot verwarring bij de interpretatie. De literatuur uit de humane geneeskunde én de tekst op de bijsluiters zijn hieromtrent niet eenduidig. Daarenboven is over het gebruik bij het paard vrijwel niets bekend. Volgens dit onderzoek zouden de beste resultaten bekomen worden, wanneer blauw, blauwgroene en groene resultaten die niet wegwassen naar perifeer, als positief beschouwd worden. Dit sluit perfect aan bij de richtlijnen die door Gordon *et al.* (2004) geformuleerd werden voor de interpretatie van de analyses in de humane geneeskunde.

CONCLUSIE

De Hemocult SENSEA-test is een goedkope, gemakkelijk uit te voeren test die goed bruikbaar is voor het opsporen van distale intestinale bloedingen bij paarden op stalrantsoen. De test kan niet gebruikt worden bij paarden die vers groenvoeder opnemen, vermits 81% van die dieren valspositieve resultaten vertoont. Ook voor het opsporen van hogere bloedingen, zoals bij maagulceraties, lijkt de test minder geschikt.

Om bloedingen proximaal in het gastro-intestinaal kanaal toch te kunnen detecteren en om problemen met het dieet te vermijden, zouden volgens de literatuur immunochemische testen, zoals de SUCCEED *equine fecal blood test* een alternatief kunnen vormen. Hiernaar is echter nog verder onderzoek nodig.

LITERATUUR

- Caligiore P., Macrae F.A., St. John D.J.B., Rayner L.J., Legge J.W. (1982). Peroxidase levels in food: relevance to colorectal cancer screening. *The American Journal of Clinical Nutrition* 35, p. 1487-1489
- Campbell N.B., Jones S.L., Blikslager A.T. (2002). The effects of cyclo-oxygenase inhibitors on bile-injured and normal equine colon. *Equine Veterinary Journal* 34, p. 493-398
- Carter S., Pellegrini F.L. (2007). The use of novel antibody tools to detect the presence of blood in equine feces. *Internetreferentie: http://www.succeedfbt.com/Antibody_Summary.pdf accessed on 20th of august, 2011*
- Cohen N.D. (2002). Right dorsal colitis. *Equine Veterinary Education* 25, p. 212-219
- Gnauck F., Macrae F.A., Fleisher M. (1984). How to perform the fecal occult blood test. *Cancer Journal for Clinicians* 34, p. 134-147
- Gordon J.C., Steele R.J.C., Fraser C.G. (2004). Green-coloured results on guaiac-based faecal occult blood testing should be considered positive. *Annals of Clinical Biochemistry* 41, p. 488-490
- Levin B., Brooks D., Smith R.A., Stona A. (2003). Emerging technologies in screening for colorectal cancer: CT colonography, immunochemical fecal occult blood tests and stool screening using molecular markers. *A Cancer Journal for Clinicians* 53, p. 44-55
- Otto S., Eckhardt S. (2000). Early detection for colorectal cancer: New aspects in fecal occult blood screening. *Journal of Surgical Oncology* 75, p. 220-226
- Passardi F., Cosio C., Penel C., Dunand C. (2005). Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Reports* 24, p. 255-265
- Pellegrini F.L. (2005). Results of a large-scale necroscopic study of equine colonic ulcers. *Journal of Veterinary Science* 25, p. 113-117
- Picavet M.-Th. (2002). Equine gastric ulcer syndrome. In: *Proceedings of the First European Equine Nutrition and Health Congress*, February 9th, 2002, Antwerp, Belgium
- Rockey D.C. (2005). Occult gastrointestinal bleeding. *Gastroenterology Clinics of North America* 34, p. 699-718
- Rockey D.C., Auslander A., Greenberg P. (1999). Detection of upper gastrointestinal blood with fecal occult blood tests. *The American Journal of Gastroenterology* 94, p. 344-350
- Rozen P., Knaani J., Samuel Z. (1999). Eliminating the need for dietary restrictions when using a sensitive guaiac fecal occult blood test. *Digestive Diseases and Sciences* 44, p. 756-760
- Saito H. (1996). Screening for colorectal cancer by immunochemical fecal occult blood testing. *Japanese Journal of Cancer Research* 87, p. 1011-1024
- Sinatra M.A., St. John J.B., Young G.P. (1999). Interference of plant peroxidases with guaiac-based fecal occult blood tests is avoidable. *Clinical Chemistry* 45, p. 123-126
- Videla R., Andrews F. (2009). New perspectives in Equine Gastric Ulcer Syndrome. *Veterinary Clinics of North America-Equine Practice* 25, p. 283-301