

# Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift

JANUARI-FEBRUARI 2016  
VOL. 85 - NR. 1

VERSCHEIJNT TWEEMAANDELIJKS  
PUBLISHED BIMONTHLY  
ISSN 0303 9021  
WWW.VDT.UGENT.BE  
GENT X

Afgiftekantoor 9099 Gent X  
v.u. Luc Peelman  
Salisburylaan 133 - B-9820 Merelbeke

- Polytetrafluorethyleen-intoxicatie bij vogels
- Retractie van de diepe buigpees bij het paard
- Mini-FLOTAC voor parasietdetectie bij grote huisdieren
- Neusreconstructie na carcinoomresectie bij twee honden
- Twee sarcomen in de cornea van een kat
- Colistineresistentie
- *Clostridium perfringens*-infecties bij runderen

# Vacature PROEFSTALMANAGER



Dopharma B.V. is een dynamisch bedrijf dat op basis van eigen kennisbronnen veterinaire farmaceutische producten registreert en produceert. Zowel in het binnen- als buitenland biedt Dopharma een uitgebalanceerd pakket diergeneesmiddelen aan. Dopharma produceert 95% van haar diergeneesmiddelen zelf, op eigen moderne GMP gecertificeerde productielijnen, waaronder een steriele plant. Voor een snelle distributie in Nederland heeft Dopharma een eigen expeditie afdeling. Binnen Dopharma Research B.V. worden registratiestudies verricht. Hiertoe beschikt Dopharma Research over 2 laboratoria en een proefstal, waar de onderzoeken worden uitgevoerd in overeenstemming met de GLP principes.

Wegens vervanging, zijn wij op zoek naar een:

## PROEFSTALMANAGER

o.b.v. een fulltime dienstverband

### Taken en verantwoordelijkheden

Als proefstalmanager ben je verantwoordelijk voor het dagelijks, doelmatig functioneren van de proefstal en het aansturen van de proefdiervverzorgers

- Organisatie van de werkzaamheden op de stal conform projectplanning, de beginselen van GLP en met inachtneming van de Wet op de Dierproeven (WoD)
- Toezicht houden op het dierenwelzijn binnen de stalfaciliteit (neemt zitting in de Instantie voor Dierenwelzijn (IvD) Dopharma)
- Aanvragen van projectvergunningen bij de Centrale Commissie voor Dierproeven (CCD), in nauw overleg met Dierexperimentencommissie (DEC)
- Als principal investigator verantwoordelijk voor de stalfase van dierstudies
- Study director van tolerantiestudies en klinische studies in het veld
- Actieve bijdrage leveren binnen het research team t.a.v. wetenschappelijke vraagstukken



### Wat verwachten wij van u

- Dierenarts - Landbouwhuisdieren met enkele jaren praktijkervaring
- Bevoegdheid ex art 9 Wet op de Dierproeven
- Affiniteit met wetenschappelijk onderzoek
- Ervaring met het werken volgens kwaliteitssystemen (GLP) is een pré
- Leidinggevende capaciteiten
- Uitstekende beheersing van Nederlandse en Engelse taal in woord en geschrift
- Goede beheersing van MS Office (Word, Power Point en Excel)
- Een enthousiaste teamplayer met goede sociale en communicatieve vaardigheden

### Wij bieden

- Een uitdagende en veelzijdige functie
- Een inspirerende werkomgeving
- Goede primaire en secundaire arbeidsvoorzieningen

### Informatie

Voor meer informatie over de functie proefstal manager kunt u contact opnemen met mw. Irma van Deurzen, Managing Director van Dopharma Research B.V., e-mail: [i.vandeurzen@dopharma.com](mailto:i.vandeurzen@dopharma.com), telefoonnummer + 31 (0) 162 58 2000. Voor uitgebreide informatie over onze organisatie verwijzen wij u naar onze website [www.dopharma.com](http://www.dopharma.com).

### Solliciteren

Mocht u belangstelling hebben voor de vacature en herkent u zich in het bijbehorende profiel, dan zien wij uw sollicitatie t.a.v. mw. Vivian Couwenberg, afdeling Personeelszaken (e-mail: [v.couwenberg@dopharma.com](mailto:v.couwenberg@dopharma.com)), graag binnen 6 weken na publicatiedatum per e-mail tegemoet of op onderstaand adres: Dopharma Holding, t.a.v. Vivian Couwenberg, Zalmweg 24, 4941 VX, Raamsdonksveer, Nederland

# VLAAMS DIERGEENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT

2016, vol. 85, nr. 1

## INHOUD

Overzichtsartikel	Review
3 N. CAEKEBEKE, G. ANTONISSEN, P. DE BACKER, S. CROUBELS Polytetrafluorethyleen-intoxicatie bij vogels	N. CAEKEBEKE, G. ANTONISSEN, P. DE BACKER, S. CROUBELS Polytetrafluoroethylene intoxication in birds
Retrospectieve studie	Retrospective study
9 S. CARLIER, M. OOSTERLINCK, A. MARTENS, F. PILLE Behandeling van verworven retractive van de diepe buigpees bij het paard: een retrospectieve studie van 51 gevallen	S. CARLIER, M. OOSTERLINCK, A. MARTENS, F. PILLE Treatment of acquired flexural deformity of the distal interphalangeal joint in the horse: a retrospective study of 51 cases
Origineel artikel	Original article
15 N. VAN DEN PUTTE, E. CLAEREBOUW, B. LEVECKE Evaluatie van de mini-FLOTAC-methode voor de detectie van gastro-intestinale parasieten bij grote huisdieren	N. VAN DEN PUTTE, E. CLAEREBOUW, B. LEVECKE Evaluation of the mini-FLOTAC technique for detection of gastro-intestinal parasites in large companion animals
Casuïstieken	Case reports
23 S. LIPPENS, B. VAN GOETHEM, I. GIELEN, I. POLIS, H. DE ROOSTER Cosmetische rostrale neusreconstructie na plaveiselcelcarcinoom-resectie bij twee honden	S. LIPPENS, B. VAN GOETHEM, I. GIELEN, I. POLIS, H. DE ROOSTER Cosmetic rostral nasal reconstruction after resection of squamous cell carcinoma in two dogs
31 G. STORMS, C. NARANJO, M. GRAUWELS Het gelijktijdig voorkomen van een plaveiselcelcarcinoom en hemangiosaroom in de cornea bij een kat	G. STORMS, C. NARANJO, M. GRAUWELS Concurrent squamous cell carcinoma and hemangiosarcoma in the cornea of a cat
Voor de praktijk	In practice
36 B. CALLENS, F. HAESEBROUCK, J. DEWULF, F. BOYEN, P. BULTAYE, B. CATRY, P. WATTIAU, E. DE GRAEF Risico op colistineresistentie neemt toe	B. CALLENS, F. HAESEBROUCK, J. DEWULF, F. BOYEN, P. BULTAYE, B. CATRY, P. WATTIAU, E. DE GRAEF Risk of colistin resistance on the rise
Permanente vorming	
41 B. VALGAEREN, E. GOOSSENS, S. VERHERSTRAETEN, L. GILLE, L. VAN DRIESSE, F. VAN IMMERSEEL, R. DUCATELLE, P. DEPREZ, B. PARDON Gastro-intestinale <i>Clostridium perfringens</i> -infecties: een blijvend gevaar in de Belgische rundveehouderij	
Vraag en antwoord	
50 Bestrijding van <i>streptococcus suis</i> -infecties bij biggen 51 Schijndracht bij geiten	
Errata	
8, 22, 30 Uit het verleden	

### Coverfoto: Mieke Eeman (Kasterlee).

Vooraf Belgisch witblauwe *witveleskalveren* zijn zeer gevoelig voor enterotoxemie veroorzaakt door *Clostridium perfringens*. Een mogelijke verklaring is de intensieve voeding met grote hoeveelheden melkvervangers rijk aan eiwit en snel verteerbare suikers. Wanneer de kalveren niet in staat zijn om deze nutriënten op een efficiënte manier te verteren, zijn ze vatbaar voor een snelle bacteriële overgroei en voor toxineproductie, wat leidt tot een bloederige darmontsteking of enterotoxemie. Bovendien bevatten veel van deze poeders grote hoeveelheden soja, als alternatieve eiwitbron voor melkeiwit. Soja heeft echter een antitrypsine-activiteit, wat zou kunnen bijdragen tot een verminderde afbraak van de toxines geproduceerd door *C. perfringens*.

Tekst: Bonnie Valgaeren

# VLAAMS DIERGENEESKUNDIG TIJDSCHRIFT

ISSN 0303-9021

<http://vdt.UGent.be>

**Hoofdredacteur en verantwoordelijke uitgever:** Luc Peelman  
**Coördinator en eindredacteur:** Nadia Eeckhout  
**Redacteur rubriek "Uit het verleden":** Luc Devriese

## Redactiecomité:

P. Bols, C. Burvenich, E. Cox, S. Daminet, P. De Backer, P. De-prez, L. Devriese, R. Ducatelle, M. Haspeslagh, M. Hesta, K. Houf, J. Laureyns, I. Polis, J. Saunders, P. Simoens, L. Van Ham, F. Van Immerseel, A. Van Soom, A. Van Zeveren

## Druk:

Geers Offset NV  
Eekhoudriesstraat 67, B-9041 Oostakker

## Publiciteit:

Boerenbond – Media-Service, Diestsevest 40, B-3000 Leuven  
Tel. 016 28 63 33

## Inlichtingen (voor auteurs) en Abonnementen:

Nadia Eeckhout  
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke  
Tel. 09 264 75 13  
[nadia.eeckhout@UGent.be](mailto:nadia.eeckhout@UGent.be)

Het Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift verschijnt 6 maal per jaar en wordt uitgegeven door de Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent.

Voor intekening dient U contact op te nemen met het secretariaat van het tijdschrift: [nadia.eeckhout@UGent.be](mailto:nadia.eeckhout@UGent.be); tel. 09 264 75 13; fax 09 264 77 99. Er zal u een factuur toegestuurd worden van 60 euro (+6% BTW) (abonnees in België) of 80 euro (+6% BTW) (abonnees in het buitenland). Studenten en faculteitspersoneel kunnen genieten van een gunsttarief.

De verantwoordelijkheid voor alle gepubliceerde methoden, materialen en aanbevelingen berust bij de auteurs van de betreffende bijdragen. De redactie en uitgever zijn niet verantwoordelijk voor eventuele letsels of schade als gevolg van toepassingen die daaruit voortvloeien.

## Beknopte richtlijnen voor auteurs

Ieder manuscript zal qua inhoud en vorm beoordeeld worden door 2 onafhankelijke personen.

De samenvatting mag niet langer zijn dan 5% van het artikel met een max. van 150 woorden.

De literatuuaraangave **in de tekst** dient als volgt te gebeuren: de naam van de auteur(s) en het jaar van publicatie (Voorbeeld: "... werd vroeger aangetoond (Brown, 1975; Brown en Ellis, 1975; Brown *et al.*, 1975)" ofwel "Brown (1975) toonde vroeger aan dan ...". Er is dus geen cijferaanwijzing in de tekst.

In de **literatuurlijst** dienen achtereenvolgens vermeld: namen van auteur(s), initialen van voornamen, jaartal, titel van artikel, naam van tijdschrift, volume, paginering. Voorbeeld: Allan W.R., Rowson L.B., (1973). Control of the mare's oestrus cycle by prostaglandins. *Journal of Reproduction and Fertility* 33, 539-543.

De referenties zijn alfabetisch gerangschikt. Artikels van dezelfde auteur(s) dienen per jaartal gerangschikt en in de tekst aangeduid te worden als: (1975a, 1975b)... Bij boeken dienen plaats en naam van uitgever vermeld te worden.

**Editor-in-chief and publisher:** Luc Peelman  
**Editorial office:** Nadia Eeckhout  
**Editor "History":** Luc Devriese

## Editorial board:

P. Bols, C. Burvenich, E. Cox, S. Daminet, P. De Backer, P. De-prez, L. Devriese, R. Ducatelle, M. Haspeslagh, M. Hesta, K. Houf, J. Laureyns, I. Polis, J. Saunders, P. Simoens, L. Van Ham, F. Van Immerseel, A. Van Soom, A. Van Zeveren

## Printed by:

Geers Offset NV  
Eekhoudriesstraat 67, B-9041 Oostakker

## Advertisements:

Boerenbond – Media-Service, Diestsevest 40, B-3000 Leuven  
Tel. 016 28 63 33

## Information (for authors) and Subscriptions:

Nadia Eeckhout  
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke  
Tel. 09 264 75 13  
[nadia.eeckhout@UGent.be](mailto:nadia.eeckhout@UGent.be)

The 'Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift' is published six times per year by the Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University. For subscriptions, please contact the administrative offices of the journal: [nadia.eeckhout@UGent.be](mailto:nadia.eeckhout@UGent.be); tel. 0032 9 264 75 13; fax 0032 9 264 77 99. An invoice of 80 euros (+6% VAT) will be sent.

The responsibility for all methods, materials and recommendations published herein rests solely with the authors of the various contributions. No responsibility is assumed by the editorial staff or publisher for any resulting injury or damage.

More detailed information is available on  
[www.vdt.ugent.be](http://www.vdt.ugent.be)

**Figuren en tabellen** dienen contrastrijk te zijn en op afzonderlijke bijlagen te worden ingediend. De figuren moeten een grootte hebben van minstens 200 kb.

Het aantal tabellen en figuren wordt tot een noodzakelijk minimum beperkt.

Voor de figuren dienen titels en teksten gezamenlijk op een apart blad aangebracht te worden.

**Overzichtsartikelen** mogen niet te uitgebreid zijn (norm: max. 20 getypte bladzijden) en het aantal referenties wordt beperkt gehouden.

De auteurs gaan ermee akkoord dat hun gepubliceerd artikel hergebruikt kan worden, mits vermelding van de bron.

Verdere details kunnen verkregen worden op de redactie of op [www.vdt.ugent.be](http://www.vdt.ugent.be)

## Polytetrafluorethyleen-intoxicatie bij vogels

### *Polytetrafluoroethylene intoxication in birds*

<sup>1</sup>N. Caekebeke, <sup>1,2</sup>G. Antonissen, <sup>1</sup>P. De Backer, <sup>1</sup>S. Croubels

<sup>1</sup>Vakgroep Farmacologie, Toxicologie en Biochemie,  
<sup>2</sup> Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten,  
 Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, België

Gunther.Antonissen@UGent.be  
 Siska.Croubels@UGent.be

## SAMENVATTING

**Polytetrafluorethyleen is een uniek polymeer dat tal van toepassingen kent in het dagelijkse leven. Bij thermale degradatie van dit polymeer, beter bekend onder de merknaam Teflon<sup>®</sup>, ontstaan echter toxische gassen en ultrafijne partikels die intoxicatie kunnen veroorzaken bij zowel mens als dier. De samenstelling en toxiciteit van deze degradatieproducten zijn sterk afhankelijk van de specifieke omstandigheden op het moment van afbraak. De klinische symptomen en letsels zijn zeer verschillend naargelang de diersoort. Vogels blijken uitermate gevoelig te zijn en een intoxicatie resulteert meestal in sterfte. De voornaamste bron van polytetrafluorethyleen-intoxicatie bij gezelschapsvogels is het oververhitten van anti-aanbaklagen in kookgerei. Aangezien de diagnose en behandeling vaak te laat komen, moet de nadruk liggen op preventie.**

## ABSTRACT

Polytetrafluoroethylene is a unique polymer, which is very present in daily life, and is commonly known as Teflon<sup>®</sup>. When thermal degradation takes place, toxic gasses and ultrafine particles appear, and may cause intoxication both in humans and animals. The composition and toxicity of these degradation products depend on the specific conditions at the moment of breakdown. The clinical symptoms and injuries differ greatly between species. Birds appear to be very sensitive, and intoxication mostly results in sudden death. The main source of polytetrafluoroethylene intoxication in pet birds, is the heating of non-stick cookware in the kitchen. As the diagnosis and treatment often come too late, the emphasis must lay on prevention.

## INLEIDING

Polytetrafluorethyleen (PTFE) is een synthetisch polymeer van tetrafluorethyleen (TFE) (Wells et al., 1982; Odochian et al., 2011) (Figuur 1). Het bedrijf DuPont (Delaware, VS) patenteerde PTFE in 1945 onder de merknaam Teflon<sup>®</sup> (Thomas, 1998). Ondertussen is dit materiaal verkrijpelijk vormen en onder verschillende merknamen (Yao en Eskandari, 2012). Dit polymeer heeft door zijn unieke eigenschappen zeer veel mogelijke toepassingen, zoals in de anti-aanbaklaag van pannen en bakplaten, in de isolatie van elektrische kabels, zelfs in boilers, strijkijzers, kachels en warmtelampen (Forbes en Jones, 1997; Boucher et al., 2000; Lightfoot en Yeager, 2008). PTFE is een van de meest thermostabiele kunststoffen en een zeer goede isolator door zijn lage warmtegeleidingscoëfficiënt (Blumm et al., 2008). Polytetrafluor-ethyleen

kan chemisch enkel degraderen in contact met alkali-metalen, zoals lithium, natrium, kalium of rubidium (Tanaike et al., 2002). De PTFE-laag zelf is niet giftig, ook niet als deze beschadigd wordt of wanneer deze in de voeding terecht komt. Bij oververhitting zal deze laag echter degraderen (Tsai et al., 2000). De chemische verbindingen die hierbij vrijkomen, kunnen geïnhaleerd worden en klinische symptomen veroorzaken bij mens en dier. Polytetrafluorethyleen behoudt zijn thermische stabiliteit tot 260°C. Tussen 260 en 360°C zijn de verliezen minimaal onder de vorm van vocht en gassen. Temperaturen van 400°C en meer zorgen voor significante decompositie door middel van pyrolyse (García et al., 2007). Afhankelijk van de temperatuur, luchtvochtigheid, het aanwezige zuurstofgehalte in de lucht en het soort PTFE kunnen verschillende afbraakproducten ontstaan (Zook et al., 1983; García et al., 2007; LaBonde, 2012)

(Tabel 1). Sommige van deze afbraakproducten zijn slechts mild toxisch terwijl andere stoffen aanleiding kunnen geven tot ernstige intoxicaties. Een van de meest toxische degradatieproducten van PTFE is perfluoroisobutyleen (PFIB). Bij temperaturen boven 400°C komen slechts geringe hoeveelheden van deze stof vrij. De letale concentratie waarbij 50% van de dieren (LC<sub>50</sub>) sterft aan PFIB is echter 0,5 mg/kg na vier uur blootstelling, waardoor de aanwezigheid van deze stof steeds als belangrijk moet aanschouwd worden (Waritz, 1975; Baker en Kasprzak, 1993; Tsai et al., 2000). In dit artikel wordt een overzicht gegeven van de toxiciteit van PTFE voor vogels.

### Werkingsmechanisme van PTFE-intoxicatie

Bij afbraak van PTFE komen zowel gassen als nanopartikels vrij (Waritz, 1975). Inhalatie van deze degradatieproducten induceert een sterke inflammatoire reactie ter hoogte van de longen. Hierbij is er een grote influx van neutrofielen in de alveolaire ruimten. De neutrofielen worden geactiveerd door de nanopartikels, wat leidt tot de inductie van oxidatieve stress door de vrijstelling van aanzienlijke hoeveelheden reactieve zuurstofradicalen. Oxidatieve longschade kan dan ontstaan ter hoogte van de epitheliale en endotheliale barrières, waardoor vocht en bloed de luchtwegen kunnen insijpelen (Johnston et al., 1996; Shuster et al., 2012).

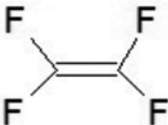

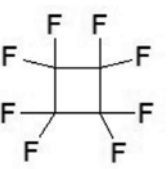
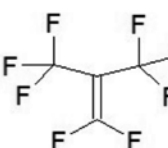
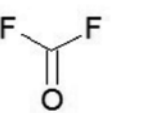
Daarnaast kunnen de ultrafijne partikels zich ook gedragen als carriers voor reactieve of toxische componenten in de gasfase. Deze componenten kunnen namelijk op zichzelf niet tot in de diepere luchtwegen reiken. In de alveolen maken ze contact met de daar aanwezige macrofagen, type II-pneumocyten en de interstitiële en endotheliale cellen. Eens de cellen zijn aangetast, ontstaat een vrijstellingscascade van cytokinen en “vascular endothelial growth factor” (VEGF) die verantwoordelijk zijn voor de inductie van letsels (Johnston et al., 1996; Poppenga en Tawde, 2012).

Het optreden van neurologische symptomen met onder meer letsels ter hoogte van de hersenen, doen gelijkaardige reacties vermoeden ter hoogte van het centrale zenuwstelsel (Zook et al., 1983).

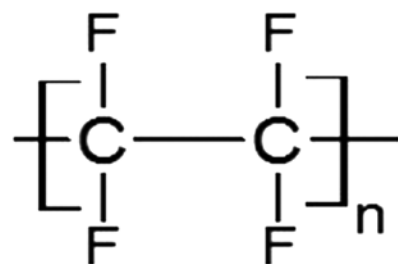
### Toxiciteit

Door de unieke anatomie van hun ademhalingsstelsel zijn vogels heel gevoelig voor aerogene toxinen. De rigide longen worden actief geventileerd door negen luchtzakken (er zijn speciesverschillen), waardoor zowel tijdens in- als expiratie gasuitwisseling optreedt. Deze anatomie verzekert een efficiënte zuurstofuitwisseling, maar ook schadelijke gassen en partikels worden op deze manier gemakkelijker uit de omgeving opgenomen (Dumoncaux en Harrison, 1994; Lightfoot en Yeager, 2008; Casteleyn et

**Tabel 1. Belangrijkste degradatieproducten van polytetrafluorethyleen (Waritz, 1975; Tsai et al., 2000; García et al., 2007).**

<b>Tetrafluorethyleen</b> <b>C<sub>2</sub>F<sub>4</sub></b>	
<b>Hexafluoropropyleen</b> <b>C<sub>3</sub>F<sub>6</sub></b>	
<b>Perfluorocyclobutaan</b> <b>C<sub>4</sub>F<sub>8</sub></b>	
<b>Perfluoroisobutyleen</b> <b>C<sub>4</sub>F<sub>8</sub></b>	
<b>Carbonylfluoride</b> <b>CF<sub>2</sub>O</b>	

al., 2011). Bovendien zijn er ook verschillen in gevoeligheid naargelang de vogelsoort. Algemeen kan gesteld worden dat hoe kleiner de vogel, hoe groter de gevoeligheid voor blootstelling aan aerogene toxinen is. De oorzaak zou liggen in de grotere luchtuitwisseling per gram lichaamsgewicht (Sandmeier en Coutteel, 2006). Grasparkieten (*Melopsittacus undulatus*), valkparkieten (*Nymphicus hollandicus*) en vinken (*Fringillidae* spp.) blijken het meest gevoelig voor PTFE (Blandford et al., 1975; Wells et al., 1982; Lightfoot en Yeager, 2008). Bij jonge, oude of gecompromitteerde dieren ligt deze gevoeligheid nog hoger (LaBonde, 1995). De “approximate lethal temperature” (ALT) is bepaald voor de Japanse kwartel en parkiet, en bedraagt respectievelijk 330°C en 280°C. Dit is lager dan de ALT voor ratten, namelijk 450°C (Griffith et al., 1973; Waritz, 1975).



**Figuur 1. Structuurformule van polytetrafluorethyleen (naar Khedkar et al., 2002).**

Vogels die gehouden worden als huisdier zijn het voornaamste slachtoffer van PTFE-intoxicatie. De risico's zijn verbonden met het gebruik van anti-aanbakpannen die onder meer uit PTFE zijn vervaardigd omwille van zijn lage wrijvingscoëfficiënt (Khedkar et al., 2002). Wanneer lege pannen worden verhit (Poppenga en Tawde, 2012) of wanneer de inhoud van de pan indroogt, kunnen toxische stoffen vrijkomen wegens de hoge temperaturen die dan ontstaan. Een andere bekende bron van intoxicatie zijn warmtelampen gecoat met PTFE (Boucher et al., 2000; Shuster et al., 2012). Deze lampen worden in de industriële pluimvee-sector gebruikt omdat de PTFE-coating ervoor zorgt dat bij het stuk gaan van de lamp geen glasdeeltjes verspreid worden (Shuster et al., 2012).

Bij de mens kan PTFE ook intoxicatie veroorzaken bekend onder de naam "polymer fume fever" (PFF) (Johnston et al., 1996). Intoxicaties worden voornamelijk gezien bij mensen tewerkgesteld in een omgeving waar PTFE wordt verwerkt (Silver en Young, 1993). Door de verbeterde werkomstandigheden is het aantal humane intoxicaties sterk gedaald (Greenberg en Vearrier, 2015). Verhitte skiwas (Bracco en Favre, 1998), het slecht functioneren van elektronische apparatuur, zoals microgolfovens (Zanen en Rietveld, 1993) en roken in een omgeving met PTFE (Anoniem, 1972; Silver en Young, 1993) zijn in het verleden oorzaak geweest van het optreden van PFF. Het exacte onderliggende werkingsmechanisme van PFF is echter nog niet bekend.

## SYMPTOMEN EN LETSELS

Het primaire targetorgaan na inhalatie van de degradatieproducten van PTFE is de long. De klinische symptomen zijn vaak aspecifiek met enkel het optreden van plotse sterfte. Afhankelijk van de graad van blootstelling kunnen de eerste symptomen hijgen en braken zijn, gevolgd door incoördinatie en de onmogelijkheid tot rechtstaan, eindigend met terminale convulsies en coma (Harrison et al., 2006; Richardson, 2006; Lightfoot en Yeager, 2008). Ook slaperigheid, dyspneu, een piepende ademhaling, reutels op auscultatie, depressie en ataxie worden vermeld (Dumoncaux en Harrison, 1994; LaBonde, 1995; Lightfoot en Yeager, 2008; Shuster et al., 2012). Bij blootstelling aan grote hoeveelheden gas is acute sterfte vaak het enige symptoom dat gezien wordt. Zelfs een eenmalige blootstelling aan een lage dosis kan bij vogels sterfte geven, en dit over een periode variërend van enkele weken tot maanden (Forbes en Jones, 1997). Bij PTFE-geassocieerde intoxicatie bij grasparkieten wordt het knippen met de ogen het eerst opgemerkt en verklaard door de directe chemische irritatie van de gassen of de slaperigheid ten gevolge van hypoxie of disfunctie van de longen. Gedragsveranderingen en fysiologische reacties, zoals hijgen, zijn gelinkt aan ademhalingsmoeilijkheden. Incoördinatie en de



**Figuur 2. Kanarie met longoedeem na een polytetrafluor-ethyleen-intoxicatie (Foto: P. Coutteel).**

onmogelijkheid om te blijven rechtstaan zijn ook het gevolg van hypoxie door de inefficiënte respiratie ter hoogte van het beschadigde longweefsel (Wells et al., 1982).

Bij autopsie zijn soms een bloederig exsudaat ter hoogte van de neusgaten en longstuwung aanwezig. Microscopische letsels ter hoogte van de longen kunnen worden gekarakteriseerd door volledige atelectase van de aangetaste alveoli, longoedeem, hemorragie en necrose. Bloedingen zijn echter niet steeds aanwezig en het optreden hiervan kan gerelateerd zijn aan de blootgestelde dosis van pyrolyseproducten (Dumoncaux en Harrison, 1994; Boucher et al., 2000; Sandmeier en Coutteel, 2006; Lightfoot en Yeager, 2008; LaBonde, 2012; Shuster et al., 2012) (Figuur 2). Ook een vernauwing van de lumina van de tertiaire bronchioli met verdikte gladde spieren wordt gezien, wat suggestief is voor bronchospasmen. Letsels ter hoogte van de lever kunnen voorkomen. Deze worden gekenmerkt door leverstuwung, degeneratieve veranderingen en necrose (Blandford et al., 1975; Wells en Slocombe, 1982; Shuster et al., 2012). Bij blootstelling aan subletale doses kunnen gelijkaardige letsels gevonden worden, zij het in mildere vorm (Wells en Slocombe, 1982).

## Diagnose

De diagnose stellen van PTFE-intoxicatie bij mens of dier is vaak zeer moeilijk. Ze is meestal gebaseerd op een uitgebreide anamnese en op de klinische symptomen, aangezien specifieke testen niet beschikbaar zijn voor de meeste degradatieproducten (LaBonde, 1995; Rae, 2006). De diagnose dient ook vaak te gebeuren door uitsluiting, aangezien men zich niet bewust is van blootstelling aan aerogene toxinen. Macroscopische bevindingen bij autopsie en histopathologie bij vogels zijn vaak aspecifiek en tonen zelden toxische oorzaken aan (LaBonde, 2012).

Bij de mens kan een longfunctietest verricht worden, aangezien medische beeldvorming onvoldoende gevoelig is om milde letsels aan te tonen (Williams et al., 1974). Ook de aanwezigheid van grote hoeveelheden fluor in de urine zou een mogelijke diagnostische

merker kunnen zijn. Deze test is echter van beperkte waarde aangezien het gehalte aan fluor in de urine voornamelijk verband houdt met het water dat geconsumeerd wordt, en enkel significant stijgt bij personen die een klinische episode van PFF doorgemaakt hebben (Okawa en Polakoff, 1974).

## Differentiaaldiagnose

De initiële symptomen van intoxicatie worden vaak niet opgemerkt, waardoor meestal sprake is van acute klinische klachten of sterfte. Dit maakt het moeilijk om PTFE-intoxicatie te onderscheiden van andere intoxicaties. Bij blootstelling aan allerhande luchtverfrissers kunnen gelijkaardige symptomen gezien worden als deze bij PTFE-intoxicatie. De behandeling voor beide is echter dezelfde (Harrison et al., 2006). Ook cardiovasculaire ziekten of pulmonair trombo-embolisme kunnen verward worden met de inhalatie van PTFE-afbraakproducten (Jankowski, 2012). Inhalatie van rook na een brand of rook van uitlaatgassen, ammoniak of CO, kunnen eveneens gelijkaardige symptomen geven (Lightfoot en Yeager, 2008).

## Therapie en prognose

Aangezien sterfte bij vogels na inhalatie snel optreedt, dient onmiddellijk gehandeld te worden. Verdere blootstelling aan het toxisch agens dient te allen tijde vermeden te worden (LaBonde, 1995); de bron van de intoxicatie, in veel gevallen een anti-aanbakpan, dient verwijderd te worden (Dorrestein, 2006, laatst geraadpleegd op 27/09/15). Verdere therapie is symptomatisch aangezien geen antidoot beschikbaar is (Tabel 2). Het is van groot belang de patiënt warm te houden om bronchopneumonie en shock te ver-

mijden (Dumonceaux en Harrison, 1994; LaBonde, 1995; Jankowski, 2012).

De prognose van PTFE-intoxicatie is doorgaans slecht (Harrison et al., 2006; Richardson, 2006; Lightfoot en Yeager, 2008). De dieren sterven meestal binnen de twaalf uur na blootstelling maar nog vaker treedt plotse sterfte op (Jankowski, 2012).

## Preventie

Uit voorzorg kan men het beste geen vogels houden in ruimten waar gekookt wordt. Ook andere elektronische of warmteproducerende toestellen dienen nagekeken te worden op onderdelen die mogelijk PTFE bevatten. Daarnaast kan de ventilatie verbeterd worden door ramen en deuren te openen of de dieren naar buiten te brengen bij een vermoedelijke intoxicatie (Boucher et al., 2000; Dorrestein, 2006, laatst geraadpleegd op 27/09/15; Jankowski, 2012; Shuster et al., 2012). Tocht in de nabijheid van vogels moet echter steeds vermeden worden.

Verschillende bronnen vermelden dat bij normaal gebruik van de pannen onvoldoende hoge temperaturen bereikt worden om volledige pyrolyse van de PTFE-laag te bekomen (Forbes en Jones, 1997; Poppena en Tawde, 2012). Volgens een andere bron worden bij normaal gebruik temperaturen bereikt die kunnen oplopen tot 195-300°C, wat verantwoordelijk zou kunnen zijn voor partiële degradatie (Anoniem, 1972; Griffith et al., 1973).

Naast de thermale degradatie van PTFE wijst recent onderzoek op de risico's van het gebruik van perfluorooctaanzuur (PFOA) in de productie van anti-aanbakpannen. Deze stof zou in kleine hoeveelheden kunnen vrijkomen bij het verhitten en/of beschadigen van PTFE-producten en schadelijk zijn voor mens en dier. Verder onderzoek is nodig om de impact van PFOA na te gaan. Tot op heden is er geen officieel

**Tabel 2. Symptomatische therapie na een polytetrafluorethyleen-intoxicatie bij vogels (LaBonde, 1995; Harrison et al., 2006; Richardson, 2006; Lightfoot en Yeager, 2008; Jankowski, 2012; Yao en Eskandari, 2012).**

Geneesmiddel/Therapie	Dosis	Doel
Zuurstof	40-50% initieel	Bij dyspneu Bij voorkeur zuurstofkooi
Vloeistof (Ringerlactaat)	Onderhoud: 50 mL/kg/d subcutaan	Dehydratatie tegengaan; 50% van de verliezen corrigeren over 12-24 uur, resterende 50% over volgende 48 uur
Aminofylline	10 mg/kg IV (nadien eventueel PO)	Bronchodilaterend
Terbutaline	0,1 mg/kg PO q 12-24 uur	Bronchodilaterend
Theofylline	2 mg/kg PO q 12 uur	Bronchodilaterend
Furosemide	0,15 mg/kg IM q 8 uur of 1-2 mg/kg PO q 24 uur	Diureticum bij longoedeem
Meloxicam	0,2 mg/kg PO q 12 uur	Pijnbestrijding
Amoxicilline, enrofloxacin		Bij secundaire infecties
Dexamethasone- natriumfosfaat	0,8 mg/kg IV eenmalig	Eenmalige toediening zou de prognose verbeteren

IV: intraveneus; PO: per oraal; IM: intramusculair



verbod op het gebruik van PFOA, maar de grote producenten van PTFE hebben een vrijwillig akkoord getekend om PFOA uit de productie te bannen (Europees Parlement, 2009, laatst geraadpleegd op 27/09/15).

## CONCLUSIE

Het gebruik van PTFE-materialen in de aanwezigheid van vogels vormt een gevaar voor de gezondheid van deze dieren. Door hun hoge gevoeligheid treedt sterfte snel op. Aangezien bijkomende klinische symptomen vaak specifiek zijn en de diagnose moeilijk gesteld kan worden, is PTFE-intoxicatie waarschijnlijk een onderschatte aandoening. Enkel een symptomatische therapie is mogelijk. Bij producten die PTFE of een afgeleid product hiervan bevatten, zou dit op de verpakking zeer duidelijk moeten vermeld worden met een waarschuwing voornamelijk gericht naar vogels.

## REFERENTIES

- Anoniem (1972). Polymer-fume fever. *The Lancet* 300, 27–28.
- Baker B. B., Kasprzak D. J. (1993). Thermal degradation of commercial fluoropolymers in air. *Polymer Degradation and Stability* 42, 181–188.
- Blandford T. B., Seamon P. J., Hughes R., Pattison M., Wilderspin M. P. (1975). A case of polytetrafluoroethylene poisoning in cockatiels accompanied by polymer fume fever in the owner. *The Veterinary Record* 96, 175–176.
- Blumm J., Lindemann A., Meyer M., Strasser C. (2008). Characterization of PTFE using advanced thermal analysis techniques. *International Journal of Thermophysics* 31, 1919–1927.
- Boucher M., Ehmler T. J., Bermudez A. J. (2000). Polytetrafluoroethylene gas intoxication in broiler chickens. *Avian Diseases* 44, 449–453.
- Bracco D., Favre J.-B. (1998). Pulmonary injury after ski wax inhalation exposure. *Annals of Emergency Medicine* 32, 616–619.
- Casteleyn C., Scheers J., Simoens P., Van den Broeck W. (2011). Respiratie bij vogels: een functioneel-anatomische benadering. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 80, 3–14.
- Dorrestein G. M. (2006). Een gevaarlijke tijd voor gezelschapsvogels! Casus. *Diagnostisch Laboratorium NOIVBD*.
- Dumoncaux G., Harrison G. J. (1994). Toxins. In: Ritchie B. W., Harrison G. J., Harrison L. R. (editors). *Avian Medicine: Principles and Applications*. Wingers Publishing, Florida, p. 1030–1052.
- Europees parlement (2009). <http://www.europarl.europa.eu/sides/getAllAnswers.do?reference=E-2008-6454&language=NL>.
- Forbes N. A., Jones D. (1997). PTFE toxicity in birds. *Veterinary Record* 140, 512.
- García A. N., Viciano N., Font R. (2007). Products obtained in the fuel-rich combustion of PTFE at high temperature. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 80, 85–91.
- Greenberg M. I., Vearrier D. (2015). Metal fume fever and polymer fume fever. *Clinical Toxicology* 53, 195–203.
- Griffith F. D., Stephens S. S., Tayfun F. O. (1973). Exposure of Japanese quail and parakeets to the pyrolysis products of fry pans coated with Teflon® and common cooking oils. *American Industrial Hygiene Association Journal* 34, 176.
- Harrison G. J., Lightfoot T. L., Flinchum G. B. (2006). Emergency and critical care. In: Harrison G. J., Lightfoot T. (editors). *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Florida, p. 213–232.
- Jankowski G. R. (2012). Polytetrafluoroethylene (Teflon) toxicity. In: Mayer J., Donnelly T. M. (editors). *Clinical Veterinary Advisor: Birds and Exotic Pets*. Elsevier, Missouri, p. 221.
- Johnston C. J., Finkelstein J. N., Gelein R., Baggs R., Oberdörster G. (1996). Characterization of the early pulmonary inflammatory response associated with PTFE fume exposure. *Toxicology and Applied Pharmacology* 140, 154–163.
- Khedkar J., Negulescu I., Meletis E. I. (2002). Sliding wear behavior of PTFE composites. *Wear* 252, 361–369.
- LaBonde J. (1995). Toxicity in pet avian patients. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 4, 23–31.
- LaBonde J. J. (2012). Poisoning in the avian patient. In: Peterson M. E., Talcott P. A. (editors). *Small Animal Toxicology*. 3rd Edition, Elsevier, Missouri, p. 259–273.
- Lightfoot T. L., Yeager J. M. (2008). Pet bird toxicity and related environmental concerns. *Veterinary Clinics of North America - Exotic Animal Practice II*, 229–259.
- Odochian L., Moldoveanu C., Mocanu A. M., Carja G. (2011). Contributions to the thermal degradation mechanism under nitrogen atmosphere of PTFE by TG-FTIR analysis. Influence of the additive nature. *Thermochimica Acta* 526, 205–212.
- Okawa M. T., Polakoff P. L. (1974). Occupational health case reports - No. 7. *Journal of Occupational Medicine* 16, 350–355.
- Poppenga R. H., Tawde S. (2012). Avian toxicology. In: Gupta R. C. (editor). *Veterinary Toxicology: Basic and Clinical Principles*. 2nd Edition, Academic Press, p. 856–886.
- Rae M. A. (2006). Diagnostic value of necropsy. In: Harrison G. J., Lightfoot T. (editors). *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Florida, p. 661–678.
- Richardson J. A. (2006). Implications of toxic substances in clinical disorders. In: Harrison G. J., Lightfoot T. (editors). *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Florida, p. 711–719.
- Sandmeier P., Coutteel P. (2006). Management of canaries, finches and mynahs. In: Harrison G. J., Lightfoot T. (editors). *Clinical Avian Medicine*. Spix Publishing, Florida, p. 879–913.
- Shuster K. A., Brock K. L., Dysko R. C., DiRita V. J., Bergin I. L. (2012). Polytetrafluoroethylene toxicosis in recently hatched chickens (*Gallus domesticus*). *Comparative Medicine* 62, 49–52.
- Silver M. J., Young D. K. (1993). Acute noncardiogenic pulmonary edema due to polymer fume fever. *Cleveland Clinic Journal of Medicine* 60, 479–482.
- Tanaike O., Yoshizawa N., Hatori H., Yamada Y. (2002). Porous carbons derived from PTFE defluorinated with alkali metals. *Fuel Chemistry Division Preprints* 47, 468–469.
- Thomas P. (1998). The use of fluoropolymers for non-stick

- cooking utensils. *Surface Coatings International* 81, 604-609.
- Tsai P. J., Guo Y. L., Chen J. L., Shieh H. Y. (2000). An integrated approach to initiate preventive strategies for workers exposed to Teflon pyrolytic gases in a plastic industry. *Journal of Occupational Health* 42, 297-303.
- Waritz R. S. (1975). An industrial approach to evaluation of pyrolysis and combustion hazards. *Environmental Health Perspectives* 11, 197-202.
- Wells R. E., Slocombe R. F., Trapp A. L. (1982). Acute toxicosis of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) caused by pyrolysis products from heated polytetrafluoroethylene: clinical study. *American Journal of Veterinary Research* 43, 1238-1242.
- Wells R. E., Slocombe R. F. (1982). Acute toxicosis of budgerigars (*Melopsittacus undulatus*) caused by pyrolysis products from heated polytetrafluoroethylene: microscopic study. *American Journal of Veterinary Research* 43, 1243-1248.
- Williams N., Atkinson G. W., Patchefsky A. S. (1974). Polymer-fume fever: not so benign. *Journal of Occupational Medicine* 16, 519-522.
- Yao J. S. T., Eskandari M. K. (2012). Accidental discovery: the polytetrafluoroethylene graft. *Surgery* 151, 126-128.
- Zanen A. L., Rietveld A. P. (1993). Inhalation trauma due to overheating in a microwave oven. *Thorax* 48, 300-302.
- Zook B. C., Malek D. E., Kenney R. A. (1983). Pathologic findings in rats following inhalation of combustion products of polytetrafluoroethylene (PTFE). *Toxicology* 26, 25-36.

Uit het verleden

## MENS EN DIER GELIJK IN DE DOOD VOLGENS DE BIJBEL

(Boek Prediker, hoofdstuk 3, vers 19)

### In vier versies van vertalingen: twee nieuwe en twee oudere.

Want de mensen en de dieren treft hetzelfde lot. Zoals een dier sterft, zo sterft ook een mens; ze delen in dezelfde adem. Dat is hun beider lot. Een mens is niet beter af dan een dier, want alles is leegte (Voorleesbijbel.nl).

Want wat den kinderen der mensen wedervaart, dat wedervaart ook den beesten; en enerlei wedervaart hun beiden; gelijk die sterft, alzo sterft deze, en zij allen hebben enerlei adem, en de uitnemendheid der mensen boven de beesten is geen; want allen zijn zij ijdelheid (Statenbijbel).

Because the fate of the sons of men and the fate of the beasts is the same. As is the death of one so is the death of the other, and all have one spirit. Man is not higher than the beasts; because all is to no purpose (Bible in Basic English).

For that which befalleth the sons of men befalleth beasts; even one thing befalleth them: as the one dieth, so dieth the other; yea, they have all one breath; and man hath no preeminence above the beasts: for all is vanity (American Standard Version).

## Treatment of acquired flexural deformity of the distal interphalangeal joint in the horse: a retrospective study of 51 cases

*Behandeling van verworven retractie van de diepe buigpees bij het paard: een retrospectieve studie van 51 gevallen*

S. Carlier, M. Oosterlinck, A. Martens, F. Pille

Department of Surgery and Anesthesiology of Domestic Animals, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, Belgium

Frederik.Pille@ugent.be

### ABSTRACT

Flexural deformity of the distal interphalangeal joint is an important disorder in horses, which can be acquired during the first year of life, often as a result of lateralization during grazing. In this retrospective study, the medical files of 51 cases presented at the Faculty of Veterinary Medicine of Ghent University (1999-2013) were analyzed, followed by a telephone questionnaire. In 65% of the conservatively treated patients, the hoof conformation corrected completely, which was not significantly different from what was seen in the surgically treated group (complete correction in 56% of cases). Foals treated conservatively before the age of six months and foals treated surgically before twelve months of age, had a significantly better chance of a successful correction than older foals. Moreover, cases in which treatment did not restore the hoof conformation completely, presented a significantly higher chance of (persisting) lameness and were significantly less likely to have an athletic career. Finally, this study proved a significant association between the hoof conformation of the dam and her foals.

### SAMENVATTING

Retractie van de diepe buigpees is een belangrijke aandoening die veulens gedurende hun eerste levensjaar kunnen verwerven ten gevolge van lateralisatie bij het grazen. In deze retrospectieve studie werden de medische dossiers geanalyseerd van 51 gevallen die behandeld werden aan de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Gent tussen 1999 en 2013. Deze analyse werd gevolgd door een telefonische enquête. Bij 65% van de conservatief behandelde dieren normaliseerde de hoefconformatie volledig, wat niet significant verschillend bleek van het percentage paarden dat een volledig herstel kende na een chirurgische behandeling (56%). Veulens die vóór de leeftijd van zes maanden een conservatieve therapie kregen en de dieren die chirurgisch werden behandeld vóór de leeftijd van twaalf maanden, hadden significant meer kans op een succesvolle correctie dan oudere veulens. Verder hadden gevallen met een onvolledige correctie van de hoefconformatie beduidend meer kans op (persisterende) kreupelheid en minder uitzicht op een sportieve carrière. Tot slot bleek uit deze studie een significante associatie tussen de hoefconformatie van het moederdier en die van haar veulens.

### INTRODUCTION

Flexural deformity of the distal interphalangeal joint in horses can occur congenitally or can be acquired later in life (Figure 2A). The latter presentation, usually seen unilaterally in the forelimb at the age of six weeks to six months (Adams and Santschi, 2000; Greet, 2000; Greet and Curtis, 2003) is associated with lateralization. In other words, horses showing a preference to consistently protract the same forelimb during foraging, which may be seen more

frequently in foals with relatively long limbs (Van Heel et al., 2006). This posture can lead to an excessive heel growth at the level of the foot placed backwards (Greet, 2000; Spoormakers et al., 2008) and ultimately, to the typical boxy hoof shape, also known as clubfoot (Adams and Santschi, 2000; Greet, 2000; Greet and Curtis, 2003).

As biomechanical loading is a crucial factor during the development of a foal for the quality and resistance of the adult musculoskeletal tissues (Van Weeren et al., 2005) and as hoof shape and limb load-

ing are linked (Oosterlinck et al., 2011), contralateral hoof asymmetry early in life may cause a reduced athletic capacity and a predisposition for overload injuries (Baxter et al., 2011). Uneven hooves have been shown to have moderate heritability (Ducro et al., 2009a) and dramatically reduce the competitive life of sport horses, especially in elite jumping (Ducro et al., 2009b).

Treatment of acquired flexural deformity of the distal interphalangeal joint can involve trimming and shoeing, medical treatment and/or surgical approaches. Mild cases of clubfoot (hoof-ground-angle less than  $90^\circ$ ) (Adams and Santschi, 2000) can be resolved by frequently trimming the heel, thus stretching the musculotendinous unit (Greet, 2000). It is essential to keep in mind that excessive trimming of the heel could cause lamellar separation (Redden, 2003). Besides trimming of the heel, glue-on shoes or a toe-composite serving both as protection and extension of the toe, can be a part of the treatment (Auer et al., 2006; Greet, 2000; O'Grady, 2012).

When after trimming, the horse is painful or when the heels are not making contact with the ground, it might be necessary to temporarily elevate the heel by a wedge until the horse is comfortable (Floyd, 2007).

Secondly, analgesia should always be included in the treatment, since pain is a factor that contributes to the contraction of the deep digital flexor tendon (DDFT) (Kidd and Barr, 2002). Furthermore, oxytetracycline can be used as an additional treatment to facilitate the muscle and tendon relaxation (Hunt, 2011), although this may be most successful in neonates (Arnoczky et al., 2004).

In more severe cases (hoof-ground angle greater than  $90^\circ$ ) or cases not responding to conservative treatment, surgical intervention should be considered (Adams and Santschi, 2000). Most often, desmotomy of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon (AL-DDFT) is performed. This can be accomplished by a standard open approach (Auer, 2006), or by a minimal invasive approach (Tnibar, 2010). Severely affected patients with a hoof-ground angle of  $115^\circ$  or greater, may require more drastic measures such as deep digital flexor tenotomy, usually precluding a future sport career (Adams and Santschi, 2000). Similar to what was described for the non-surgical approach, surgical treatment should be combined with analgesia, correction of the hoof conformation and if necessary, protection of the toe (Auer et al., 2006).

If adequate treatment is delayed, several complications may arise. Severe hoof wall deformation, such as contracted heels, can occur and the increased pressure on the toe may lead to bruising, necrosis and secondary infection. Moreover, the abnormal pressure distribution at the level of the apex of the third phalanx may result in modelling, lipping and/or bone demineralization (Redden, 2003).

The aim of this retrospective study is to report the long-term outcome after surgical and non-surgical treatment of unilateral acquired flexural deformity of



**Figure 1.** Peroperative image of a desmectomy of the AL-DDFT (\* distal and ° proximal part of the AL-DDFT, ↔: gap).

the distal interphalangeal joint, with special attention to functional and cosmetic aspects, and the possible heritability of this condition.

## MATERIALS AND METHODS

### Cases

This study included medical records of patients with acquired flexural deformity of the distal interphalangeal joint, presented to the Faculty of Veterinary Medicine of Ghent University, between January 1999 and December 2013.

Relevant information retrieved from the medical records included: current age and age at admission, gender, breed, clinical and (if available) radiographic findings, diagnosis and treatment. Exclusion criteria were bilaterally affected cases and patients younger than three weeks.

The patients were divided into age groups (younger versus older than six months; younger and older than twelve months). This classification was based on a previous study evaluating the outcome of distal check ligament desmotomy (Wagner et al., 1985).

### Treatment

The cases were divided into a conservatively and a surgically treated group. In the authors' institution, the choice for a conservative versus a surgical approach has always depended on the severity of the deformity, the response to previous conservative management (if

applicable) and finally, the owner's agreement with the treatment plan.

As described in the introduction, conservative treatment included trimming of the heels, protection of the toe or reconstruction and analgesic medication.

In all but two cases, surgical treatment consisted of a desmectomy (= removal of a 2 cm portion) of the AL-DDFT under general anesthesia (Figure 1), which would give a slower fibroplasia and thus allow more time for correction of the conformation (Eliashar, 2005). In two cases, a DDFT tenotomy was performed. In one of these cases, the tenotomy was performed at the level of the pastern, whereas the second one was accomplished mid-metacarpus.

The postoperative treatment consisted of trimming of the heels and, if necessary, application of toe protection (Figure 2B). Furthermore, non-steroidal, anti-inflammatory drugs (mostly flunixin meglumin) were administered for an average time of five days (median 4; range 1-8). The incision was protected by a bandage during 14 days.

### Follow-up

Follow-up was done by telephone questionnaire. This included questions regarding the evolution of the hoof conformation, the horse's gait after treatment, and in surgical cases, the healing of the incision. Secondly, information was obtained regarding the athletic performance of the horse after treatment and, if applicable, its competition level. Horses were considered to have an athletic career if they were performing at national or international level.

Furthermore, information was acquired on the hoof conformation of the dam and her progeny (pluriparous dams).

### Statistical analysis

Data were collected and prepared for analysis using Microsoft Office Excel 2008. Statistical analysis was done with Instat Software (Instat3, Graphpad, La

Jolla, CA, USA) with statistical significance set at  $P < 0.05$ .

The associations between the outcome and the age on presentation (before versus after six months, before versus after twelve months), the outcome and the type of treatment (conservative versus surgical), the conformation and presence of lameness and the conformation of the patient and the dam were examined using Fisher's Exact test. Shapiro-Wilk test, Q-Q plots and Kolmogorov-Smirnov test were used to evaluate whether or not data showed significant deviation from normal distribution. Normally distributed data are presented as mean  $\pm$  standard deviation (SD), while non-parametric data are presented as median [range].

## RESULTS

### Case details

Fifty-one cases were included in this study (29 mares and 22 stallions), with a median age at admission of four months (range 1-58 months). The majority were warmbloods (46/51). Forty-four cases were twelve months of age or younger (median age four months, range 1-12 months) and seven were older (median age 22 months, range 14-58 months).

Sixty-three percent of the cases (32/51) were diagnosed with a flexural deformity at the level of the right forelimb. Twenty-six of all cases (51%) were treated conservatively and in 25 cases (49%), surgery was the treatment of choice.

### Outcome

Follow-up information was available for all cases included in this study. The mean duration of follow-up was seven years (range 9-168 months). In Table 1, the most important outcome variables are summarized.

Overall, there was a high degree of client satisfaction after treatment. Based on the telephone questionnaire, 21/26 (81%) of the owners of the conserva-



**Figure 2.** Even in severe cases of flexural deformity of the distal interphalangeal joint (A), correction of hoof conformation a few days after desmectomy of the AL-DDFT can be achieved (in this picture, combined with an extension and reconstruction of the toe with composite (Superfast™, Vettec, USA) (B).

tively treated patients and 19/25 (76%) of the surgically treated cases were satisfied with the outcome, resulting in an overall satisfaction rate of 78% (40/51).

### *Conservative treatment*

Based on the information provided by the owners, 65% (17/26) of the conservatively treated patients had a complete correction of hoof conformation. There was a significant association between the correction of hoof conformation and the age of the foal at the time of treatment ( $P=0.035$ ). A foal was nearly 13 times more likely to obtain complete correction of hoof conformation when treated before six months of age than after six months of age (odds ratio (OR) 12.80; 95% confidence interval (CI) 1.15-142.66). However, when comparing the groups  $\leq$  twelve months versus  $>$  twelve months of age, there was no significant association between the age of treatment and the correction obtained. Three of the nine patients with incomplete correction of hoof conformation were older cases; two of them were even older than four years when admitted at the clinic.

Owners declared 81% of the conservatively treated patients (21/26) to be sound. Lameness was significantly associated with the correction of hoof conformation ( $P=0.0019$ ). Horses with incomplete hoof correction were 43 times more likely to develop lameness (OR 42.78; 95%CI 1.98-926.67).

At the moment of the questionnaire, 18 of the conservatively treated horses had reached the age to perform (minimum age of three years old). Fourteen of them (78%) were used as a riding horse, 71% of which (10 horses) were performing at national or international level. The group of riding horses included all of the cases with a fully corrected conformation (10 horses) and four of the eight cases (50%) with incomplete correction. The other four horses with incomplete correction of their hoof conformation did not seem fit to ride and were merely kept on pasture.

### *Surgical treatment*

According to the owners, 14 of the 25 surgically treated cases (56%) achieved full correction of hoof conformation, which is not significantly different from the conservatively treated cases ( $P=0.5725$ ). There was a significant association between the degree of correction and the age at the time of treatment ( $\leq$  twelve months versus  $>$  twelve months) ( $P=0.026$ ). Patients undergoing surgery  $\leq$  twelve months of age had a 17 times greater chance of full correction of hoof conformation (OR 17.40; 95%CI 0.82-368.36) than those undergoing surgery at a later age. However, this association was not present when comparing foals that underwent surgery at  $\leq$  six months versus  $>$  six months of age.

Although complete correction of hoof conformation was not always achieved after surgery, 72% of the

horses (18/25) were considered sound by the owner. In two of the lame horses, a DDFT-tenotomy had been performed, one of which was previously treated with a desmectomy of the AL-DDFT. There was a significant association between the correction of hoof conformation and the presence of lameness ( $P=0.0213$ ). Horses without full correction of hoof conformation were 16 times more likely to develop lameness (OR 15.60; 95%CI 1.48-164.47).

Also in the surgically treated group, 17 horses had reached the age to perform at the moment of the questionnaire. Fifteen of them (88%) were used as a riding horse, including all horses with a fully corrected hoof conformation (eleven horses) and four of the six horses (67%) with an incomplete correction. Ten of these 15 riding horses (67%) were performing at a national or international competitive level, the vast majority of which (8/10) presented a fully corrected hoof conformation. Two horses were not considered fit for riding; one of them had been treated with a DDFT-tenotomy and one horse was eliminated at high-level endurance, although it is unknown if this was actually due to the slightly steeper foot.

No serious problems were encountered with wound healing related to the desmectomy. Nevertheless, residual swelling (9/23), a scar (2/23) or white discoloration of hairs (3/23) were observed, resulting in cosmetic flaws in about 50% of the horses. There was no significant association between the formation of scar tissue and age.

### **Damline and progeny**

Based on the information provided by the owners, 20% (10/51) of the patients had a dam with a contralateral hoof asymmetry.

In 27% (11/42) of pluriparous dams in this study, the mare had given birth to several other foals that developed a flexural deformity of the distal interphalangeal joint. In the sample of pluriparous dams, there was a significant association between the presence of hoof unevenness in the dam and in her progeny ( $P=0.0028$ ). Foals from a dam with clubfoot had a 25 times greater chance to develop a clubfoot than foals from a dam with a normal hoof conformation (OR 25.00; 95%CI 2.46-254.30).

### **DISCUSSION**

This retrospective study included 51 cases treated for acquired flexural deformity of the distal interphalangeal joint. Most of the horses presented acquired flexural deformity of the right forelimb, which is in agreement with the observation that most non-ambidextrous horses have a preference to protract the left limb (Warren-Smith and McGreevy, 20120).

A similar proportion of the cases were treated sur-

**Table 1. Most important outcome parameters for the two different treatments. No statistical associations were found between the type of treatment and the outcome.**

	Conservative	Surgical	P-value
Correct hoof conformation	17/26 (65%)	14/25 (56%)	0.5725
Absence of lameness	21/26 (81%)	18/25 (72%)	0.5230
Riding horses (horses > 3 yrs old)	14/18 (78%)	15/17 (88%)	0.6581
Riding horses used for (inter)national competition	10/14 (71%)	10/15 (67%)	1.000
Owner satisfaction	21/26 (81%)	19/25 (76%)	0.7432

gically and non-surgically, and long-term follow-up was obtained by telephone questionnaire. The success rate for the surgical and the non-surgical correction of the abnormal hoof conformation was moderate (56% and 65%, respectively). However, the functional success was higher as there were also horses with incomplete correction that were sound and/or were used as a riding horse. Based on the results of the present study, the prognosis for competition seems good when full correction of hoof conformation can be achieved. About two thirds of the riding horses were able to compete, whereas it must be noted that some horses may not be in competition for reasons other than poor response to treatment of the flexural deformity. Last but not least, with an overall satisfaction rate of 78%, both the results of the conservative and the surgical treatment were highly appreciated by the owners.

Clearly, it was not the primary goal of this study to directly compare the success rates of the surgical and non-surgical treatment since in a retrospective study, treatment cannot be organized randomly but is tailored to each individual case according to its history and the severity of the deformity.

As a limitation of the study, no objective measurements were performed to quantify the severity of the deformity and the degree of correction, which can have a certain influence on the outcome results. It can be assumed that mild cases were treated conservatively, whereas more severe cases or cases not responding to conservative treatment, were treated surgically. Nevertheless, there was no significant difference in outcome between the two types of treatment.

The results of the present study show that the age of the patient, and thus the chronicity of the deformity, significantly affects the success of treatment. In patients treated non-surgically, conservative management at an age  $\leq$  six months results in a better prognosis than in older patients. In the surgically treated group, the window of opportunity for treatment is wider, with significantly better results in patients

treated  $\leq$  twelve months than in older horses. These findings should encourage veterinarians, farriers and owners not to delay treatment after a flexural deformity of the distal interphalangeal joint has been diagnosed. Especially the non-surgical treatment should be performed early enough ( $<$  six months), whereas there seems to be a bit more time to perform surgical treatment, provided that no complications, such as contracted heels, develop. Although the success rate has been reported to decrease with increasing duration of symptoms, some chronic cases can still be treated successfully (Yiannikouris et al., 2011).

Achieving full correction is important and the results of the present study are in agreement with other studies stating that persisting contra-lateral hoof unevenness is associated with lameness (Baxter et al., 2011; Ross and Dyson, 2003). Furthermore, Oosterlinck et al. (2011) demonstrated that even in clinically sound ponies with symmetrical hooves, a hoof with a smaller contact area (e.g. a more upright hoof with contracted heels and a concave sole) is loaded less compared to a hoof with a larger contact area (e.g. hoof with low, spread heels and a flat sole).

Cosmetic healing of the wound was not perfect in about 50% of the surgically treated cases. Although low numbers precluded statistical analysis, suture material may play a role herein. All horses with a continuous polyglyconate monofilament (Maxon™, Covidien, Ireland) suture had a perfect cosmetic outcome whereas at least six cases closed with a continuous polyglactin 910 (Vicryl™, Ethicon) suture presented residual swelling at the moment of the questionnaire.

This study showed that there was a significant association between the development of flexural deformity of the distal interphalangeal joint of the dam and her progeny. Although this finding in a sample of 42 (pluriparous) cases needs to be confirmed in larger studies, the hereditary aspect may influence breeding policies. The observed association is in agreement with the study of Ducro (2009a), which showed

a moderate but significant heritability of heel height and hoof shape. Furthermore, it has been demonstrated that horses with a small head and relatively long legs, would be more prone to develop uneven feet (Van Heel et al., 2006). This conformation is dominantly present amongst modern warmblood foals.

## CONCLUSION

The results of the present study show that conservative treatment performed before the age of six months and surgical treatment performed before the age of twelve months result in the best chance for complete correction of a clubfoot. Furthermore, a significant association was found between the degree of correction and the soundness of the horse at later age. With an overall satisfaction rate of 78%, both the conservative and the surgical treatment were highly appreciated by the owners and both treatments resulted in a similarly high proportion of riding horses that were able to compete (around 70%). For breeders, it is important to realize that flexural deformity of the distal interphalangeal joint seems to be heritable by the damline at least.

## REFERENCES

- Adams S.B., Santschi E.M. (2000). Management of congenital and acquired limb deformities. In: *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Annual convention of the American Association of Equine Practitioners (2000)*, 117-125
- Arnoczky S.P., Lavagnino M., Gardner K.L., Tian T., Vaupeel Z.M., Stick J.A. (2004). In vitro effects of oxytetracycline on matrix metalloproteinase-1 mRNA expression and on collagen gel contraction by cultured myofibroblasts obtained from the accessory ligament of foals. *American Journal of Veterinary Research* 65, 491-496
- Auer J.A. (2006). Diagnosis and treatment of flexural limb deformities in foals. *Clinical Techniques in Equine Practice* 5, 282-295
- Baxter G.M., Stashak T.S., Hill C. (2011). Conformation and movement. In: Baxter G.M. (editor). *Adams and Stashak's Lameness in Horses*. 6th Edition, Wiley-Blackwell, Philadelphia, 73-108
- Ducro B.J., Bovenhuis H., Back W. (2009a). Heritability of foot conformation and its relationship to sports performance in a Dutch Warmblood horse population. *Equine Veterinary Journal* 41, 139-143
- Ducro B.J., Gorissen B., Van Eldik P., Back W. (2009b). Influence of foot conformation on duration of competitive life in a Dutch Warmblood horse population. *Equine Veterinary Journal* 41, 144-148
- Eliashar E., Dyson S.J., Archer R.M., Singer E.R., Smith R.K.W. (2005). Two clinical manifestations of desmotomy of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon in the hindlimb of 23 horses. *Equine Veterinary Journal* 37, 495-500
- Floyd A. E. (2007). Deformities of the limb and their relevance to the foot. In: Floyd A.E., Mansmann R.A. (editors). *Equine Podiatry*. Elsevier Saunders, Philadelphia, 205-223
- Greet T.R.C. (2000). Managing flexural and angular limb deformities: a newmarket perspective. In: *Proceedings of the 46<sup>th</sup> Annual convention of the American Association of Equine Practitioners (2000)*, 130-136
- Greet T.R.C., Curtis S.J. (2003). Foot management in the foal and weanling. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 19, 501-517
- Hunt R.J. (2011). Flexural limb deformities in foals. In: Ross M.W., Dyson S.J. (editors). *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. W.B. Saunders, Philadelphia, 645-649
- Kidd J.A., Barr A.R.S. (2002). Flexural deformities in foals. *Equine Veterinary Education* 14, 311-321
- Medland S.E., Duffy D.L., Wright M.J., Geffen G.M., Hay D.A., Levy F., Van-Beijsterveldt C.E.M., Willemsen G., Townsend G.C., White V., Hewitt A.W., Mackey D.A., Bailey J.M., Slutske W.S., Nyholt D.R., Treloar S.A., Martin N.G., Boomsma D.I. (2009). Genetic influences on handedness: Data from 25,732 Australian and Dutch twin families. *Neuropsychologia* 47, 330-337
- O'Grady S.E. (2012). Flexural deformities of the distal interphalangeal joint (clubfeet). *Equine Veterinary Education* 24, 260-268
- Oosterlinck M., Pille F., Back W., Dewulf J., Gasthuys F. (2011). A pressure plate study on fore and hindlimb loading and the association with hoof contact area in sound ponies at the walk and trot. *The Veterinary Journal* 190, 71-76
- Redden R. F. (2003). Hoof capsule distortion: understanding the mechanisms as a basis for rational management. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 19, 443-462
- Ross M.W., Dyson S.J. (2003). The foot and shoeing. In: Ross M.W., Dyson S.J. (editors). *Diagnosis and Management of Lameness in the Horse*. 1st Edition, W.B. Saunders, St.-Louis, 250-275
- Spoormakers T.J.P., de Vries A., van Muiswinkel K., ter Braake F. (2008). Flexural deformity of the distal interphalangeal joint in the horse: results of 53 desmotomies in 40 foals. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 77, 299-306
- Tnibar A. (2010). Desmotomy of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon in horses: an update. *Journal of Equine Veterinary Science* 30, 715-719
- Yiannikouris S., Schneider R., Sampson S., Roberts G. (2011). Desmotomy of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon in the forelimbs of 24 horses 2 years and older. *Veterinary Surgery* 40, 272-276
- Van Heel M.C., Kroekenstoel A.M., van Dierendonck M.C., van Weeren P.R., Back W. (2006). Uneven feet in a foal may develop as a consequence of lateral grazing behaviour induced by conformational traits. *Equine Veterinary Journal* 38, 646-651
- Van Weeren P.R., Firth E.C., Brama P.A.J. (2010). To move or to perish: the importance of exercise during musculoskeletal development. *Pferdeheilkunde* 26, 581-587
- Wagner P.C., Grant B.D., Kaneps A.J., Watrous B.J. (1985). Long-term results of desmotomy of the accessory ligament of the deep digital flexor tendon (distal check ligament) in horses. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 187 (12), 1351-1353
- Warren-Smith A., McGreevy P. (2010). The use of pedometers to estimate motor laterality in grazing horses. *Journal of Veterinary Behaviour* 5, 177-179



## Evaluatie van de mini-FLOTAC-methode voor de detectie van gastro-intestinale parasieten bij grote huisdieren

### *Evaluation of the mini-FLOTAC technique for detection of gastro-intestinal parasites in large companion animals*

N. Van den Putte, E. Claerebout, B. Levecke

Vakgroep Virologie, Parasitologie en Immunologie  
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, België

Niels.VandenPutte@UGent.be

## SAMENVATTING

Voor de microscopische diagnose van gastro-intestinale parasieten bij grote huisdieren werd recent een nieuwe techniek ontwikkeld, de mini-FLOTAC. In deze vergelijkende studie van diagnostische technieken werd de mini-FLOTAC vergeleken met de standaard McMaster-techniek op basis van de detectie (gevoeligheid) en kwantificatie (aantal oöcysten/eieren per gram mest (OPG/EPG)) van parasitaire infecties bij grote huisdieren en de tijd die nodig is om een diagnose te stellen. In totaal werden honderd meststalen (78 paarden, 11 runderen, 6 schapen en 5 geiten) onderzocht met beide technieken. Mini-FLOTAC was gevoeliger dan McMaster, maar er was een zeer hoge correlatie in eieren per gram (EPG) feces (correlatiecoëfficiënt = 0,90,  $p < 0,001$ ). De benodigde tijdsduur voor het onderzoeken van stalen met de mini-FLOTAC-techniek (13 minuten) lag significant hoger ( $p < 0,05$ ) dan de tijd die nodig was met de McMaster-techniek (6 minuten). Dit verschil in tijdsduur was eveneens afhankelijk van de bekomen EPG-waarde, waarbij het tijdsverschil tussen beide technieken nog sterk vergrootte voor hogere waarden. Er kan geconcludeerd worden dat de mini-FLOTAC-techniek het beste gebruikt kan worden wanneer een accurate diagnose van een lage besmettingsgraad nodig is, bijvoorbeeld voor de detectie van anthelminthicumresistentie. In andere gevallen kan de voorkeur worden gegeven aan de snellere McMaster-methode.

## ABSTRACT

A new technique, mini-FLOTAC, has recently been developed for the microscopic diagnosis of infections with gastro-intestinal nematodes in domestic animals. In this comparative study of diagnostic techniques, the mini-FLOTAC technique was compared to the commonly used McMaster technique for the detection and quantification of gastro-intestinal parasites in livestock as well as for the evaluation of the time needed to perform the assays. One hundred fecal samples (78 horses, 11 bovines, 6 sheep and 5 goats) were examined with both the mini-FLOTAC and McMaster technique. This revealed that more infections with gastro-intestinal parasites could be diagnosed with the mini-FLOTAC technique than with the McMaster technique, but the comparative study also showed a very high correlation (correlation coefficient = 0.90,  $p < 0.001$ ) between both techniques regarding the number of eggs per gram feces (EPG) detected. The time needed to examine the samples with the mini-FLOTAC technique (13 minutes) was significantly higher ( $P < 0.05$ ) than the time needed with the McMaster technique (6 minutes). This difference in time also depended on the observed EPG value, as with high EPG values, the difference in time between both techniques increased even more. In conclusion, the mini-FLOTAC technique can be preferred when an accurate diagnosis of a low infection level is necessary, e.g. to detect anthelmintic resistance. In other circumstances, the faster McMaster technique can be considered as the preferable technique.

## INLEIDING

Besmettingen met maagdarmparasieten zijn veel voorkomend bij grote huisdieren. Deze besmettingen hebben een invloed op zowel de gezondheid als de productiecapaciteit van deze dieren en worden vooral bestreden door middel van antiparasitaire behandelingen (Morgan et al. 2005). Deze infecties worden momenteel voornamelijk gediagnosticeerd aan de hand van coprologisch onderzoek. Dit onderzoek dient kwantitatief te gebeuren omdat de meeste grote huisdieren besmet zijn met een laag aantal maagdarmparasieten en deze subklinische besmettingen vaak geen economische impact hebben. Deze lage besmettingen zijn wel belangrijk in het kader van anthelminthicumresistentie. Wanneer ze kort na een antiparasitaire behandeling worden gediagnosticeerd, kunnen ze namelijk wijzen op een beginnende resistentie tegen een bepaald anthelminthicum (Rinaldi et al., 2014).

De McMaster-techniek wordt momenteel het frequentst aangewend voor deze kwantitatieve diagnostiek. De nadelen van deze techniek zijn echter haar lage gevoeligheid, waardoor een lage besmettingsgraad kan worden gemist, en de lage precisie waarmee de eitellingen worden uitgevoerd (Rinaldi et al., 2014). Om aan deze lage gevoeligheid te verhelpen werd door Cringoli et al. (2012) de mini-FLOTAC-techniek ontwikkeld. Deze nieuwe techniek is afgeleid van de FLOTAC-techniek, maar is gebruiksvriendelijker, omdat er geen centrifugatie nodig is. Bovendien heeft ze een hogere gevoeligheid dan de McMaster-techniek (Cringoli et al., 2010).

In deze studie wordt een vergelijking gemaakt tussen twee diagnostische technieken, de McMaster- en mini-FLOTAC-techniek, en dit zowel op basis van de gevoeligheid van beide technieken als op basis van de tijdsduur nodig om beide uit te voeren. Op basis van de resultaten van deze vergelijking kan vervolgens een aanbeveling tot gebruik van beide technieken geformuleerd worden.

## MATERIALEN EN METHODEN

### Meststalen

Voor deze studie werd gebruik gemaakt van meststalen van grote huisdieren (paarden, runderen, geiten en schapen) aangeboden aan het Laboratorium van Parasitologie van de Faculteit Diergeneeskunde te Merelbeke (UGent) tussen september 2014 en maart 2015. Deze stalen werden doorgestuurd door dierenartsen zowel binnen (kliniek Inwendige Ziekten van de Grote Huisdieren) als buiten de Faculteit Diergeneeskunde. In totaal werden honderd individuele meststalen onderzocht, waarvan 78 paarden, 11 runderen, 6 schapen en 5 geiten. Deze staalnamegrootte is gebaseerd op het aantal stalen dat binnen voornoemde studieperiode individueel kon worden onderzocht.

## Parasitologisch onderzoek

Ieder staal werd op dezelfde dag onderzocht aan de hand van de McMaster- en de mini-FLOTAC-techniek door eenzelfde persoon. Aanvullend werd ook de tijdsduur nagegaan voor het maken van een diagnose voor ieder van de twee technieken.

### McMaster

De McMaster werd uitgevoerd zoals beschreven door El-Abdellati (2010) en kan worden opgesplitst in vijf opeenvolgende stappen. Er werd eerst 4 g mest afgewogen (stap 1). Vervolgens werd deze hoeveelheid mest vermengd met 60 ml verzadigde zoutoplossing met een specifieke dichtheid van 1,24 (333 g NaCl en 200 g sucrose in 1 liter gedistilleerd water). De suspensie werd driemaal door een theezeeff gezeefd om het meeste debris te verwijderen. Vóór het vullen van iedere cel werd de suspensie gehomogeniseerd door ze tienmaal over te gieten van de ene beker in een andere. Daarna werden de twee cellen van een McMaster-telkamer gevuld met deze suspensie (stap 2). Na een periode van twee minuten (stap 3) werd het aantal oöcysten/eieren in iedere cel geteld (2 x 0,15 ml) aan de hand van een lichtmicroscop (100X vergroting) (stap 4). Finaal werd al het gebruikte materiaal gewassen, zodat een nieuw meststaal onderzocht kon worden (stap 5). Het aantal oöcysten/eieren per gram mest (OPG/EPG) werd bekomen door het getelde aantal oöcysten/eieren te vermenigvuldigen met 50. De benodigde tijd voor ieder van de vijf stappen werd afzonderlijk gemeten voor elk van de meststalen. Een visuele tutorial om een meststaal te onderzoeken met de McMaster-techniek kan worden gevonden op [www.youtube.com/watch?v=rkSGe-L4Sec](http://www.youtube.com/watch?v=rkSGe-L4Sec).

### Mini-FLOTAC

De mini-FLOTAC werd uitgevoerd zoals beschreven in de handleiding voor herbivoren (persoonlijke communicatie G. Cringoli, 2014), en bestaat uit zes opeenvolgende stappen. Allereerst werd 5 g mest afgewogen in de fill-FLOTAC (stap 1) (Figuur 1). Hieraan werd vervolgens 45 ml verzadigde zoutoplossing (cf. McMaster-techniek) toegevoegd. Na het sluiten van de fill-FLOTAC werd de mest in suspensie gebracht door een op- en neerwaartse beweging van het mengstaafje. Vervolgens werden beide cellen van de Mini-FLOTAC-telkamer (Figuur 1) gevuld onder een hoek van ongeveer 25-30°, na het homogeniseren van de suspensie (10 op- en neerwaartse bewegingen met mengstaafje) vóór het vullen van iedere cel (stap 2). Na een incubatieperiode van tien minuten (stap 3) werd de bovenste laag van de suspensie (met de oöcysten en eieren) in de mini-FLOTAC gescheiden van de onderste laag door een draaibeweging met de sleutel ('translatie') (stap 4). De oöcysten en eieren werden geteld aan de hand van een lichtmicroscop



**Figuur 1.** Links: Fill-FLOTAC; Rechts: mini-FLOTAC-telkamer. (Bron: Barda et al., 2013)

(100X vergroting) (stap 5). Finaal werd al het gebruikte materiaal gewassen zodat een nieuw meststaal onderzocht kon worden (stap 6). Het aantal oöcysten/eieren per gram mest (OPG/EPG) werd bekomen door de getelde oöcysten/eieren te vermenigvuldigen met 5. De benodigde tijd voor ieder van de zes stappen werd afzonderlijk gemeten voor elk van de meststalen. Een visuele tutorial om een meststaal te onderzoeken met de mini-FLOTAC-techniek kan worden gevonden op <https://www.youtube.com/watch?v=65Ch9PZvfxI>.

## STATISTISCHE ANALYSE

Beide technieken werden vergeleken op basis van de gevoeligheid, de oöcyst/eitellingen en de tijd nodig om een meststaal te verwerken. Omdat er geen perfecte standaardtechniek bestaat voor de diagnose van parasitaire infecties (gevoeligheid = 100% en specificiteit = 100%), werd er aangenomen dat een dier gearasiteerd was wanneer met minstens één van de twee technieken oöcysten of eieren werden gevonden (specificiteit = 100%). De sensitiviteit voor beide technieken werd bepaald voor de diagnose van een parasitaire infectie, ongeacht de soort parasiet, en voor elke parasietensoort afzonderlijk. Indien er een voldoende aantal dieren geïnfecteerd was ( $n > 50$ ), werd ook de impact van de intensiteit van infectie op de gevoeligheid nagegaan. Hiervoor werd de sensitiviteit bepaald over verschillende niveaus van oöcyst/ei-uitscheiding (1-50 OPG/EPG; 51-99 OPG/EPG;

100-149 OPG/EPG;  $\geq 150$  OPG/EPG), waarbij de oöcyst/ei-uitscheiding gelijk was aan de gemiddelde oöcyst/eitelling van de twee technieken. De oöcyst/eitelling bekomen met McMaster en mini-FLOTAC per parasiet werd vergeleken aan de hand van de spearman-correlatiecoëfficiënt wanneer minstens vijftig dieren gearasiteerd waren. Verschillen in oöcyst/eitelling werden nagegaan met een tweezijdige, gepaarde t-test.

De gemiddelde tijd nodig om een staal te verwerken werd bepaald voor beide technieken. Een significant verschil in tijd werd vervolgens nagegaan aan de hand van een gepaarde t-test. Omdat het tellen van oöcysten/eieren in de kamers een invloed heeft op de afleestijd en dit effect niet noodzakelijk voor de twee technieken even groot is, werd de correlatie tussen tijd en het totaal aantal parasieten (som van het aantal getelde oöcysten en eieren) voor beide technieken afzonderlijk bepaald. Deze relatie tussen het totaal aantal getelde parasiteneieren/oöcysten en tijd werd nagegaan aan de hand van een lineaire regressie met tijd (in seconden) als de afhankelijke variabele en twee onafhankelijke variabelen op basis van het totaal aantal parasiteneieren/oöcysten geteld onder de microscoop: de ruwe telling en de log getransformeerde telling.

Finaal werd op basis van de bekomen resultaten bepaald wat de meest efficiënte manier was om parasitaire infecties op te sporen bij grote huisdieren. Hiervoor werd de tijd per diagnose berekend voor de twee technieken (= tijd voor het onderzoeken van alle stalen / totaal van diagnoses). Er werd nagegaan of het onderzoeken van stalen in serie (eerst het onderzoeken van alle stalen met de McMaster-techniek en vervolgens de negatieve stalen met de mini-FLOTAC-techniek) een mogelijk alternatief is voor het opsporen van alle infecties.

## RESULTATEN

Een totaal van zes verschillende gastro-intestinale parasieten werden gevonden in de honderd meststalen. De meest voorkomende parasieten waren strongyliden (56/100). In een minderheid van de stalen werd *Parascaris equorum* (5/100), *Eimeria* spp. (6/100), *Anoplocephala* spp. (3/100), *Nematodirus* spp. (2/100) en *Trichuris* spp. (2/100) gevonden. In Tabel 1 wordt de distributie van deze parasitaire infecties over de diersoorten heen beschreven voor de twee technieken afzonderlijk.

### Gevoeligheid

Mini-FLOTAC was het meest gevoelig. De techniek detecteerde 73 van de 74 parasitaire infecties (98,6%), waar McMaster 59 (79,7%) van deze infecties opspoorde. Strongylideninfecties werden in 55 van de 56 gevallen (98,2%) opgespoord door mini-

**Tabel 1. Het aantal positieve stalen met de McMaster-, de mini-FLOTAC-techniek en een combinatie van beide voor vier soorten grote huisdieren.**

Diersoort	Parasiet	Aantal positieve stalen		
		Combinatie van technieken	McMaster	Mini-FLOTAC
Paard (n = 78)	Strongyliden	44	35	43
	<i>Parascaris equorum</i>	5	4	5
	<i>Anoplocephala</i> spp.	3	1	3
Rund (n = 11)	Strongyliden	4	3	4
	<i>Nematodirus</i> spp.	1	1	1
	<i>Eimeria</i> spp.	4	4	4
Schaap (n = 6)	Strongyliden	3	3	3
	<i>Trichuris</i> spp.	2	1	2
	<i>Eimeria</i> spp.	1	1	1
Geit (n = 5)	Strongyliden	5	5	5
	<i>Nematodirus</i> spp.	1	0	1
	<i>Eimeria</i> spp.	1	1	1
<b>Totaal</b>		<b>74</b>	<b>59</b>	<b>73</b>

**Tabel 2. De gevoeligheid van McMaster voor de detectie van strongylideninfecties voor vier niveaus van uitscheiding.**

	Gemiddelde ei-uitscheiding			
	1 - 49	50 - 99	100- 149	≥150
<b>Gevoeligheid McMaster</b>	43,8% 7/16	91,7% 11/12	100% 4/4	100% 24/24

FLOTAC en in 46 (82,1%) van de gevallen door McMaster. In Tabel 2 wordt aangetoond dat de sensitiviteit van McMaster varieert over verschillende niveaus van uitscheiding van strongyliden. McMaster faalde om lage uitscheiders op te sporen, maar had een gevoeligheid van 100% wanneer de ei-uitscheiding minstens 100 EPG was.

### Ei-uitscheiding

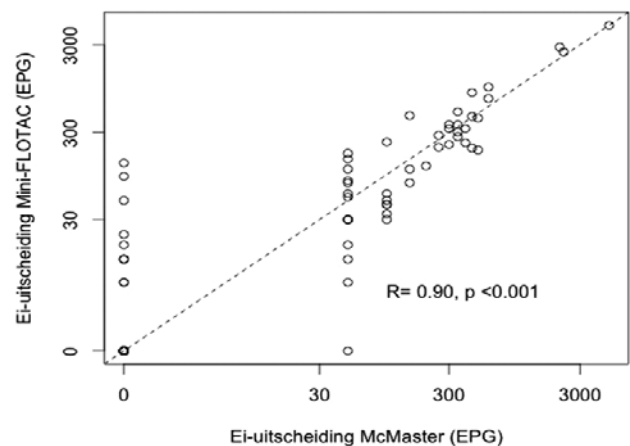
Figuur 2 illustreert de overeenkomst tussen ei-uitscheiding geschat door McMaster en mini-FLOTAC. Er was een significant positieve correlatie tussen de ei-uitscheiding geschat door beide technieken (correlatiecoëfficiënt = 0,90,  $p < 0,001$ ). Wanneer de stalen werden onderzocht met de McMaster-techniek was de gemiddelde uitscheiding 185,5 EPG; op basis van de mini-FLOTAC-techniek was dit 201,1 EPG. Er was geen significant verschil in ei-uitscheiding tussen beide technieken (gemiddelde verschil = -15,6 EPG 95% betrouwbaarheidsinterval [-7,75 EPG tot 38,9 EPG],  $p = 0,19$ ).

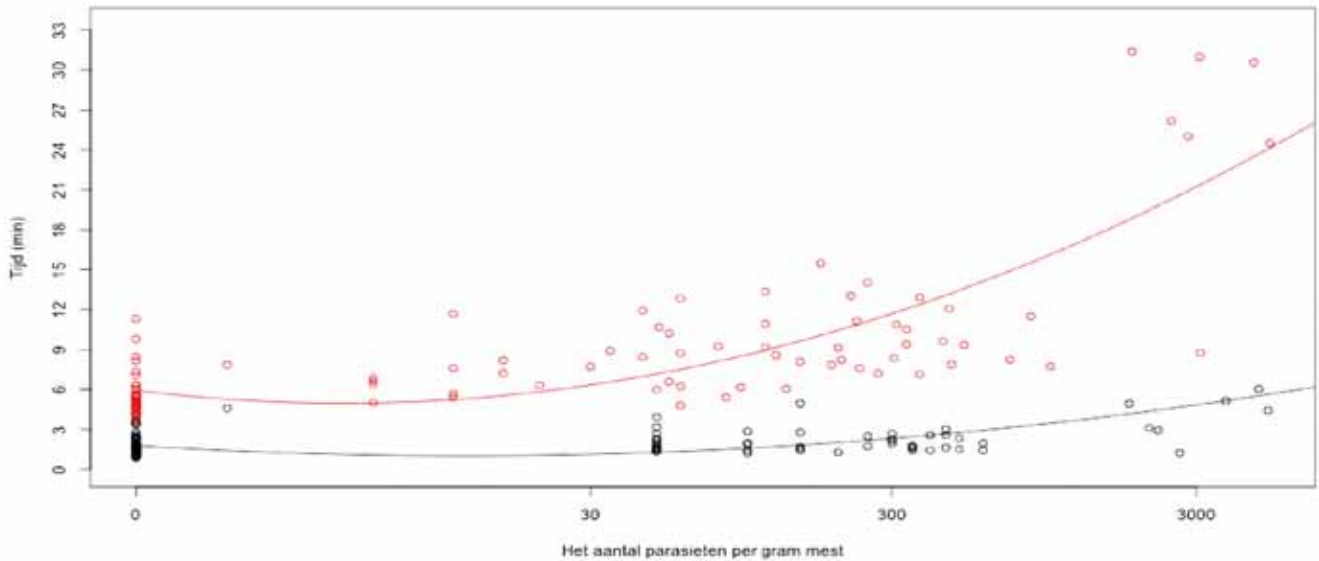
### Tijdsduur van de analyses

Het verwerken van een meststaal met mini-FLOTAC (13 min 23 sec ("standard error of mean" (SEM) 36 sec)) duurde twee keer zolang als bij de McMaster-

techniek (6 min 35 sec (SEM: 12 sec)). Deze verhouding nam af wanneer rekening gehouden werd met het aantal diagnoses. De gemiddelde tijd voor een diagnose (totale tijd / aantal diagnoses) was 18 min 21 sec voor mini-FLOTAC (22 u 19 min 35 sec/73 diagnoses) en 11 min 10 sec (10 u 58 min 52 sec/59 diagnoses) voor McMaster, resulterende in een verhouding van 1,5.

De verschillen in tijd tussen beide technieken was

**Figuur 2. Correlatie tussen EPG-waarden bekomen met de mini-FLOTAC-techniek (Y-as) en de McMaster-techniek (X-as).**



**Figuur 3.** Tijd nodig voor het aflezen van een staal in verhouding tot het aantal parasietdeeltjes per gram mest. Rood: mini-FLOTAC; zwart: McMaster.

voornamelijk te wijten aan de tijd nodig voor het microscopisch onderzoeken van de telkamers (McMaster: 2 min 10 sec versus mini-FLOTAC: 8 min 34 sec) en het wassen van de gebruikte materialen (McMaster: 0 min 37 sec versus mini-FLOTAC: 1 min 28 sec) (Tabel 3). Figuur 3 illustreert ook de toename in de tijd die nodig is voor het microscopisch onderzoeken van de telkamers in functie van het totaal aantal eieren/oöcysten per gram mest. Voor beide technieken was er een significante toename in tijd wanneer het aantal eieren/oöcysten toenam, maar deze toename was niet lineair en was groter voor mini-FLOTAC.

In Tabel 4 worden de totale tijd nodig om honderd stalen microscopisch te onderzoeken, het aantal diag-

nosen en de tijd per diagnose voor verschillende diagnostische strategieën beschreven. De verschillende diagnostische strategieën die gebruikt werden waren: (i) Slechts één techniek om alle stalen te onderzoeken, ofwel McMaster ofwel mini-FLOTAC, (ii) beide technieken in serie, waarbij eerst de ene techniek werd toegepast op alle stalen en vervolgens de andere op de stalen die negatief testten, (iii) beide technieken in parallel, waarbij elk staal met elk van beide technieken werd onderzocht.

Algemeen was er een toename in diagnoses wanneer de technieken werden gecombineerd, maar de mate van toename varieerde tussen de technieken en hoe ze werden gecombineerd (in serie versus in parallel). De

**Tabel 3.** Gemiddelden met standaardfout van de tijd nodig voor elke stap bij beide technieken.

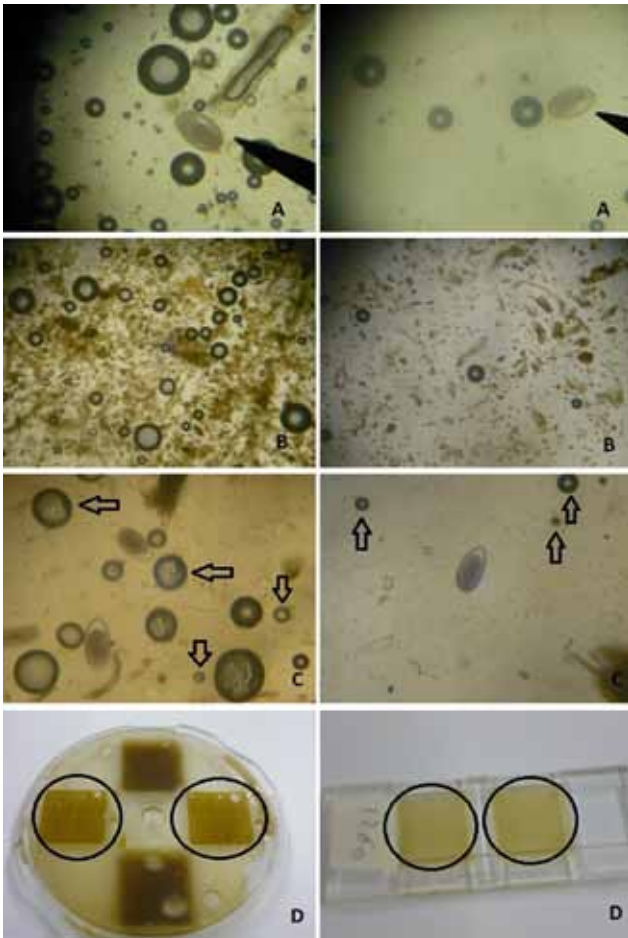
	McMaster	Mini-FLOTAC
<b>Wegen</b>	0 min 44 sec +/- 1,91 sec	0 min 48 sec +/- 1,85 sec
<b>Klaarmaken</b>	3 min 04 sec +/- 2,88 sec*	2 min 24 sec +/- 2,53 sec*
<b>Aflezen (alle stalen)</b>	2 min 10 sec +/- 9,02 sec*	8 min 44 sec +/- 33,68 sec*
<b>Afwassen</b>	0 min 37 sec +/- 1,43 sec*	1 min 28 sec +/- 2,32 sec*
<b>Totaal</b>	6 min 35 sec +/- 12,06 sec*	13 min 24 sec +/- 36,31 sec*

\* P < 0,05

**Tabel 4.** Totale tijdsduur, aantal diagnoses en tijd per diagnose voor vier diagnostische strategieën.

Strategie	Totale tijdsduur	Aantal diagnoses	Tijd per diagnose
McM	10 u 58 min 52 sec	59	11 min 10 sec
McM (1) + MF (2)	19 u 22 min 5 sec	71	16 min 23 sec
MF	22 u 19 min 33 sec	73	18 min 21 sec
MF (1) + McM (2)	26 u 01 min 35 sec	74	21 min 06 sec
McM + MF	33 u 18 min 27 sec	74	29 min 31 sec

McM: McMaster; MF: mini-FLOTAC



**Figuur 4. Verschillen tussen beide technieken bij het aflezen onder de microscoop. Links: Mini-FLOTAC; Rechts: McMaster; A. Klarheid, B. Vuildeeltjes, C. Microscopische luchtballen, D. Macroscopische luchtballen.**

grootste toename werd waargenomen voor McMaster, waarvoor het aantal diagnoses steeg van 59 (enkel McMaster) tot meer dan 71 (McMaster gecombineerd met mini-FLOTAC). Voor mini-FLOTAC was het aantal diagnoses minstens 71, ongeacht de diagnostische strategie. Het verschil in aantal diagnoses tussen het onderzoeken van meststalen in parallel ( $n = 74$ ) en in serie (McMaster-mini-FLOTAC = 71; mini-FLOTAC-McMaster = 74) was klein. De tijd per diagnose daarentegen varieerde van 16 min 23 sec voor McMaster-mini-FLOTAC (serie), over 21 min 06 sec voor mini-FLOTAC-McMaster (serie) tot 27 min 00 sec wanneer beide technieken in parallel werden toegepast.

## BESPREKING

In deze studie werd de mini-FLOTAC-techniek vergeleken met de McMaster voor de diagnose van gastro-intestinale parasieten bij grote huisdieren (paarden, runderen, schapen en geiten) op basis van

(i) gevoeligheid, (ii) eitellingen en (iii) de tijd nodig voor het verwerken van de stalen.

De resultaten tonen aan dat mini-FLOTAC gevoeliger is dan McMaster (over de parasietsoorten heen: 98,6% versus 79,7%, strongyliden: 98,2% versus 82,1%), en bevestigen de conclusies van recente studies die beide technieken valideerden voor de diagnose van gastro-intestinale parasieten bij schapen (strongyliden: 100% versus 75,9-88,5%) (Rinaldi et al., 2014) en mensen (*Hymenolepis nana*: 77,8-92,7% versus 60,5%; *Ascaris lumbricoides*: 61,3-87,1% versus 48,3%) (Barda et al., 2014). Zoals beschreven voor strongylideninfecties bij schapen (Rinaldi et al., 2014) faalde McMaster ook om lage ei-uitscheiders op te sporen bij paarden en runderen, maar werd de techniek 100% gevoelig van zodra de ei-uitscheiding minstens 100 EPG was. Dit verschil in gevoeligheid tussen de technieken in functie van de intensiteit van ei-uitscheiding is niet onverwacht en kan verklaard worden door een verschil in de hoeveelheid mest die wordt onderzocht (0,1 gram voor mini-FLOTAC versus 0,02 gram voor McMaster). Hoe meer mest er wordt onderzocht, hoe groter de kans op het detecteren van een ei/oöcyst, maar de minimale hoeveelheid mest die moet onderzocht worden voor het opsporen van één ei/oöcyst is kleiner als het aantal uitgescheiden eieren/oöcysten in 1 gram mest groot is (Levecke et al., 2011; Torgerson et al., 2012). Ondanks deze significante verschillen in gevoeligheid resulteerden beide technieken in vergelijkbare schattingen van de ei-uitscheiding. Hoewel dit te wijten kan zijn aan een te kleine steekproefgrootte, werd de afwezigheid van een significant verschil in ei-uitscheiding tussen technieken met een verschillende gevoeligheid reeds eerder beschreven (Levecke et al., 2009; 2011; 2015; Rinaldi et al., 2014).

De relatie tussen gevoeligheid en ei-uitscheiding, en de afwezigheid van significante verschillen in ei-uitscheiding tussen technieken met een verschillende gevoeligheid krijgen tot op heden onvoldoende aandacht. Toch hebben beide observaties belangrijke consequenties voor de keuze van de diagnostische methode voor het opsporen van gastro-intestinale parasieten. Allereerst gaat een verhoogde gevoeligheid vaak gepaard met een verhoogde kost van de diagnose (Levecke et al., 2009; Speich et al., 2010; Barda et al., 2014). Dit werd ook bevestigd in de voorliggende studie door de grote verschillen tussen beide technieken wat betreft de tijd die nodig is voor het verwerken van een staal (mini-FLOTAC: 13 min 23 sec versus McMaster: 6 min 35 sec). Ten tweede hebben infecties met een lage intensiteit (~ ei-uitscheiding) weinig of geen klinisch belang. In Nederland bijvoorbeeld wordt het afgeraden om paarden die minder dan 500 EPG uitscheiden, te behandelen ([www.parasietenwijzer.nl](http://www.parasietenwijzer.nl)). Dit is een niveau van ei-uitscheiding dat, op basis van de bekomen data, met hoge waarschijnlijkheid ook met de McMaster-techniek zal worden opgespoord en accuraat zal worden geschat, maar wel

dubbel zo snel als wanneer de mini-FLOTAC zou gebruikt worden. Indien toch een maximale gevoeligheid wordt nagestreefd voor een minimale kost is het aan te raden om eerst de stalen te onderzoeken met de McMaster, om daarna alle stalen waarin geen parasieten werden gevonden opnieuw te onderzoeken met de mini-FLOTAC-techniek. Deze strategie vraagt 1,76 keer meer tijd dan wanneer McMaster alleen wordt gebruikt, maar verhoogt de sensitiviteit van 79,7% naar 95,9%. In vergelijking met het exclusieve gebruik van mini-FLOTAC, daalt de sensitiviteit van 98,6% naar 95,9%, maar worden de diagnoses 0,74 keer sneller gemaakt.

Dit is de eerste studie waarin de tijd afzonderlijk werd geëvalueerd voor zowel McMaster en mini-FLOTAC. De resultaten tonen aan dat stalen sneller kunnen klaargemaakt worden voor de mini-FLOTAC (2 min 24 sec versus 3 min 04 sec), maar dat meer tijd nodig is voor het aflezen (8 min 44 sec versus 2 min 10 sec) en het wassen van de gebruikte materialen (1 min 28 sec versus 37 sec). Het gebruik van de fill-FLOTAC verklaart zowel het sneller klaarmaken als het trager reinigen van de gebruikte materialen: het toestelletje combineert drie verschillende stappen bij het verwerken van de stalen (i.e. het homogeniseren, zeven en overbrengen van de suspensie in de telkamers), maar is moeilijker te reinigen. Het verschil in tijd voor het aflezen van de telkamers kan verklaard worden door een verschil in (i) oppervlakte van de telkamers (mini-FLOTAC: 648 mm<sup>2</sup> versus McMaster: 200 mm<sup>2</sup>), (ii) de hoeveelheid onderzochte mest, en dus het aantal eieren dat geteld moet worden (voor ieder ei dat geteld wordt met McMaster moeten er tien geteld worden met mini-FLOTAC), (iii) de hoeveelheid artefacten (meer aanwezig bij mini-FLOTAC) (Figuur 4 A, B, C, D) en het aantal microscopische luchtbellen (meer aanwezig bij mini-FLOTAC) (Figuur 4 A, B, C, D). Bij mini-FLOTAC waren soms ook macroscopisch zichtbare luchtbellen aanwezig. Dit is hoogstwaarschijnlijk te wijten aan slijtage van de onderdelen van de mini-FLOTAC-telkamers.

Deze studie heeft echter enkele tekortkomingen. Allereerst kunnen besluiten over de diagnostische waarde van beide technieken enkel genomen worden voor strongylideninfecties bij paarden (aantal geïnfecteerde dieren = 44). Voor de andere parasieten en diersoorten was het aantal geïnfecteerde dieren te klein ( $\leq 5$ ) voor een sluitende analyse. Ten tweede werd de gevoeligheid bepaald in afwezigheid van een perfecte standaardtechniek. Hoewel een combinatie van de testresultaten van beide technieken de kans op een valsnegatief testresultaat verkleint, kan dit niet 100% worden uitgesloten. De gerapporteerde resultaten betreffende de gevoeligheid zijn daarom een onderschatting. Als alternatief wordt vaak gebruik gemaakt van 'latent class'-modellen in een Bayesiaans kader (Hui en Zhou 1998; Enøe et al., 2000; Berkvens et al., 2006), waarbij vooraf informatie over de gevoeligheid van de technieken op basis van een expertopinie

kan worden ingevoegd. Deze modellen houden echter tot op heden geen rekening met de variatie in gevoeligheid voor ei-uitscheiding (Levecke et al., 2015). Ten derde werd deze studie uitgevoerd door één persoon in één laboratorium, waardoor extrapolatie van de resultaten zowel binnen het Laboratorium voor Parasitologie van de Faculteit Diergeneeskunde (UGent) als naar andere laboratoria met enige voorzichtigheid moet gebeuren. Hoewel dit in het bijzonder van toepassing is voor de tijd die nodig is voor het verwerken van de stalen, zijn de tijdsopnamen voor McMaster en mini-FLOTAC vergelijkbaar met deze gerapporteerd in andere studies bij mensen (McMaster: 7 min/staal; mini-FLOTAC: 13 min/staal (Barda et al., 2014)).

## CONCLUSIE

In de studie wordt aangetoond dat mini-FLOTAC gevoeliger is dan de huidige McMaster-methode, in het bijzonder voor de diagnose van infecties met een lage intensiteit en dat eitellingen tussen de technieken vergelijkbaar zijn, maar dat de mini-FLOTAC-techniek meer tijd vraagt om uit te voeren. Rekening houdend met deze meerkost voor de diagnose en de minimale meerwaarde van mini-FLOTAC voor de diagnose van infecties met een hoge intensiteit en van klinisch belang zijn, blijft het gebruik van McMaster verantwoord. Indien toch een maximale gevoeligheid wordt nagestreefd voor een minimale kost (bijvoorbeeld voor de detectie van anthelminticumresistentie) is het aan te raden om beide technieken in serie uit te voeren, waarbij eerst de McMaster-techniek wordt toegepast op alle stalen en vervolgens de mini-FLOTAC op de stalen die negatief testten.

## REFERENTIES

- Barda B., Cajal P., Villagran E., Cimino R., Juarez M., Krolewiecki A., Rinaldi L., Cringoli G., Burioni R., Albonico M. (2014). Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: three methods, one goal; highlights from north Argentina. *Parasites & Vectors* 7, 271.
- Barda B.D., Rinaldi L., Ianniello D., Zepherine H., Salvo F., Sadutshang T., Cringoli G., Clementi M., Albonico M. (2013). Mini-FLOTAC, an innovative direct diagnostic technique for intestinal parasitic infections: experience from the field. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7(8), e2344.
- Berkvens D., Speybroeck N., Praet N., Adel A., Lesaffre E. (2006). Estimating disease prevalence in a Bayesian framework using probabilistic constraints. *Epidemiology* 17, 145-153.
- Cringoli G., Maurelli M.P., Pepe P., Alfano S., Pennacchio S., Ianniello D., Rinaldi L. (2012). Mini-FLOTAC, a new tool for copromicroscopic diagnosis of *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum* and *Trichuris vulpis* in dogs. In: *Proceedings of the XXVII Congress of the Italian Society of Parasitology (SOIPA)*. Alghero, 26-29 June 2012, 197.
- Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J. (2010).

- FLOTAC: new multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols* 5, 503-505.
- El-Abdellati A., Charlier J., Geldhof P., Levecke B., Demeler J., von Samson-Himmelstjerna G., Claerebout E., Vercruysse J. (2010). The use of a simplified faecal egg count reduction test for assessing anthelmintic efficacy on Belgian and German cattle farms. *Veterinary Parasitology* 169, 352-357.
- Enøe C., Georgiadis M.P., Johnson W. O. (2000). Estimation of sensitivity and specificity of diagnostic tests and disease prevalence when the true disease state is unknown. *Preventive Veterinary Medicine* 45, 61-81.
- Hui S. L., Zhou X. H. (1998). Evaluation of diagnostic tests without gold standards. *Statistical Methods in Medical Research* 7, 354-370.
- Levecke B., Anderson R. M., Berkvens D., Charlier J., Devleeschauwer B., Speybroeck N., Vercruysse J., Van Aelst S. (2015). Mathematical inference on helminth egg counts in stool and its applications in mass drug administration programmes to control soil-transmitted helminthiasis in public health. *Advances in Parasitology* 87, 193-247.
- Levecke B., De Wilde N., Vandenhoute E., Vercruysse J. (2009). Field validity and feasibility of four techniques for the detection of *Trichuris* in simians: a model for monitoring drug efficacy in public health? *PLoS Neglected Tropical Diseases* 3(1), e366.
- Levecke B., Rinaldi L., Charlier J., Maurelli M.P., Morgoglione M.E., Vercruysse J., Cringoli G. (2011). Monitoring drug efficacy against gastrointestinal nematodes when faecal egg counts are low: do the analytic sensitivity and the formula matter? *Parasitological Research* 109, 953-957.
- Morgan E.R., Cavill L., Curry G.E., Wood R.M., Mitchell E.S.E. (2005). Effects of aggregation and sample size on composite faecal egg counts in sheep. *Veterinary Parasitology* 131, 79-87.
- Rinaldi L., Levecke B., Bosco A., Ianniello D., Pepe P., Charlier J., Cringoli G., Vercruysse J. (2014). Comparison of individual and pooled faecal samples in sheep for the assessment of gastrointestinal strongyle infection intensity and anthelmintic drug efficacy using McMaster and Mini-FLOTAC. *Veterinary Parasitology* 205, 216-223.
- Speich B., Knopp S., Mohammed K.A., Khamis I.S., Rinaldi L., Cringoli G., Rollinson D., Utzinger J. (2010). Comparative cost assessment of the Kato-Katz and FLOTAC techniques for soil-transmitted helminth diagnosis in epidemiological surveys. *Parasites & Vectors* 3, 71.
- Torgerson P. R., Paul M., Lewis F. I. (2012). The contribution of simple random sampling to observed variations in faecal egg counts. *Veterinary Parasitology* 188, 397-401.

## Uit het verleden

### ERASMUS OVER ARTSEN EN GELD (1518)

‘Ik wil toegeven dat dit beroep te edel is om tot geldopstapeling en louter gewin te dienen, zoals dit voor de alleedaagse beroepen het geval is. Maar het is al te ondankebaar evenwel de passende dankbaarheid te onttrekken aan haar alleen, voor wie nooit dankbaarheid groot genoeg kan zijn. Een uitmuntend arts helpt zoals een god zonder hoop op beloning en helpt tegen de wil van de patiënten in. Maar het is snoodheid niet dankbaar te zijn voor de weldaad van een god. Hij wacht niet op het loon, maar gij verdient door de wetten gestraft te worden omdat gij uw plicht verzuimd hebt door hem niet te betalen’.

Uit: ‘Een betoog over de lof van de geneeskunde’ door Desiderius Erasmus van Rotterdam (oorspronkelijk ‘Encomium artis medicae’, Basel 1518, vertaling L. Elaut, De Standaard, 1950)

Luc Devriese



## Cosmetische rostrale neusreconstructie na plaveiselcelcarcinoomresectie bij twee honden

*Cosmetic rostral nasal reconstruction after resection of squamous cell carcinoma in two dogs*

<sup>1</sup>S. Lippens, <sup>1</sup>B. Van Goethem, <sup>2</sup>I. Gielen, <sup>1</sup>I. Polis, <sup>1</sup>H. de Rooster

<sup>1</sup>Vakgroep Geneeskunde en Klinische Biologie van de Kleine Huisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

<sup>2</sup>Vakgroep Medische Beeldvorming van de Huisdieren en Orthopedie van de Kleine Huisdieren, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke, België

bart.vangoethem@ugent.be

### SAMENVATTING

Twee mannelijke golden retrievers van ongeveer tien jaar oud werden aangeboden met een zichtbare massa in de neus, niesden en vertoonden epistaxis. Uit histologisch onderzoek na biopsie bleek dat het bij beide honden om een plaveiselcelcarcinoom ging. Bij verdere staging waren er geen aanwijzingen voor metastasen. Chirurgische wegneming van de tumor door middel van een planectomie of nosectomie werd voorgesteld. Omdat de klassieke excisie van de neusspiegel voor deze eigenaars cosmetisch onaanvaardbaar was, werd bij beide honden gekozen voor een rostrale neusreconstructie. Bij de eerste hond bevond de tumor zich aan de oppervlakte, waardoor resectie van het kraakbenig deel van de neus voldoende was en een planectomie werd uitgevoerd. Bij de tweede hond daarentegen was er tevens botaantasting, waardoor niet alleen de neus, maar ook het os incisiva werd verwijderd (nosectomie). Bij beide honden werd een remissie van de tumor verkregen na een follow-up van respectievelijk 35 en 29 maanden, met tegelijkertijd een uitstekend cosmetisch resultaat.

### ABSTRACT

Two male Golden retrievers, each one about ten years old, were presented with a visible mass in the nose, showing symptoms of sneezing and epistaxis. The histopathological examination of biopsies indicated that both dogs were affected by a squamous cell carcinoma. Further staging did not reveal any indications for metastases. Surgical removal of the tumor through a planectomy or nosectomy was proposed. Since the classical removal of the nose was cosmetically unacceptable for the owners of both dogs, a rostral nose reconstruction was opted for in both cases. As the tumor in the first dog was rather superficial, resection of the cartilaginous part of the nose (planectomy) turned out to be sufficient. In the second dog however, there was also evidence of bony involvement. Therefore, not only the nose but also the os incisiva was removed (nosectomy). In both cases, remission of the tumor was obtained after a 35 and 29 months follow-up, respectively, accompanied by an excellent cosmetic result.

### INLEIDING

Tumoren van de neus komen weinig voor bij de hond (1% van alle tumoren). Carcinomen zijn het meest voorkomende type tumoren van de neus (66%) en bestaan uit adenocarcinomen, plaveiselcelcarcinomen en ongedifferentieerde carcinomen. Sarcomen worden vastgesteld in 25-40% van de gevallen, waar-

onder fibrosarcomen, chondrosarcomen, osteosarcomen en ongedifferentieerde sarcomen (Malinowski, 2006; Turek en Lana, 2013). Plaveiselcelcarcinomen komen vooral voor op de neusspiegel of in het vestibulum en worden geassocieerd met een langdurige blootstelling aan ultraviolet licht en pigmentloze zonen (Madewell et al., 1981). Andere tumoren die kunnen voorkomen ter hoogte van de neusspiegel zijn

lymfomen, fibrosarcomen, hemangiomen, melanomen, mastceltumoren, fibromen en eosinofiele granulomen (Withrow, 2013).

De meest voorkomende klinische symptomen bij een tumor van de neusspiegel zijn in volgorde van voorkomen epistaxis, niezen en ulceratie of zwelling van de neusspiegel (Rogers et al., 1995). Zowel carcinomen als sarcomen zijn lokaal invasief, maar hebben een eerder zwak metastaserend vermogen (Lascelles et al., 2000; Thomson, 2007). Zonder behandeling worden honden meestal binnen enkele maanden na de diagnose geëuthanaseerd omwille van steeds erger wordende hinder van de toenemende primaire tumor (Elliot en Mayer, 2009). Indien aanwezig, komen metastasen vooral voor ter hoogte van de regionale lymfeknopen of de longen (Lascelles et al., 2000; Turek en Lana, 2013). Op het tijdstip van autopsie worden bij 50% van de honden, met zowel carcinomen als sarcomen, alsnog lymfeknoop- of longmetastasen gevonden. De aanwezige metastasen zijn echter zelden een oorzaak van sterfte (Turek en Lana, 2013).

De chirurgische resectie van een plaveiselcelcarcinoom van de neusspiegel biedt 67-100% kans op genezing (Holt et al., 1990; Kirpensteijn et al., 1994; Rogers et al., 1995; Lascelles et al., 2000). Naargelang de grootte van de tumor wordt enkel de neusspiegel weggenomen of de neusspiegel samen met het os incisiva (Withrow en Straw, 1990; Kirpensteijn et al., 1994). Ter reconstructie wordt klassiek een beursnaadhechting op de huid gelegd, waarbij de mucosa van de neusholte aan de huid wordt vastgehecht. Daardoor zijn de conchae goed zichtbaar en heeft het resultaat geen enkele gelijkenis met de normale gepigmenteerde neus. Het zwakke cosmetische resultaat is voor vele eigenaars een reden om niet chirurgisch te behandelen (Withrow et al., 1985; Gallegos et al., 2007).

In de twee volgende casuïstieken wordt een gemodificeerde reconstructie geïllustreerd na respectievelijk planectomie en nosectomie, waarbij de lipranden worden gebruikt om nieuwe neusvleugels te recon-

strueren. Deze door Gallegos et al. (2007) beschreven techniek levert een goed cosmetisch resultaat op en leidt tot grote tevredenheid bij de eigenaars.

## CASUÏSTIEKEN

### Casus 1

Een tien jaar en vijf maanden oude, mannelijke golden retriever werd aangeboden met een geïncereerde massa in de linkerneusspiegel. Die massa werd vijf à zes weken eerder voor het eerst opgemerkt. Aangezien de massa progressief toenam in grootte en bloedde bij het niezen en bij aanraking werd de patiënt doorgestuurd naar de Faculteit Diergeneeskunde (UGent).

Tijdens het algemeen lichamelijk onderzoek vertoonde de hond een alerte algemene indruk. Met uitzondering van de geïncereerde massa ter hoogte van het planum nasale en het rostrale deel van het neuseptum waren er geen afwijkingen merkbaar. Op het algemeen bloedonderzoek werden geen klinisch relevante afwijkingen vastgesteld. Vervolgens werd een radiologisch onderzoek uitgevoerd van de neus en de thorax. Ter hoogte van de neusspiegel was een wekdelenmassa zichtbaar, maar er waren geen aanwijzingen voor betrokkenheid van het bot. Er waren geen radiografisch detecteerbare metastasen aanwezig in de thorax.

Om een definitieve diagnose te stellen, werden twee 6 mm punchbiopten genomen voor histologisch onderzoek. Hemostase werd verkregen met adrenaline en een cellulosemateriaal (Spongostan, Johnson & Johnson Medical, Nederland) en de biopsieplaatsen werden gesloten met twee enkelvoudige hechtingen in 3/0 polyglecaprone (Monocryl, Ethicon, België). In het kader van de volledige stagering werd ook een fijnaaldaspiraats van de mandibulaire lymfeknoop uitgevoerd. Cytologische interpretatie van dat staal was echter niet diagnostisch. Het histologisch onder-



**Figuur 1A en B.** Beelden tijdens de operatie van een golden retriever (casus 1) met plaveiselcelcarcinoom van de neusspiegel. Het kraakbenige deel van de neus werd samen met de neusspiegel verwijderd. Er werden 2/0 polyamideteugels geplaatst zodat de lipranden gemakkelijk gemanipuleerd konden worden.



**Figuur 2.** Beeld tijdens de operatie. De buccale mucosa werd aan de laterale rand van het neuskraakbeen gehecht en er werden bijkomende incisies gemaakt in de buccale mucosa om het vestibulum te reconstrueren.



**Figuur 3.** Beeld op het einde van de operatie. Ten slotte werden de dorsale rand van het neusgat en de buccale mucosa aan de nasale huid gehecht.



**Figuur 4.** Hond 1 tweeënhalf jaar na de operatie. De cosmetische neusreconstructie geeft een heel mooi resultaat.

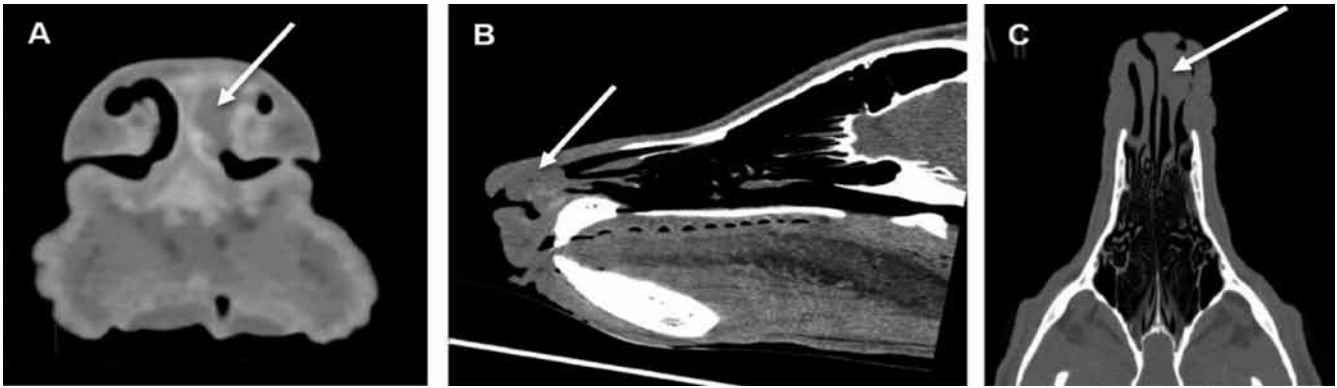
zoek van de bipten toonde aan dat het ging om een plaveiselcelcarcinoom uitgaande van het mucosale epitheel in de neus.

Er werd besloten tot het chirurgisch verwijderen van de massa. Aangezien de massa uitging van het planum nasale en rostrale neusseptum, werd bij deze patiënt een planectomie uitgevoerd. Eerst werd er een incisie gemaakt op een afstand van 1 cm rond de neusspiegel. Hemostase werd bekomen door monopolaire en bipolaire elektrocoagulatie. De laterale nasale arterie werd geligeerd met 4/0 polyglecaprone. Op de overgang naar het os nasale werd het kraakbenig deel van de neus samen met de neusspiegel geamputeerd. De premaxilla kon worden behouden. Hemostase werd bekomen door tijdelijke tegendruk en elektrocoagulatie. Vervolgens werden 2/0 polyamide-teugels (Ethilon, Ethicon, België) geplaatst ter hoogte van de lipranden om ze gemakkelijk te kunnen manipuleren (Figuur 1). De buccale mucosa werd lateraal aan het overblijvende randje neuskraakbeen gehecht. Daarna werd er een incisie gemaakt in de buccale mucosa en de liprand, zodat de lipranden craniaal van de premaxilla bij elkaar gebracht konden worden (Figuur 2). Het appositioneren van de buccale aan de gingivale mucosa gebeurde aan de hand van een doorlopende hechting met 4/0 polyglecaprone. Nadien werd de buccale mucosa van de opgetrokken liprand geappositioneerd als een ventrale neusgang met enkelvoudige hechtingen. De incisie van de liprand werd enkelvoudig gehecht om de premaxilla en de tanden voor het zicht te verbergen. Ten slotte werden de dorsale rand van het neusgat en de buccale mucosa gehecht aan de nasale huid met 3/0 polydioxanone (PDSII, Ethicon, België) en 4/0 polyglecaprone (Figuur 3).

De hond werd vervolgens gehospitaliseerd gedurende drie dagen. Verdere postoperatieve medicatie bestond uit 15 mg/kg cefalexine (Rilexine, Virbac, Frankrijk) tweemaal daags gedurende 7 dagen, 2 mg/kg carprofen tweemaal daags gedurende 14 dagen en 2,6 mg/kg tramadolhydrochloride (Tramadol, Eurogenerics N.V., België) driemaal daags gedurende 7 dagen. Er werd tevens een kraag gebruikt om automutilatie te voorkomen.

Uit histologisch onderzoek van de marges bleek dat de massa volledig was verwijderd. Tijdens de eerste postoperatieve controles (drie en zes weken na de operatie) was er een goede wondheling te zien. De incisieplaats was droog en er was geen subcutane zwelling aanwezig. Er was wel een beperkte wonddehiscentie aanwezig bovenaan de neustop, maar dat behoeft geen verdere behandeling. De patiënt was alert en levendig en leek geen pijn te hebben.

Zes maanden postoperatief bleek de rostrale neusreconstructie functioneel en cosmetisch goed aanvaardbaar voor de eigenaar. Bij radiologisch onderzoek van de thorax waren geen metastasen zichtbaar in de longen en bij rinoscopisch onderzoek werd geen lokaal recidief opgemerkt. Eén jaar postoperatief was de röntgencontrole van de thorax nog steeds negatief



**Figuur 5.** A. Transversale, B. gereconstrueerde sagittale en C. dorsale CT-beelden van de neus van een golden retriever (casus 2) met plaveiselcelcarcinoom van de neusspiegel en het kraakbenige deel van de neus. Er is rostraal en dorsaal van de rechterneusgang een wekedenstructuur zichtbaar die heterogeen contrast opneemt (pijl). Lokale compressie van de neusgang is duidelijk zichtbaar (pijl).

voor metastasen. De eigenaars werden geconsulteerd 2,5 jaar na de operatie. Ze waren uiterst tevreden met het functionele en cosmetische resultaat (Figuur 4). De hond werd genezen verklaard.

## Casus 2

Een negen jaar oude, mannelijke golden retriever werd aangeboden met klachten van epistaxis en niezen die al twee weken aanwezig waren. Door de eigen dierenarts werd een massa opgemerkt in het rechterneusgat.

Tijdens het algemeen lichamelijk onderzoek vertoonde de hond een alerte algemene indruk. Er was epistaxis aanwezig en in het rechterneusgat, tegen het neusseptum, werd een kleine, poliepachtige nodule opgemerkt. Er was nog luchtpassage mogelijk. Op het algemeen bloedonderzoek werden geen klinisch relevante afwijkingen vastgesteld. De hond werd vervolgens geseedeerd voor het uitvoeren van een computertomografisch (CT) onderzoek om de uitbreiding van het proces te bepalen en bipten van de massa te nemen. De CT-scan toonde een scherp omschreven wekedenmassa dorsaal ter hoogte van het meest rostrale aspect van het rechterneusgat (Figuur 5). Er was tevens aantasting van het os incisiva. De massa had

de volgende afmetingen: 1,8 x 1 x 0,8 cm. Een röntgenfoto van de thorax toonde geen metastasen. Een fijnaaldaspiraats van de mandibulaire lymfeknoop toonde geen abnormaliteiten.

Vervolgens werden drie incisionele bipten genomen van de massa. Het cytologisch beeld was suggestief voor een plaveiselcelcarcinoom, hetgeen nadien werd bevestigd door het histologisch onderzoek.

Er werd besloten tot chirurgische excisie van de massa door het uitvoeren van een nosectomie. Eerst werd er een incisie gemaakt op een afstand van 1 cm rond de neusspiegel. Hemostase werd bekomen door monopolaire en bipolaire elektrocoagulatie. Op de overgang naar het os nasale werd het kraakbenige deel van de neus samen met de neusspiegel geamputeerd (Figuur 6). Na incisie van de mucosa ter hoogte van het gehemelte werd het os incisiva verwijderd met een oscillerende zaag. Bloedingen van de grote arteries van het gehemelte werden gestopt met elektrocoagulatie. De lipranden werden gemobiliseerd na het plaatsen van teugels. De neusreconstructie bij deze patiënt werd op analoge wijze als hierboven beschreven uitgevoerd (Figuur 7).

De hond werd vervolgens gedurende twee dagen gehospitaliseerd. De postoperatieve medicatie bestond uit 15 mg/kg cefalexine tweemaal daags ge-



**Figuur 6.** Beeld tijdens de operatie. Op de overgang naar het os nasale werd het kraakbenige deel van de neus samen met de neusspiegel geamputeerd.



**Figuur 7.** Beeld op het einde van de operatie. Tot slot werden de dorsale rand van het neusgat en de buccale mucosa aan de nasale huid gehecht.

durende 7 dagen, 2 mg/kg carprofen tweemaal daags gedurende 7 dagen en 3 mg/kg tramadolhydrochloride driemaal daags gedurende 7 dagen. Automutilatie werd verhinderd door het dragen van een kraag.

Het histologisch onderzoek toonde aan dat de tumor volledig verwijderd was. Bij de eerste postoperatieve controle (tien dagen na de operatie) deed de hond het algemeen heel goed en leek geen pijn te ondervinden. Er was enkel wat etterige neusvloeï aanwezig en de hond kon moeilijker drinken omwille van nasale reflux. De incisieplaats stond droog met enkele korsten. Er was geen subcutane zwelling aanwezig. Twee weken later werd een aantal hechtingen onder sedatie verwijderd.

Twee maanden postoperatief kwam de eigenaar terug omdat ze bloed gezien had in de mond. De neusgaten waren goed genezen, maar ter hoogte van de bovenlip, waar beide kanten aan elkaar gehecht waren, was er een lichte dehiscentie aanwezig. Op dat moment werd er geen verdere behandeling ingesteld, maar er werd geadviseerd om tien dagen nadien nogmaals op controle te komen om de bovenlip op te frissen en opnieuw te hechten indien nodig. Tien dagen later waren er op die plaats echter enkel wat littekenweefsel en depigmentatie te zien.

Radiologisch onderzoek ter controle van metastasen na zes maanden en anderhalf jaar na de operatie was telkens negatief. De rostrale neusreconstructie was functioneel en cosmetisch goed aanvaardbaar voor de eigenaars. Twee jaar na de operatie waren ze nog steeds heel tevreden met het resultaat. De hond deed het heel goed en alles was mooi genezen (Figuur 8).

## DISCUSSIE

Het signalement van beide honden die hierboven besproken werden, is in overeenstemming met de gegevens over plaveiselcelcarcinomen ter hoogte van de neusspiegel gevonden in de literatuur. De incidentie is hoger bij labradors en golden retrievers, waarbij mannelijke dieren gepredisponerd zijn. Bij honden bedraagt de gemiddelde leeftijd van de diagnose tien jaar (Rogers et al., 1995; Lascelles et al., 2000; Malinowski, 2006). Honden met een plaveiselcelcarcinoom van de neusspiegel worden meestal geëuthanaseerd omwille van de lokale hinder in de neus (Malinowski, 2006).



**Figuur 8.** Foto van de hond twee jaar na de operatie. De cosmetische neusreconstructie geeft een aanvaardbaar resultaat na uitgebreide resectie van de neusspiegel.

Omwille van het belang van de chirurgische marges is een goede inschatting van de uitgebreidheid van de primaire tumor belangrijk (Beck en Withrow, 1985; Theisen et al., 1996). Dit kan nagegaan worden met radiografische beeldvormingstechnieken en/of rinoscopisch onderzoek. Een eerste mogelijkheid is een radiologisch onderzoek van de neus. Radiografische kenmerken die geassocieerd worden met een tumor, aanwezig in de neusholte of in de dieper gelegen sinussen, zijn een verhoogde wekedelenopaciteit in de neusholte en/of een wekedelen/vocht opaciteit in de ipsilaterale frontale sinus en de destructie van verschillende omliggende structuren, zoals de neuschelpen, het neusseptum, het gehemelte of kaak- en frontale beenderen. Sommige radiografische kenmerken kunnen echter ook gezien worden bij een infectie, waardoor het onderscheid niet altijd eenvoudig te maken is (Beck en Withrow, 1985; Theisen et al., 1996). Het gebruik van computertomografie is superieur tegenover een radiologisch onderzoek aangezien superpositie van overliggende structuren vermeden wordt (Park et al. 1992; Codner et al. 1993). Computertomografie heeft zowel een hoge sensitiviteit als specificiteit als diagnostisch middel voor het onderscheiden van verschillende aandoeningen in de neus (Saunders et al., 2003). Bovendien worden de uitbreiding van een tumor en de betrokkenheid van omliggende structuren exacter weergegeven (Park et al., 1992; Codner et al., 1993). Als derde optie kan ook gekozen worden voor beeldvorming met magne-

**Tabel 1.** Stagering van caniene, nasale tumoren (naar Adams et al., 2009).

<b>Stage 1</b>	Tumor aanwezig in één neusholte, paranasale sinus of frontale sinus, zonder betrokkenheid van botstructuren, behalve de neuschelpen
<b>Stage 2</b>	Betrokkenheid van botstructuren rondom de neuschelpen, zonder orbitale, subcutane of submucosale massa
<b>Stage 3</b>	Betrokkenheid van de orbita of aanwezigheid van een nasofaryngeale subcutane of submucosale massa
<b>Stage 4</b>	Lyse van de cribiforme plaat veroorzaakt door de tumor

tische resonantie (MRI), waarbij de wekedelendifferentiatie superieur is. Kleine hoeveelheden vocht en weke weefsels, zoals de hersenen, kunnen beter gezien worden op MRI dan op een CT-scan. Voor het in beeld brengen van een nasale tumor die niet reikt tot in de hersenen blijkt MRI echter niet klinisch relevanter dan een CT-scan, aangezien de visualisatie van de omliggende botstructuren even belangrijk is als die van de weke weefsels (Drees et al., 2009). Beide zijn bijgevolg evenwaardig als diagnostisch middel, maar omwille van de beschikbaarheid, de snelheid en de lagere kostprijs, wordt vaak gekozen voor computertomografie. Verder kan ook rinoscopie aangewend worden om een massa in de neusholte op te sporen (Tasker et al., 1999; Meler et al., 2008; Lobetti, 2009). Het voordeel van een rinoscopisch onderzoek is dat de aanwezigheid van de endoscoop in het lumen toelaat om duidelijk vast te stellen of een proliferatieve tumor ergens tegenaan ligt, dan wel er invasief ingroeit. Op die manier kan er ook vlot een gericht biopt genomen worden. Bij de eerste hond werd zes maanden postoperatief een rinoscopisch onderzoek uitgevoerd om eventuele recidieven op te sporen.

Hoewel duidelijke klinische symptomen en aanwijzingen voor een nasale tumor via medische beeldvormingstechnieken een sterk vermoeden kunnen geven, is een biopname vereist voor het stellen van de definitieve diagnose (Theisen et al., 1996; Lefebvre et al., 2005; Turek en Lana, 2013). Bij beide honden werd de aanwezigheid van een plaveiselcelcarcinoom bevestigd door een histologisch onderzoek van de biopten. Er werd gekozen voor punchbiopten bij de eerste patiënt en voor incisiebiopten bij de tweede patiënt, maar er zijn tal van mogelijkheden om een representatief staal te bekomen. Een deel van het tumorweefsel kan eveneens weggenomen worden met een curette of via een plastic canule (Turek en Lana, 2013). Verder kan ook hydropulsie aangewend worden. Daarbij wordt een fysiologische zoutoplossing met een volume van 20-60 ml onder hoge druk ingebracht in het aangetaste neusgat. Het contralaterale neusgat wordt op dat moment dichtgehouden. De hoge druk zorgt er vervolgens voor dat een deel van de massa vrijkomt en mee naar buiten wordt gespoeld. Voor een zo volledig mogelijke diagnostiek wordt hetzelfde nadien uitgevoerd in het contralaterale neusgat en dat proces wordt driemaal herhaald. Nasale hydropulsie is een weinig invasieve methode, waarbij grote staalnamen bekomen kunnen worden (Ashbaugh et al., 2011).

Na het diagnosticeren van de primaire tumor dient de hond gestageerd te worden. Op basis van de stage waartoe de tumor behoort, kan de prognose gesteld worden. Voor plaveiselcelcarcinomen van de neusspiegel bestaat er echter geen specifieke WHO-indeling. Bij het hanteren van de WHO-stagering voor neustumoren (Owen, 1980) is er geen significant verband tussen de uitgebreidheid van de tumor en de prognose (Turek en Lana, 2013). Adams et al. (2009)

ontwikkelden echter een relevantere stagering voor neustumoren bij de hond, op basis van bevindingen bekomen met behulp van een computertomografisch onderzoek (Tabel 1). De prognose is het slechtst indien er aantasting is van de cribiforme plaat. Eventuele metastasen van plaveiselcelcarcinomen worden opgespoord via een cytologisch onderzoek van de regionale lymfeknopen en via radiologisch of computertomografisch onderzoek van de thorax. Metastasen zijn echter zelden aanwezig op het moment van de diagnose (Rassnick et al., 2006). In deze casuïstieken werden bij geen van beide patiënten metastasen aangetroffen.

Wanneer het tumorale proces beperkt is tot de neusspiegel en/of rostrale neus (kraakbenig deel), kan met planectomie of nosectomie een voldoende ruime tumorresectie worden bekomen. Wanneer de tumor ventraal in het planum nasale, het neusseptum of het vestibulum en bijgevolg dicht tegen het bot gelokaliseerd is, kan bijkomend een resectie van het os incisiva uitgevoerd worden om voldoende ruime marges te respecteren. Bij de tweede patiënt was er volgens het computertomografisch onderzoek een ventrale uitbreiding van de tumor aanwezig, mogelijk in het kraakbeen, waardoor gekozen werd voor resectie van het os incisiva. Een eenvoudige chirurgische reconstructiemethode nadat de volledige neusspiegel verwijderd is, werd beschreven door Withrow en Straw (1990). Het cosmetische resultaat van deze techniek is voor de meeste eigenaars aanvaardbaar bij katten, maar minder bij honden. Een planectomie met bijkomende resectie van het os incisiva werd beschreven door Kirpensteijn et al. (1994). De ingreep tot en met de resectie van het os incisiva is dezelfde zoals beschreven in de voorliggende casuïstieken, enkel de manier van sluiten is verschillend. Kirpensteijn et al. (1994) hechten de submucosa van de bovenlip ter hoogte van de incisie vast aan het hard gehemelte. Beide lipranden worden in de middenlijn samengebracht en aan elkaar gehecht, waardoor een T-vormige sluiting ontstaat. Ten slotte wordt er een beursnaad geplaatst in de huid rondom de neuschelpen, zonder vasthechting aan de onderliggende weefsels, om het defect te verkleinen (Kirpensteijn et al., 1994). Lascelles et al. (2000) beschreven een modificatie van die techniek, waarbij het defect kleiner gemaakt wordt door het gebruik van een huidflap of door het ondermijnen van de omliggende huid in plaats van door een beursnaad. De huid wordt vervolgens vastgehecht aan de mucosa van de neuschelpen. Het cosmetische resultaat is op die manier iets beter, maar nog steeds zwak. Voor vele eigenaars is zo'n eindresultaat een reden om niet te kiezen voor deze chirurgische behandeling van plaveiselcelcarcinomen van de neusspiegel. Daarom wordt tegenwoordig aan de Faculteit Diergeneeskunde (UGent) standaard gekozen voor een cosmetische rostrale neusreconstructie, zoals beschreven door Gallegos et al. (2007). De wegname van de neusspiegel gebeurt op dezelfde

manier, zoals beschreven bij de vorige technieken, waardoor de tumorverwijdering even efficiënt verloopt. Er wordt echter een mooier resultaat verkregen door het defect op een andere manier te sluiten. Naast het goede cosmetische resultaat heeft deze techniek nog andere voordelen: de goede appositie bevordert primaire wondheling van de mucosa, er is een betere bescherming tegen infecties en het neuskraakbeen, het neusseptum en de blootgestelde neusschelpen zijn grotendeels bedekt en beter beschermd tegen trauma (Gallegos et al., 2007). In beide casussen verliep de wondheling heel vlot.

Na chirurgische excisie is een histologisch onderzoek van de massa aangewezen. Aan de hand daarvan kan nagegaan worden of de massa met zuivere marges werd weggenomen (Withrow en Straw, 1999; Lascelles et al., 2000). Bij beide beschreven honden werd de resectie met tumorvrije marges microscopisch bevestigd. De prognose na volledige chirurgische resectie van een neusspiegel-plaveiselcelcarcinoom is uitstekend. De patiënten vermeld in Withrow en Straw (1990), Kirpensteijn et al. (1994) en Lascelles et al. (2000) (25 honden in totaal) vertoonden geen recidieven en eventuele sterfte was te wijten aan een niet-gerelateerde oorzaak. Ook de twee patiënten van de voorliggende casuïstieken zijn nog steeds in leven, respectievelijk 35 en 29 maanden na de operatie. Een chirurgische behandeling kan echter enkel curatief zijn, indien de tumor volledig weggenomen wordt en er geen metastasen aanwezig zijn (Withrow en Straw, 1990; Kirpensteijn et al., 1994; Lascelles et al., 2000). Het voorkomen van een plaveiselcelcarcinoom ter hoogte van het kraakbenig deel van de neus (neusspiegel en rostrale neusseptum) is een eerder uitzonderlijke plaats, aangezien ruime chirurgische excisie op die plaats haalbaar is. Het laag metastaserend vermogen verhoogt tevens de kans op volledige genezing na ruime wegname van de tumor.

## REFERENTIES

- Adams W.M., Kleiter M.M., Thrall D.E., Klauer J.M., Forrest L.J., La Due T.A., Havighurst T.C. (2009). Prognostic significance of tumor histology and computed tomographic staging for radiation treatment response of canine nasal tumors. *Radiology & Ultrasound* 50, 330-335.
- Ashbaugh E.A., McKiernan B.C., Miller C.J., Powers B. (2011). Nasal hydropulsion: a novel tumor biopsy technique. *Journal of the American Animal Hospital Association* 47, 312-316.
- Beck E.R., Withrow S.J. (1985). Tumors of the canine nasal cavity. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 15, 521-533.
- Codner E.C., Lurus A.G., Miller J.B., Gavin P.R., Gallina A., Barbee D.D. (1993). Comparison of computed tomography with radiography as a noninvasive diagnostic technique for chronic nasal disease in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 202, 1106-1110.
- Drees R., Forrest L.J., Chappell R. (2009). Comparison of computed tomography and magnetic resonance imaging for the evaluation of canine intranasal neoplasia. *Journal of Small Animal Practice* 50, 334-340.
- Elliot K.M., Mayer M.N. (2009). Radiation therapy for tumors of the nasal cavity and paranasal sinuses in dogs. *Canadian Veterinary Journal* 50, 309-312.
- Gallegos J., Schmiedt C.W., McNulty J.F. (2007). Cosmetic rostral nasal reconstruction after nasal planum and premaxilla resection. Technique and results in two dogs. *Veterinary Surgery* 36, 669-674.
- Holt D., Prymak C., Evans S. (1990). Excision of tumors in the nasal vestibule of two dogs. *Veterinary Surgery* 19, 418-423.
- Kirpensteijn J., Withrow S.J., Straw R.C. (1994). Combined resection of the nasal planum and premaxilla in three dogs. *Veterinary Surgery* 23, 341-346.
- Lascelles B.D., Parry A.T., Stidworthy M.F., Dobson J.M., White R.A. (2000). Squamous cell carcinoma of the nasal planum in 17 dogs. *Veterinary Record* 147, 473-476.
- Lefebvre J., Kuehn N.F., Wortinger A. (2005). Computed tomography as an aid in the diagnosis of chronic nasal disease in dogs. *Journal of Small Animal Practice* 46, 280-285.
- Lobetti R.G. (2009). A retrospective study of chronic nasal disease in 75 dogs. *Journal of the South African Veterinary Association* 80, 224-228.
- Madewell B.R., Conroy J.D., Hodgkins E.M. (1981). Sunlight-skin cancer association in the dog: a report of three cases. *Journal of Cutaneous Pathology* 8, 434-443.
- Malinowski C. (2006). Canine and feline nasal neoplasia. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 21, 89-94.
- Meler E., Dunn M., Lecuyer M. (2008). A retrospective study of canine persistent nasal disease: 80 cases (1998-2003). *Canadian Veterinary Journal* 49, 71-76.
- Owen L.N. (1980). TNM Classification of tumours in domestic animals. *World Health Organization*. First edition, Geneva.
- Park R.D., Beck E.R., LeCouteur R.A. (1992). Comparison of computed tomography and radiography for detecting changes induced by malignant nasal neoplasia in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201, 1720-1724.
- Rassnick K.M., Goldkamp C.E., Erb H.N., Scrivani P.V., Njaa B.L., Gieger T.L., Turek M.M., McNeil E.A., Proulx D.R., Chun R., Mauldin G.E., Phillips B.S., Kristal O. (2006). Evaluation of factors associated with survival in dogs with untreated nasal carcinomas: 139 cases (1993-2003). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229, 401-406.
- Rogers K.S., Helman R.G., Walker M.A. (1995). Squamous cell carcinoma of the canine nasal planum: eight cases (1988-1994). *Journal of the American Animal Hospital Association* 31, 373-378.
- Saunders J.H., van Bree H., Gielen I., de Rooster H. (2003). Diagnostic value of computed tomography in dogs with chronic nasal disease. *Veterinary Radiology & Ultrasound* 44, 409-413.
- Tasker S., Knottenbelt C.M., Munro E.A., Stonehewer J., Simpson J.W., Mackin A.J. (1999). Aetiology and diagnosis of persistent nasal disease in the dog: a retrospective study of 42 cases. *Journal of Small Animal Practice* 40, 473-478.
- Theisen S.K., Hosgood G., Lewis D.D. (1996). Intranasal

- tumors in dogs: diagnosis and treatment. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian* 18, 131-138.
- Thomson M. (2007). Squamous cell carcinoma of the nasal planum in cats and dogs. *Clinical Techniques in Small Animal Practice* 22, 42-45.
- Turek M.M., Lana S.E. (2013). Tumors of the respiratory system – Nasosinal tumors. In: Withrow S.J., Vail D.M., Page R.L. (Editors) *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Fifth edition, Saunders, St. Louis, p. 435-451.
- Withrow S.J., Nelson A.W., Manley P.A., Biggs D.R. (1985). Premaxillectomy in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 21, 49-53.
- Withrow S.J., Straw R.C. (1990). Resection of the nasal planum in nine cats and five dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association* 26, 219-222.
- Withrow S.J. (2013). Tumors of the respiratory System – Cancer of the nasal planum. In: Withrow S.J., Vail D.M., Page R.L. (Editors). *Withrow and MacEwen's Small Animal Clinical Oncology*. Fifth edition, Saunders, St. Louis, p. 432-435.

Uit het verleden

### HET OOG EN HET OOR VAN DE MEESTER

*Want is het niet het oog van de meester dat de ezel vet maakt? Dat er op toeziet dat het tuig haar niet striemt, dat haar tong regelmatig vergelijkt met de kleur van voorjaarspruimen, dat haar vacht controleert op schilfers en schimmels? En is het niet het oor van de meester dat hoort wanneer de hoefijzers ratelen op het voetpad, en luistert het niet regelmatig naar zijn kakebeen als het kauwt of de maalkiezen nog op elkaar passen? Is het niet van zucht tot drol gespist op het welzijn van zijn rijdier? Wat is een wonderbaarlijke ezel zonder een meester, en omgekeerd, een helderhorende meester zonder een ezel in dorre streken? Vergankelijk is het vlees van beide en ze moeten de koppen bij elkaar steken om te overleven. Wees hem dus ter wille met jouw gaven, opdat hij jou ter wille is met de zijne.*

Uit: Marlene van Niekerk, *Het oog van de meester*, Querido, Amsterdam, 2007, p. 61-62 (een parafrase op het bijbelverhaal 'De ezel van Bileam', vertaling uit het Afrikaans).

Luc Devriese



## Concurrent squamous cell carcinoma and hemangiosarcoma in the cornea of a cat

*Het gelijktijdig voorkomen van een plaveiselcelcarcinoom en hemangiosarcoom in de cornea bij een kat*

<sup>1</sup>G. Storms, <sup>2</sup>C. Naranjo, <sup>1</sup>M. Grauwels

<sup>1</sup>Department of Clinical Sciences, Ophthalmology, Veterinary Teaching Hospital, University of Liège, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 3, B-4000 Liège, Belgium

<sup>2</sup>Hospital Clinico Veterinario, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Puerta del Hierro s/n, Madrid, Spain

goedelestorms@gmail.com

### ABSTRACT

A 14-year-old, female, spayed Domestic Shorthair cat was presented for evaluation of a dark red mass occupying about 75% of the cornea of the left eye. Furthermore, the eye presented upper eyelid trichiasis, lower eyelid entropion and a marked symblepharon. The fellow eye presented upper eyelid trichiasis, lower eyelid entropion, extensive symblepharon and chronic stromal ulcerative keratitis. Based on the results of a corneal biopsy of the left eye, a corneal squamous cell carcinoma was diagnosed and an enucleation was performed subsequently. Histopathology of the globe revealed the presence of variably sized, vascular-like, blood-filled channels in the superficial corneal stroma, lined by spindle cells. In the central cornea, a markedly hyperplastic epithelium was noticed with infiltration of atypical corneal epithelial cells into the superficial stroma. A primary corneal hemangiosarcoma associated with a primary corneal squamous cell carcinoma was diagnosed. In this case report, the rare presence of multiple primary neoplasms within the same anatomical structure is described.

### SAMENVATTING

Een veertien jaar oude, vrouwelijke, gesteriliseerde huiskat werd aangeboden omwille van een uitgesproken donker roodverkleuring van de cornea van het linkeroog. Het oog vertoonde eveneens trichiasis van het bovenooglid, entropion van het onderooglid en een uitgesproken symblefaron. Het rechteroog vertoonde trichiasis van het bovenooglid, entropion van het onderooglid, een uitgesproken symblefaron en chronische stromale en ulceratieve keratitis. Aan de hand van een biopsie van de cornea van het linkeroog werd een plaveiselcelcarcinoom gediagnosticeerd en het linkeroog werd vervolgens weggenomen. Histologisch onderzoek van de cornea toonde met bloed gevulde kanaalvormige structuren van verschillende grootte, die op bloedvaten geleken en afgelijnd waren door spindelvormige cellen. In het centrale deel van de cornea was een uitgesproken hyperplastisch epitheel aanwezig met infiltratie van atypische cornea-epitheelcellen in het oppervlakkige stroma. Zowel een primair hemangiosarcoom als een primair plaveiselcelcarcinoom in de cornea werd gediagnosticeerd. In deze casuïstiek wordt het zeldzame voorkomen van meerdere primaire tumoren in dezelfde anatomische structuur beschreven.

### INTRODUCTION

Neoplasms affecting the cornea are rare in dogs and cats, and usually occur secondary to extension of a conjunctival, limbal or intraocular tumor (Fischer et al., 2002).

Squamous cell carcinoma (SCC) is a malignant neoplasm, locally invasive with metastasis occurring

late in the disease. In cats, ocular SCC involves most commonly the eyelids and the conjunctiva with secondary involvement of the cornea. White cats are predisposed, likely due to the effects of solar radiation (Stiles, 2013).

Ocular tumors of vascular origin are rarely described in cats. Hemangiomas and hemangiosarcomas have been reported on the eyelids, conjunctiva, nictitating

membrane and cornea (Multari et al., 2002; Pirie and Dubielzig, 2006; Hartley et al., 2007; Perlmann et al., 2010; Cazalot et al., 2011).

The presence of multiple primary neoplasms within the same anatomical structure is rare. At the level of the eye and periocular structures, two cases of multiple primary neoplasms have been reported. In a domestic short-haired cat, a co-existing SCC and hemangioma affecting the ocular surface have been described (Perlmann et al., 2010) and Gearhart et al. (2007) reported the concurrent presence of a SCC and hemangiosarcoma in the third eyelid of a Belgian draft horse.

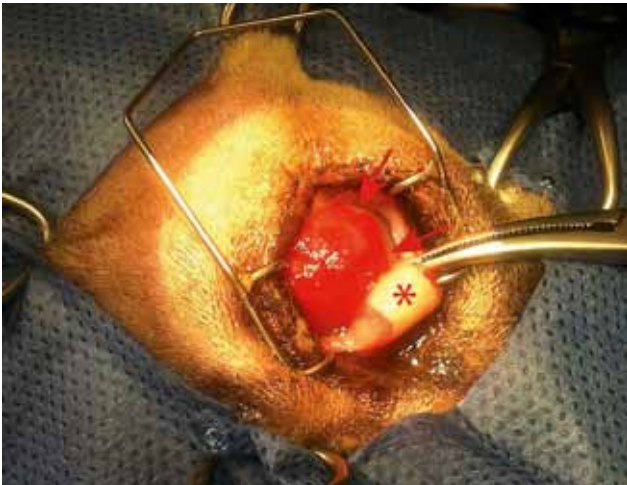
## CASE REPORT

A 14-year-old, female spayed, grey-colored Domestic Shorthair cat (DSH) was presented for a red mass on the cornea of the left eye. Five years ago, the cornea started to become whitish, changing to red

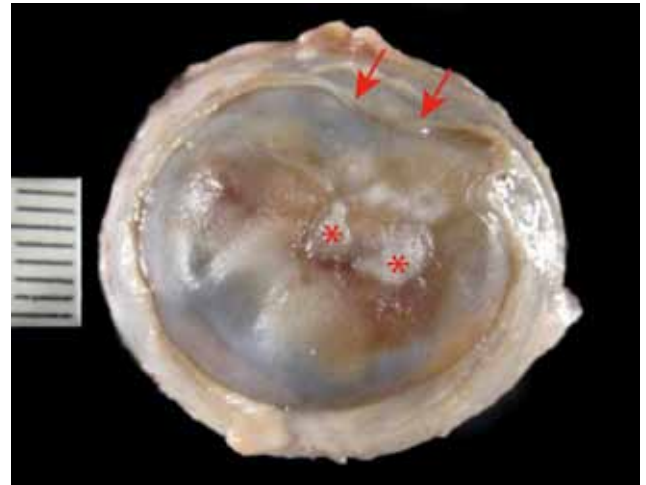
over the past two years. Since two weeks, the right eye had started to show a discrete white corneal coloration as well. The owner reported no signs of ocular discomfort. However, he noticed marked visual impairment. The cat had a lifelong history of chronic respiratory problems and bilateral ocular discharge. The cat was living outdoors in a multi-cat household and had been vaccinated up to the age of five years.

Physical examination revealed a mild inspiratory stridor. In both eyes, the menace response was absent, dazzle and oculopalpebral reflexes were normal. Direct and consensual pupillary light reflexes were hardly assessable because of the corneal lesions.

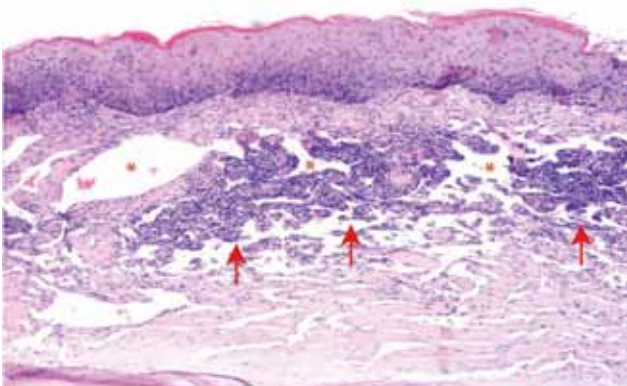
The left eye showed blepharospasm, mucopurulent ocular discharge, upper eyelid trichiasis and lower eyelid entropion. The Schirmer tear test I (STT, Standardized Sterile Strips, Intervet, Summit, NJ, USA) was 9 mm/min. Slit lamp biomicroscopy (SL-15 portable slit lamp, Kowa company Ltd., Düsseldorf, Germany) revealed conjunctival hyperemia, extensive symblepharon and lymphoid follicles on



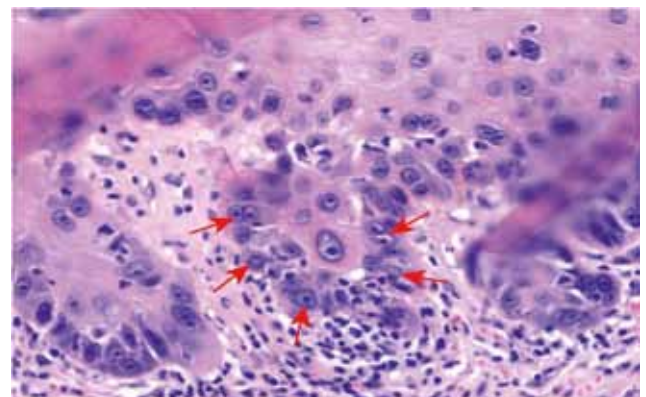
**Figure 1.** Red corneal mass (arrows) with superficial peripheral neovascularization. Notice the iatrogenic folded cartilage of the nictitating membrane (asterisk) as a result of positioning the eye for surgery and the eyelid sutures of the previous entropion correction.



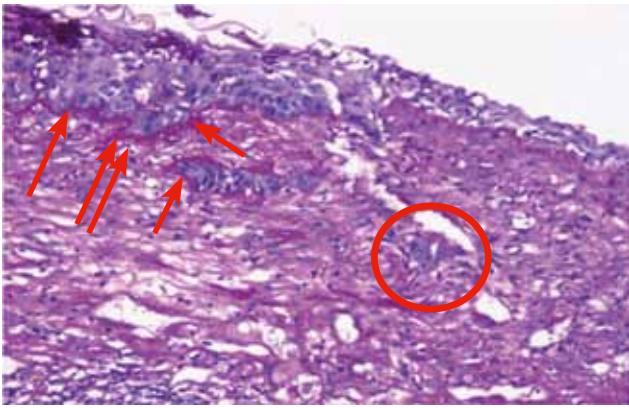
**Figure 2.** Gross section of the left globe. There is a slightly umbilicated, roughened region in the (para)central cornea (asterisks) with a halo of dark brown pigment surrounding it. Notice the adhesion of the dorsal bulbar conjunctiva to the peripheral cornea (arrows).



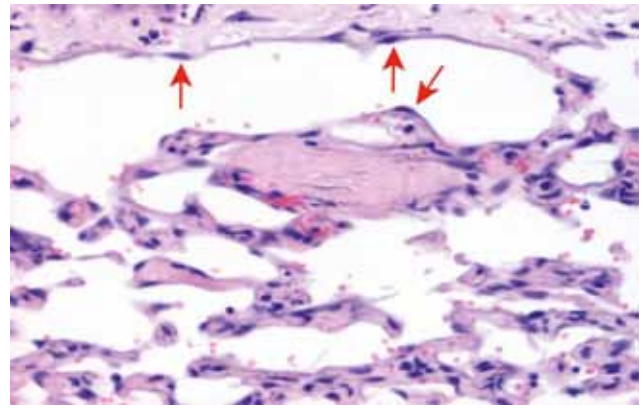
**Figure 3.** Hyperplastic and dysplastic epithelium of the axial cornea with keratinization. Stroma contains hemangiosarcoma (asterisks) and lymphoplasmacytic infiltrates (arrows) and fibrosis. (H&E, x 4)



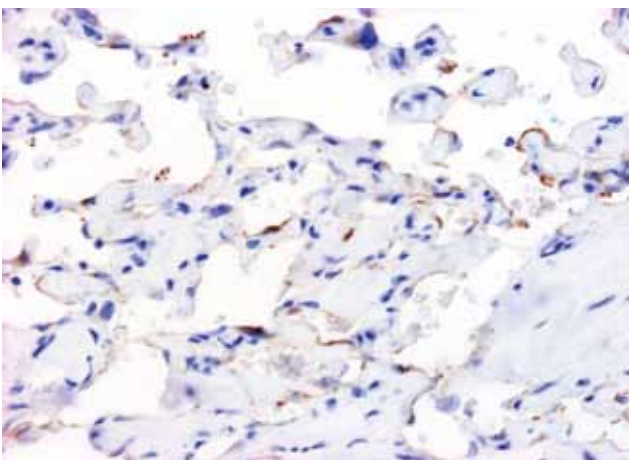
**Figure 4.** Higher magnification of the axial cornea: areas of epithelium with robust rete ridges and prominent dysplastic features (arrows). (H&E, x 20)



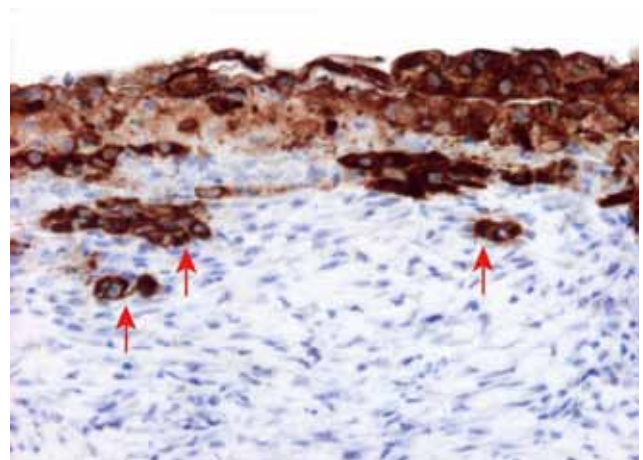
**Figure 5.** The epithelial basement membrane was thickened throughout the central cornea. Aggregates of atypical epithelial cells (circle) have broken through the basement membrane (arrows). (PAS, x 10)



**Figure 6.** Hemangiosarcoma in the intermediate third of the axial stroma, consisting of vascular-like, blood-filled channels lined by a single layer of spindle cells (arrows). (H&E, x 10)



**Figure 7.** Spindle cells lining the vascular-like channels in the corneal stroma stained for factor VIII. (Factor VIII immunohistochemistry, x 200)



**Figure 8.** Pancytokeratin immunohistochemistry revealed individual and small aggregates of cytokeratin-positive cells that had broken through the basement membrane with invasion of the superficial corneal stroma (arrows). (Pancytokeratin immunohistochemistry, x 200)

the inner face of the nictitating membrane. The symblepharon involved the third eyelid and both the palpebral and bulbar conjunctiva, as well as adhesion of the bulbar conjunctiva on the superior peripheral corneal surface. A smooth, red, raised mass occupied at least 75% of the central cornea with superficial peripheral corneal neovascularization (Figure 1). The intraocular structures were not interpretable because of the corneal lesions.

The right eye showed upper eyelid trichiasis, lower eyelid entropion, conjunctival hyperemia, extensive symblepharon and chronic stromal ulcerative keratitis with a STT I of 8 mm/min.

Diffuse punctate fluorescein uptake was present on both corneal surfaces. Differential diagnosis for the red corneal mass included hemangioma, hemangiosarcoma, SCC, inflammatory granuloma, foreign body granuloma and non-specific chronic keratitis.

Hematology and complete blood count revealed a slight neutrophilia and slight increase in urea. PCR for feline herpes virus type I, *Chlamydomphila felis*, feline calicivirus and *Mycoplasma* species as well as ocular ultrasound, thorax radiographs and nasal endo-

scopy were declined by the owner because of financial limitations.

Under general anesthesia, a 3 mm-punch biopsy was taken of the red mass together with entropion correction using the Celsus-Hotz procedure and electrolysis of the eyelid trichiasis.

The biopsy was fixed in 10% formalin, routinely processed and paraffin-embedded. Sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histopathological examination revealed pleomorphic polygonal cells with prominent and irregular nucleoli and anisokaryosis. The epithelial basement membrane was thickened and the corneal stroma showed neovascularization and infiltration by neutrophils, lymphocytes and plasma cells. Corneal SCC was diagnosed.

Based on these results, a transpalpebral enucleation was performed. The eye was routinely fixed and processed (Figure 2).

Microscopically, the corneal epithelium was markedly hyperplastic in the axial region with prominent keratinization (Figures 3 and 4). On deeper sections,

dysplastic corneal epithelial cells were noted infiltrating the superficial stroma beyond the basement membrane (Figure 5). These cells showed atypical cytological features, including hypereosinophilic cytoplasm, binucleation and a prominent, round, magenta nucleolus.

The intermediate third of the axial stroma contained variably sized, anastomosing, vascular-like, blood-filled channels lined by a single layer of spindle cells with moderately atypical features (Figures 3 and 6). Anisocytosis and anisokaryosis were moderate and no mitotic figures were noted in ten high power fields.

In the paracentral aspect of the cornea, adjacent to the hyperplastic/dysplastic epithelium, there was a focal area of stroma that was not covered by epithelium (ulcer). The peripheral cornea showed a markedly attenuated epithelium and the superficial stroma showed neovascularization with reactive (not atypical) blood vessels, fibrosis and a moderate lymphoplasmacytic and neutrophilic infiltrate. The mid and deep peripheral corneal stroma showed no significant microscopic changes.

No significant microscopic changes were noticed in the remaining ocular structures. Immunohistochemistry for factor VIII and pancytokeratin was performed (Figures 7 and 8).

Based on histology, corneal hemangiosarcoma and incipient SCC of the left eye were diagnosed, as well as a severe, chronic, ulcerative keratitis.

Six months postoperatively, the cat was euthanized by the referring veterinarian because of a suspicion of corneal perforation of the right eye. No systemic clinical signs had been noticed by the owner and no necropsy or histological examination of the right eye was performed.

## DISCUSSION

The presence of two different neoplastic processes within the same tissue and without invasion of adjacent ocular structures is rare. Perlmann (2010) reported a hemangioma and SCC on the ocular surface in a cat; however, the primary tumor origin was unknown. This is in contrast to the present case report, where both tumors were malignant and of corneal origin.

To the authors' knowledge, only one case of feline primary corneal hemangiosarcoma has been reported (Cazalot et al., 2011). Similar to the current case, a very longstanding corneal inflammation was described. Cazalot (2011) suggested that the newly formed corneal blood vessels present during inflammation provided the endothelial cells that were at the origin of this tumor. It has been shown that damage to vascular endothelial cells may lead to dysregulation of angiogenesis and erythropoiesis with release of angiogenic growth factors and cytokines. This may lead to proliferation of endothelial cells and development

of hemangiosarcoma (Moyer et al., 2004; Cohen et al., 2009). In the present case report, reactive blood vessels were found in the peripheral cornea blending in with the hemangiosarcoma, suggesting that these may have been at the origin of this neoplasm.

Feline corneolimbic squamous cell carcinoma associated with intraocular invasion has been reported in two cats (Scurrall et al., 2013). Scurrall et al. suggested that the limbus was the most likely origin of the SCC in both cats since the limbus is rich in stem cells and these cells are considered to be the source of most neoplasms (Scurrall et al., 2013). This is in contrast to the present case report, where no limbal or intraocular invasion of the SCC was found on histopathology.

The cat in the current case report was a 14-year-old, female, spayed, grey-colored DSH. The average age of cats with conjunctival hemangiomas and hemangiosarcomas is 10.6 years, and the DSH and neutered males are over-represented (Pirie and Dubielzig, 2006). SCC is mostly seen in older cats (10-12 years) and although any breed and sex can be affected, white cats are at greatest risk (Murphy, 2013).

The cat in the study of Perlmann (2010), which presented with a hemangioma and SCC on the ocular surface, was an indoor cat with minimal sun exposure, whereas the cat of this case report was an outdoor cat. UV radiation has been proposed as a risk factor for the development of both hemangiosarcoma and SCC (Dorn et al., 1971; Murphy, 2013). DNA damage may be produced by UV radiation either directly or through reactive oxygen species (Rodust et al., 2009). Both in SCC and hemangiosarcoma, mutations caused by UV radiation may lead to neoplastic development due to the activation of oncogenes and inactivation of tumor suppressor genes including p53 (Matsumura and Ananthaswamy, 2002; Rodust et al., 2009). Because chronic sun exposure is an important risk factor, hemangiosarcomas occur most often at the nonpigmented leading edge of the nictitating membrane and on sites of the conjunctiva with the greatest exposure to UV radiation (Pirie and Dubielzig, 2006). Similarly for SCC, this lesion is mainly seen in white cats or on the non-pigmented skin and conjunctiva in colored cats (Murphy, 2013).

Chronic keratoconjunctivitis was histologically confirmed in this cat without identification of the exact etiology. Causes of keratoconjunctivitis in cats include eyelid abnormalities (eyelid agenesis, entropion, trichiasis), infectious causes (feline herpes virus I, *Chlamyodphila felis*, feline calicivirus, *Mycoplasma* species), neoplasia, eosinophilic keratoconjunctivitis and less frequently keratoconjunctivitis sicca (Stiles, 2013).

In dogs, chronic inflammatory conditions of the cornea and chronic topical immunosuppressive therapy have been reported as risk factors for the development of primary corneal SCC (Dreyfus et al., 2011). An increase in cellular proliferation and inflammatory

signals was proposed to increase the likelihood of SCC (Dreyfus et al., 2011). In human medicine, chronic inflammation has been well identified as an important driving force for the development of neoplasia through multiple mechanisms including induction of genomic instability, inappropriate gene expression, enhanced proliferation of initiated cells, resistance to apoptosis, aggressive tumor neovascularization and damage to DNA, proteins and lipids by inflammation-induced reactive oxygen and nitrogen species (Kundu and Surh, 2008).

The presence of metastasis was unknown in this case. No signs of local recurrence or metastasis were reported in both case reports on corneal hemangioma and hemangiosarcoma, eight and 18 months following enucleation, respectively (Perlmann et al., 2010; Cazalot et al., 2011).

In conclusion, SCC involving the cornea without conjunctival or eyelid invasion is rare and should be included in the differential diagnosis for chronic keratitis not responding to symptomatic treatment. The possibility of multiple tumors should be taken into account when interpreting superficial corneal biopsies.

## REFERENCES

- Cazalot G., Regnier A., Deviers A., Serra F., Lucas M.N., Etienne C.L., Letron I.R. (2011). Corneal hemangiosarcoma in a cat. *Veterinary Ophthalmology 14 (Suppl 1)*, 117-1121.
- Cohen S.M., Storer R.D., Criswell K.A., Doerrer N.G., Dellarco V.L., Pegg D.G., Wojcinski Z.W., Malarkey D.E., Jacobs A.C., Klaunig J.E., Swenberg J.A., Cook J.C. (2009). Hemangiosarcoma in rodents: mode-of-action evaluation and human relevance. *Toxicological Sciences 111*, 4-18.
- Dorn C.R., Taylor D.O., Schneider R. (1971). Sunlight exposure and risk of developing cutaneous and oral squamous cell carcinoma in white cats. *Journal of the National Cancer Institute 46*, 1073-1078.
- Dreyfus J., Schobert C.S., Dubielzig R.R. (2011). Superficial corneal squamous cell carcinoma occurring in dogs with chronic keratitis. *Veterinary Ophthalmology 14*, 161-168.
- Gearhart P.M., Steficek B.A., Petersen-Jones S.M. (2007). Hemangiosarcoma and squamous cell carcinoma in the third eyelid of a horse. *Veterinary Ophthalmology 10*, 121-126.
- Hartley C., Ladlow J., Smith K.C. (2007). Cutaneous haemangiosarcoma of the lower eyelid in an elderly white cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery 9*, 78-81.
- Kundu J.K., Surh Y.J. (2008). Inflammation: gearing the journey to cancer. *Mutation Research 659*, 15-30.
- Matsumura Y., Ananthaswamy H.N. (2002). Molecular mechanisms of photocarcinogenesis. *Frontiers in Bioscience 7*, 765-783.
- Moyer C., Allen D., Basabe A., Maronpot R.R., Nyska A. (2004). Analysis of vascular endothelial growth factor (VEGF) and a receptor subtype (KDR/flk-1) in the liver of rats exposed to riddelliine: a potential role in the development of hemangiosarcoma. *Experimental and Toxicological Pathology 55*, 455-465.
- Multari D., Vascellari M., Mutinelli F. (2002). Hemangiosarcoma of the third eyelid in a cat. *Veterinary Ophthalmology 5*, 273-276.
- Murphy S. (2013). Cutaneous squamous cell carcinoma in the cat: current understanding and treatment approaches. *Journal of Feline Medicine and Surgery 15*, 401-407.
- Fischer C.A., Lindley D.M., Carlton W.C., Van Hecke H. (2002). Tumors of the Cornea and Sclera. In: Peiffer R.L.Jr., Simons K.B. (editors). *Ocular tumors in Animals and Humans*. First edition, Iowa State Press, Iowa, p. 149-202.
- Perlmann E., Da Silva E.G., Guedes P.M., Barros P.S. (2010). Co-existing squamous cell carcinoma and hemangioma on the ocular surface of a cat. *Veterinary Ophthalmology 13*, 63-66.
- Pirie C.G., Dubielzig R.R. (2006). Feline conjunctival hemangioma and hemangiosarcoma: a retrospective evaluation of eight cases (1993-2004). *Veterinary Ophthalmology 9*, 227-231.
- Rodust P.M., Stockfleth E., Ulrich C., Leverkus M., Eberle J. (2009). UV-induced squamous cell carcinoma - a role for antiapoptotic signalling pathways. *The British Journal of Dermatology 161 (Suppl 3)*, 107-115.
- Scurrill E.J., Lewin G., Solomons M., Rozmanec M., Belford C.J. (2013). Corneolimbus squamous cell carcinoma with intraocular invasion in two cats. *Veterinary Ophthalmology 16 (Suppl 1)*, 151-154.
- Stiles J. (2013). Feline ophthalmology. In: Gelatt K.N., Gilger B.G., Kern T.J. (editors). *Veterinary Ophthalmology*. Fifth edition, Wiley-Blackwell, Iowa, p. 1477-1559.

## Risico op colistineresistentie neemt toe

### *Risk of colistin resistance on the rise*

<sup>1,6</sup>B. Callens, <sup>2</sup>F. Haesebrouck, <sup>3</sup>J. Dewulf, <sup>2</sup>F. Boyen, <sup>2,4</sup>P. Butaye, <sup>5</sup>B. Catry,  
<sup>6</sup>P. Wattiau, <sup>1</sup>E. De Graef

<sup>1</sup> Antimicrobial Consumption and Resistance in Animals, Eurostation II, Victor Hortaplein 40 bus 10, 1060 Brussels, Belgium

<sup>2</sup> Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

<sup>3</sup> Veterinary Epidemiology Unit, Department of Reproduction, Obstetrics and Herd Health, Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University, Salisburylaan 133, 9820 Merelbeke, Belgium

<sup>4</sup> Ross University School of Veterinary Medicine, Department of Biosciences, PO 334, Basseterre, St. Kitts and Nevis, West Indies

<sup>5</sup> Scientific Institute of Public Health, Juliette Wytsmanstraat 14, 1050 Elsene, Belgium

<sup>6</sup> Veterinary and Agricultural Centre (CODA-CERVA), Groeselenberg 99, 1180 Ukkel, Belgium

benedicte.callens@amcra.be  
benedicte.callens@coda-cerva.be

## SAMENVATTING

In een recent artikel uit China werd overdraagbare resistentie tegen colistine beschreven die gevonden werd bij *Escherichia (E. coli)* bekomen uit voedselproducerende dieren, vlees en ziekenhuispatiënten (Liu et al., 2015). Heel recent werd deze resistentie onder meer ook gevonden in Denemarken, Frankrijk, het Verenigd Koninkrijk en België. Colistine wordt beschouwd als een van de laatste behandelopties tegen multiresistente bacteriën in de humane gezondheidszorg, voornamelijk bij patiënten met mucoviscidose. Alertheid voor colistineresistentie is geboden en het nieuwe resistentiemechanisme dient zorgvuldig te worden opgespoord bij dier- en mensgerelateerde bacteriën.

## ABSTRACT

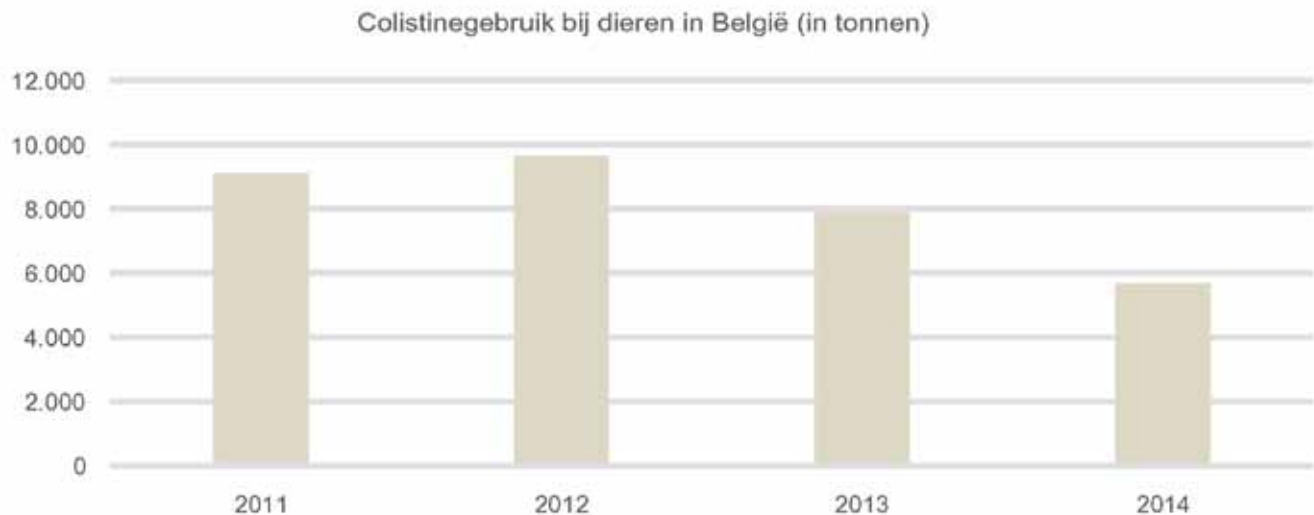
In a recent article from China, a transferable resistance mechanism has been described in *Escherichia coli (E. coli)*, isolated from food-producing animals, meat and hospital patients (Liu et al., 2015). Recently, this resistance mechanism has also been found in Denmark, France, the United Kingdom and Belgium. Colistin is considered as one of the last resort treatments against multi-resistant bacteria in human medicine, especially for patients with cystic fibrosis. Alertness is needed and the new resistance mechanism has to be detected properly in animal and human related bacteria.

## COLISTINE ALS LAATSTE REDMIDDEL VOOR DE MENS

De incidentie van infecties bij mensen veroorzaakt door multiresistente carbapenemase producerende *Enterobacteriaceae*, zoals *E. coli* en *Klebsiella (K. pneumoniae)*, en door multiresistente stammen van *Pseudomonas (P. aeruginosa)* en *Acinetobacter* spp. neemt wereldwijd toe. Recente cijfers tonen aan dat dit ook in België het geval is (Catry et al., 2015). Colistine (= polymyxine E) werd, na een terughoudend gebruik te wijten aan neuro- en nefrotoxische bijwer-

kingen, de laatste jaren 'herontdekt' als een van de weinige redmiddelen in de bestrijding van deze infecties bij de mens.

Ook in de diergeneeskunde is colistine een belangrijk antibioticum. Het wordt frequent ingezet bij nutsdieren voor de behandeling van *E. coli*-infecties bij varkens en runderen. Bij varkens werd het gebruik van colistine in 2010 geschat op 30% van het totaal antibioticagebruik in de varkenssector, uitgedrukt in behandel dagen op 1000 (Callens et al., 2012). Neonatale diarree, speendiarree en slingerziekte, veroorzaakt door enterotoxigene (ETEC) en verotoxine



**Figuur 1.** Gebruik van colistine bij dieren in België tussen 2011 en 2014 uitgedrukt in tonnen.

producerende *E. coli* (VTEC) stammen, werden benoemd als de voornaamste redenen voor preventief en metafylactisch colistinegebruik bij jonge en gespeende biggen. Ook bij kalveren wordt colistine ingezet ter bestrijding van neonatale diarree veroorzaakt door ETEC.

### COLISTINERESISTENTIE

Ondanks het veelvuldig gebruik van colistine in de diergeneeskunde (BelVet-SAC, 2014) wordt het voorkomen van resistentie tegen colistine bij diergerelateerde *E. coli*- en *S. enterica*-stammen in België tot op heden relatief beperkt gerapporteerd (Figuur 1). De meest recente rapportering van colistineresistentie bij de indicatorbacterie *E. coli* toonde een voorkomen van 2,66%, 0,61%, 0% en 0,54% resistente stammen bij respectievelijk vleeskalveren, vleesvee, vleeskuikens en varkens, gebaseerd op een epidemiologische cut-offwaarde van 2 µg/ml (CODA-CERVA, 2014; Hanon et al., 2015). Een hogere mate van resistentie (9,6%) werd evenwel gevonden bij pathogene *E. coli* geïsoleerd bij zieke biggen (Boyen et al., 2010). Voor *S. enterica*-serotypes werd in 2012 een resistentiepercentage gerapporteerd van 20,7%, wat een stijging betekent ten opzichte van 2011 (5,5%) (CODA-CERVA, 2012). Stammen van rundvee vertoonden het meest resistentie (68,6%), gevolgd door stammen van kippen (17,5%) en van varkens (10,6%). Een verklaring voor deze hoge cijfers is waarschijnlijk dat natuurlijke resistentie voorkomt bij de serotypes Enteritidis en Dublin, die vaker werden geïsoleerd in 2012 dan in 2011. Voornamelijk bij rund- en pluimvee komen deze serotypes frequent voor. Er werd voorgesteld om voor deze *Salmonella*-serotypes de epidemiologische cut-offwaarden te verhogen, wat een betere inschatting mogelijk maakt van het reële voorkomen van verworven resistentie (Agersø et al., 2012). In 2014 werd voor de *S. enterica*-isolaten van kippen een resis-

tentiepercentage gezien van 9,6% (CODA-CERVA, 2014). In negen andere Europese landen werd resistentie tegen colistine bij *E. coli* en *S. enterica* gerapporteerd als < 1%, terwijl voor zieke dieren hogere resistentiepercentages gezien werden (3%) (Kempf et al., 2013).

Als verklaring voor de relatief lage prevalenties van verworven resistentie tegen colistine werd aangehaald dat deze uitsluitend te wijten was aan mutaties ter hoogte van het bacterieel chromosoom. Dit impliceert dat werd aangenomen dat horizontale overdracht van resistentiegenen via mobiele genetische elementen niet voorkwam. Bovendien werden vele van de mutatiemechanismen beschreven als in vitro niet stabiel (Moskowitz et al., 2012), wat het risico op een snelle spreiding van resistentie reduceerde (Landman et al., 2008).

### OVERDRAAGBARE COLISTINERESISTENTIE

Zeer recent werd evenwel voor het eerst resistentie tegenover colistine beschreven, die horizontaal overdraagbaar is van resistente naar niet-resistente bacteriën via conjugatie (Liu et al., 2015). De *E. coli*-stammen, waarin het zogenaamde *mcr-1* gen, verantwoordelijk voor klinische resistentie tegen colistine in een muismodel (MIC > 2 µg/ml), gevonden werd, werden geïsoleerd bij levende slachtvarkens in China. Ook uit vlees afkomstig van varkens en kippen werden *mcr-1* positieve *E. coli* geïsoleerd. Het gen werd ook gevonden bij *E. coli*- en *K. pneumoniae*-isolaten van ziekenhuispatiënten (Liu et al., 2015) (Tabel 1). De frequentie van het voorkomen bij dieren en op vlees nam bovendien toe tussen 2011 en 2014 (Liu et al., 2015) (Tabel 1). Plasmide-gemedieerde overdracht (pHNSHP4) van het *mcr-1* gen kon in vitro worden aangetoond voor *E. coli* en andere *Enterobacteriaceae*, zoals *K. pneumoniae*, alsook voor *P. aeruginosa*. Het frequenter voorkomen van MCR-1 gemedieerde

**Tabel 1. Prevalentie van *mcr-1* gemedieerde colistineresistentie (naar Liu et al., 2015).**

	Positieve isolaten (%)/aantal isolaten			
<i>Escherichia coli</i>	2011	2012	2013	2014
Varkens bij slacht		31 (14,4%)/216	68 (25,4%)/268	67 (20,9%)/320
Vlees (detail handel)				
<i>Kip</i>	2011		2013	2014
	10 (4,9%)/206		4 (25,0%)/16	21 (28,0%)/75
<i>Varken</i>	2011		2013	2014
	3 (6,3%)/48		11 (22,9%)/48	29 (22,3%)/130
Ziekenhuispatiënt				2014
				13 (1,4%)/902
<i>Klebsiella pneumoniae</i>				2014
Ziekenhuispatiënt				3 (0,7%)/420

colistineresistentie bij *E. coli* van bij voedselproducerende dieren dan bij mensen, doet de auteurs vermoeden dat dit type van resistentie eerst voorkwam bij dieren en zich daarna spreidde naar mensen (Liu et al., 2015). Ook de stabiliteit van het pHNSHP4-plasmide waarop het resistentiegen gelegen is, zowel in aan- en afwezigheid van een selectiedruk uitgeoefend door colistine, voorspelt het persisteren ervan in een bacteriële populatie.

Ondertussen werd het *mcr-1* gen ook reeds in Denemarken gevonden na de herscreening van 3000 *E. coli*-stammen (Hasman et al., 2015). Een van deze resistente stammen was afkomstig van een patiënt met septikemie en vijf stammen werden geïsoleerd uit geïmporteerd kippenvlees. Het ging telkens over een multiresistente “extended spectrum beta-lactamase” (ESBL) producerende *E. coli*-stamdrager van een identiek *mcr-1* gen. Het plasmide waarop het *mcr-1* gen zich bevond, was evenwel verschillend van het plasmide gevonden bij de stammen uit China. Dit toont aan dat het *mcr-1* gen kan spreiden op zich, alsook via een plasmide, wat het risico vergroot op een snelle spreiding van dit resistentiegen.

Ook in Frankrijk werd hetzelfde *mcr-1* gen ontdekt door de herscreening van diergerelateerde *S. enterica*-isolaten (Webb et al., 2015). In Nederland werd het *mcr-1* gen gevonden in ESBL-producerende *E. coli* geïsoleerd bij reizigers na thuiskomst in Nederland (Arcilla et al., 2015). Deze preliminaire data geven aan dat de horizontaal overdraagbare colistine-resistentie ook reeds in Europa circuleert en dat er bij gevolg vermoedelijk vaker detectie zal volgen in de komende maanden en jaren.

Isolaten die fenotypisch verworven resistentie vertonen tegen colistine, moeten nauwkeurig gescreend worden op het voorkomen van dit resistentiegen. In België werd het *mcr-1* gen gevonden in één *S.*

*enterica*-isolaat van kippenvlees (Katelijne Dierick, WIV, persoonlijke communicatie), alsook in dertien pathogene *E. coli*-stammen geïsoleerd bij biggen en kalveren met diarree (Malhorta-Kumar, et al. 2016). Het gebruik van colistine in de diergeneeskunde wordt, door de exclusiviteit van het antibioticum als een van de laatste opties tegen multiresistente bacteriën bij mensen al langer scherp in de gaten gehouden (Moore en Elborn, 2012). De rapportering van horizontaal overdraagbare resistentie tegen colistine zal het gebruik ervan in de diergeneeskunde, ondanks het hoog therapeutisch belang voor de behandeling van darmgerelateerde infecties door *Enterobacteriaceae* bij voedselproducerende dieren, ongetwijfeld verder onder druk zetten.

## GEBRUIK VAN COLISTINE IN BELGIË VERMINDERD

In 2014 werd voor het eerst sinds de eerste rapportering van antibioticagebruik bij dieren in België een heuse daling in het gebruik van colistine bij dieren waargenomen (BelVet-SAC, 2014) (Figuur 1). De daling van 28,1% tussen 2013 en 2014 is vermoedelijk gerelateerd aan het gebruik van zinkoxide (ZnO) als alternatief voor colistine in de preventie van speendiarree bij biggen. ZnO aan farmacologische dosering (2500 ppm) is, mede dankzij een positief advies van het kenniscentrum voor antibioticagebruik en -resistentie bij dieren in België (AMCRA) en met als doel het colistinegebruik te reduceren, sinds september 2013 toegelaten in België ter preventie van speendiarree in de eerste veertien dagen na het spenen van biggen. Echter, gegeven de zeer brede inzet van ZnO sinds de toelating ervan, is de waargenomen reductie van colistine in 2014 lager dan initieel verwacht werd



(BelVet-SAC, 2014). Dit houdt in dat een verdere daling van het colistinegebruik mogelijk moet zijn. Aan colistine werd door AMCRA kleurcode oranje toegekend. Dit impliceert dat er een additionele laboratoriumtest ter bevestiging van de diagnose dient uitgevoerd te worden. Het uitvoeren van een gepaste gevoeligheidstest vóór elk gebruik ervan is aangewezen om onnodig gebruik te voorkomen (Boyen et al., 2010). AMCRA kende deze kleurcodes toe op basis van de richtlijnen van de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) en de Werelddierengezondheidsorganisatie (OIE). Door de European Medicines Agency (EMA) werd colistine volgens de laatste verslaggevingen ingedeeld bij de antibiotica met een laag risico op overdracht van resistentiegenen en resistente bacteriën en dus met een laag risico voor de volksgezondheid (EMA, 2014). Gezien de meest recente bevindingen over de horizontale overdraagbaarheid van colistineresistentie, is het waarschijnlijk dat deze risico-inschatting zal moeten herzien worden door bovengenoemde instanties.

## PREVENTIE

Het gebruik van colistine zal verder onder de loep genomen moeten worden en zoveel als mogelijk moeten worden vermeden. Het belangrijkste medicamenteuze alternatief tegen spendiarree bij biggen op heden is ZnO. Daar het gebruik ervan leidt tot coselectie van methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), wat zowel in experimentele studies als in veldproeven werd aangetoond (Cavaco et al., 2011; Moodley et al., 2011; Slifierz et al., 2015) en eventueel andere (multi)resistente bacteriën (Bednorz et al., 2013), dient het gebruik ervan als een tijdelijke maatregel beschouwd te worden. Andere preventieve maatregelen, zoals optimale voeding, voedingsadditieven, bioveiligheidsmaatregelen en vaccins, voor het gebruik bij biggen en pluimvee, dienen verder ontwikkeld en geïmplementeerd te worden ter preventie van neonatale diarree, slingerziekte en colibacillose bij biggen en pluimvee. Indien behandeling toch noodzakelijk blijkt te zijn, kunnen ook andere antibiotica dan colistine aangewend worden tegen *E. coli*- en *S. enterica*-gerelateerde infecties zoals beschreven in het formularium voor verantwoord gebruik van antibacteriële middelen bij varkens, rundvee en pluimvee (AMCRA, 2014).

## CONCLUSIE

Bij resistentie tegenover colistine werd er aanvankelijk enkel gesproken over een mutatiegedemedieerde resistentie. Sinds kort is nu ook plasmidegedemedieerde resistentie opgedoken. Het *mcr-1* gen verantwoordelijk voor colistineresistentie is al een tijdje onopgemerkt aanwezig, aangezien het gen in historische collecties aangetoond kon worden. Ondanks de rap-

portering van relatief lage prevalenties van colistine-resistentie bij *E. coli*- en *S. enterica*-stammen tijdens monitoringstudies, blijkt het verantwoordelijke resistentiegen al voor te komen in verschillende bacteriële species en op verschillende plasmiden.

Dit wijst op een potentieel explosieve situatie die de nodige opvolging vereist. Mogelijk is deze resistentie aanwezig in verschillende andere darmbacteriën. Onderzoek naar het voorkomen en de wijze van het zich spreiden van het resistentiegen dringt zich op. Ook dient nagegaan te worden of er klinische resistentie aanwezig is, en dus of infecties met *Enterobacteriaceae* of andere met colistine te behandelen bacteriën bij mens en dier nog behandelbaar zijn aan de voorgeschreven dosissen. Verder dient gezocht te worden naar valabele alternatieven voor de bestrijding van ziekten waartegen colistine gebruikt wordt.

## REFERENTIES

- Agersø Y., Torpdahl M., Zachariassen C., Seyfarth A., Hammerum A.M., Nielsen E.A. (2012). Tentative colistin epidemiological cut-off value for *Salmonella* spp. *Food-borne Pathogens and Disease* 9 (4), 367-369.
- AMCRA. (2014). *Formularium voor Verantwoord Gebruik van Antibacteriële Middelen bij Varkens, Rundvee en Pluimvee*. Eerste editie, versie 1.1.
- Arcilla M.S., van Hattem J.M., Matamoros S., Melles D.C., Penders J., de Jong M.D., Schultz C. (2015). *The Lancet Infectious Diseases*, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00541-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00541-1)
- Bednorz C., Oelgeschläger K., Kinnemann B., Hartmann S., Neumann K., Pieper R., Bethe A., Semmler T., Tedin K., Schierack P., Wieler L.H., Guenther S. (2013). The broader context of antibiotic resistance: zinc feed supplementation of piglets increases the proportion of multi-resistant *Escherichia coli* in vivo. *Internal Journal of Medical Microbiology* 303(6-7), 396-403.
- BelVet-SAC. Belgian Veterinary Surveillance of Antibacterial Consumption. (2015). National consumption report 2014. Available online: [http://www.belvetsac.ugent.be/pages/home/BelvetSAC\\_report\\_2014%20finaal.pdf](http://www.belvetsac.ugent.be/pages/home/BelvetSAC_report_2014%20finaal.pdf) (Accessed 26 August 2015)
- Boyen F., Vangroenweghe F., Butaye P., De Graef E., Castryck F., Heylen P., Vanrobaeys M., Haesebrouck F. (2010). Disk prediffusion is a reliable method for testing colistin susceptibility in porcine *E. coli* strains. *Veterinary Microbiology* 144, 359-362.
- Callens B.F., Persoons D., Maes D., Laanen M., Postma M., Boyen F., Haesebrouck F., Butaye P., Catry B., Dewulf J. (2012). Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds. *Preventive Veterinary Medicine* 106, 53-62.
- Cavaco L.M., Hasman H., Aarestrup F.M. (2011). Zinc resistance of *Staphylococcus aureus* of animal origin is strongly associated with methicillin resistance. *Veterinary Microbiology* 150, 344-348.
- Catry B., Cavaleri B., Baptiste K., Grave K., Grein K., Holm A., Jukes H., Liebana E., Navas A.L., Mackay D., Magiorakos A.-P., Romo M.A.M., Moulin G., Madero C.M., Pomba M.C.M.F., Powell M., Pyörälä S., Rantalala M., Ruzauskas M., Sanders P., Tealen C., Threlfall E.J.,

- Törneke K., van Duijkeren E., Edo J.T. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *International Journal of Antimicrobial Agents* 46, 297-306.
- CODA-CERVA. (2014). *Report on Susceptibility of Salmonella Serotypes in Belgium*.
- CODA-CERVA. (2014). *Antimicrobial Resistance in Indicator Commensal Bacteria from Livestock in Belgium: Trend Analysis 2011-2013*.
- Hanon JB., Jaspers S., Butaye P., Wattiau P., Méroc E., Aerts M., Imberechts H., Vermeersch K., Van der Stede Y. (2015). A trend analysis of antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from several livestock species in Belgium (2011–2014). *Preventive Veterinary Medicine* 122 (4), 443-452.
- Hasman H., Hammerum A.M., Hansen F., Hendriksen R.S., Olesen B., Agersø Y., Zankari E., Leekitcharoenphon P., Stegger M., Kaas R.S., Cavaco L.M., Hansen D.S., Aarestrup F.M., Skov R.L. (2015). Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Euro Surveill.* 2015;20(49):pii=30085. DOI: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085>
- Kempf I., Fleury M.A., Drider D., Bruneau M., Sanders P., Chauvin C., Madec J., Jouy E. (2013). What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe? *International Journal of Antimicrobial Agents* 42, 379-383.
- Landman D., Georgescu C., Martin D.A., Quale J. (2008). Polymyxins revisited. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 449-465.
- Li J., Nation R.L., Turnidge J.D., Milne R.W., Coulthard K., Rayner C.R., Paterson D.L. (2006). Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases* 6, 589-601.
- Liu Y.-Y., Wang Y., Walsh T. R., Yi L.-X., Zhang R., Spencer J., Doi Y., Tian G., Dong B., Huang X., Yu L.-F., Gu D., Ren H., Chen X., Lv L., He D., Zhou H., Liang Z., Liu J.-H., Shen J. (2015). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance, mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Moodley A, Nielsen S.S., Guardabassi L. (2011). Effects of tetracycline and zinc on selection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) sequence type 398 in pigs. *Veterinary Microbiology* 152, 420-423.
- Moore J.E., Elborn J.S. (2012). Implications for colistin use in patients with cystic fibrosis (CF). Letter in response to “Prophylactic and metaphylactic antimicrobial use in Belgian fattening pig herds.” Callens et al., September 2012. *Preventive Veterinary Medicine* 106, 53-62.
- Moskowitz S.M., Brannon M.K., Dasgupta N., Pier M., Sgambati N., Miller A.K., Selgrade S.E., Miller S.I., Denton M., Conway S.P., Johansen H.K., Hoiby N. (2012). PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56, 1019-1030.
- Slifierz M.J., Friendship R., Weese J.S. (2015). Zinc oxide therapy increases prevalence and persistence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs: a randomized controlled trial. *Zoonoses and Public Health* 62, 301-308.
- Webb H.E., Marault M., den Bakker H., Bugarel M., Scott H.M., Granier S.A., Millemann Y., Nightingale K., Ison S., Loneragan G.H. (2015). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *The Lancet Infectious Diseases*. December, [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00538-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00538-1)

## Gastro-intestinale *Clostridium perfringens*-infecties: een blijvend gevaar in de Belgische rundveehouderij

<sup>1</sup>B. Valgaeren, <sup>2</sup>E. Goossens, <sup>2</sup>S. Verherstraeten, <sup>1</sup>L. Gille, <sup>1</sup>L. Van Driessche, <sup>2</sup>F. Van Immerseel, <sup>2</sup>R. Ducatelle, <sup>1</sup>P. Deprez, <sup>1</sup>B. Pardon

<sup>1</sup> Vakgroep Inwendige Ziekten en Klinische Biologie van de Grote Huisdieren,  
<sup>2</sup> Vakgroep Pathologie, Bacteriologie en Pluimveeziekten,  
Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent,  
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Bonnie.Valgaeren@UGent.be

### SAMENVATTING

De intensivering van de moderne landbouw wordt geassocieerd met een toename van *Clostridium perfringens*-gerelateerde, gastro-intestinale problemen bij intensief gevoede runderen, zoals “hemorrhagic bowel disease” bij hoogproductief melkvee en enterotoxemie bij kalveren. Waar de pathogenese van hemorrhagic bowel disease nog grotendeels ongekend is, werden er de laatste jaren nieuwe inzichten in de pathogenese van enterotoxemie bekomen die een belangrijke repercussie op de aanpak van deze ziekte onder praktijkomstandigheden hebben. Ook andere clostridiumgeassocieerde maagdarminfecties, zoals “overeating disease” en neonatale clostridiose, worden regelmatig gediagnosticeerd. Overvoeding met structuurarme, eiwitrijke voeders is een overkoepelende risicofactor bij zowel HBD, enterotoxemie als overeating disease. Een goed uitgebalanceerd dieet dat zo stabiel mogelijk gehouden wordt, is dan ook het belangrijkste aandachtspunt op bedrijven die problemen hebben met clostridiose. Daarnaast dient bij jonge kalveren voldoende aandacht gegeven te worden aan een correcte en hygiënische biestverstrekking om problemen met neonatale clostridiose te vermijden.

### INLEIDING

Heden worden een toenemende specialisatie van een exclusieve vlees- of melkproductie en een sterke schaalvergroting waargenomen (Landbouwrapport Vlaanderen, 2012). Deze specialisatie gaat gepaard met een intensivering, waarbij vaak zeer energie- en eiwitrijke diëten worden ingezet. Deze intensieve voederschema's, die zowel in de gespecialiseerde melk- als vleesveehouderij worden toegepast, predisponeren echter voor verschillende gastro-intestinale ziekten, waaronder clostridiuminfecties. Dit vertaalt zich in een verhoogde gevoeligheid voor onder andere “hemorrhagic bowel disease” (HBS) bij hoogproductief melkvee (Ceci et al., 2006; Elhanafy et al., 2013), en voor enterotoxemie bij vleesvee (Lebrun et al., 2010). In het bijzonder voor de praktiserende dierenarts wordt in dit overzichtsartikel een bondig overzicht gegeven van de pathogenese, symptomatologie, diagnose en preventie van de belangrijkste *Clostridium perfringens*-geassocieerde aandoeningen in de moderne rundveehouderij.

### MICROBIOLOGISCHE EIGENSCHAPPEN VAN *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

*C. perfringens* is een opportunistische bacterie en een onderdeel van de normale darmflora van gezonde runderen en kalveren, die onder bepaalde predisponerende omstandigheden ziekte kan veroorzaken. *C. perfringens* is een grampositieve, anaerobe kiem, die echter zeer zuurstoftolerant is en daardoor lang in de stalomgeving kan overleven (Hasal en Hall, 1975). Bovendien vormt de bacterie sporen die op hun beurt ook zeer resistent zijn tegen zuurstof, extreme temperaturen, UV-bestraling en de meeste ontsmettingsmiddelen (Shimizu et al., 2002; Hurst en Merchant, 2001; Orsburn et al., 2008; Doyle, 2002; Paredes-Sabja et al., 2008). Deze zeer resistente sporen zijn de belangrijkste infectieuze celtypes maar moeten omgezet worden naar vegetatieve kiemen in het spijsverteringsstelsel om te kunnen koloniseren en eventueel ziekte te veroorzaken (Hatheway, 1990). De kiem kent een zeer snelle groei en produceert alle enzymen die nodig zijn voor de glycolyse en het glycogeenmetabolisme, waardoor de aanwezigheid van suikers zelden een

limiterende factor is voor de groei. Daarentegen heeft *C. perfringens* in vergelijking met andere bacteriën behoefte aan veel essentiële aminozuren, vitaminen en groeifactoren. De (over)groei van deze bacterie wordt dan ook hoofdzakelijk gelimiteerd door de aanwezigheid van voldoende eiwitten en groeifactoren en slechts in mindere mate door een teveel aan suikers of zetmeel (Fuchs en Bonde, 1957; Shimizu et al., 2002).

Vroeger werd de bacterie ingedeeld in vijf toxintypes (A tot E), gebaseerd op de mogelijkheid van een bepaalde stam om één of meerdere van de vier “major toxines” te produceren. Deze “major toxines” zijn alfatoxine, bètatoxine, epsilon-oxine en iota-toxine (Niilo, 1980). Behalve deze “major toxines” is er echter een heel gamma aan “minor toxines” geïdentificeerd, waarvan sommige eveneens een zeer belangrijke rol blijken te spelen in de pathogenese van verschillende dierziekten, bijvoorbeeld het netB-toxine bij necrotische enteritis bij vleeskuikens (Keyburn et al., 2008). Deze indeling in toxintypes enkel gebaseerd op de productie van de “major toxines” is dus verouderd en kan in de meeste gevallen pathogene en niet-pathogene stammen niet onderscheiden. Bepaalde toxinen zijn consequent aanwezig bij elke stam, zoals onder andere alfatoxine en perfringolysine, terwijl andere toxinen slechts bij bepaalde stammen aanwezig zijn of tot expressie gebracht worden, zoals de andere “major toxines” of bijvoorbeeld het  $\beta$ 2- en het netB-toxine.

## CLOSTRIDIUM PERFRINGENS-GEASSOCIEERDE GASTRO-INTESTINALE AANDOENINGEN BIJ RUNDEREN

Hieronder wordt een overzicht van de belangrijkste clostridium-geassocieerde darmontstekingen bij runderen gegeven.

### Hemorrhagic bowel disease

#### Klinische bevindingen

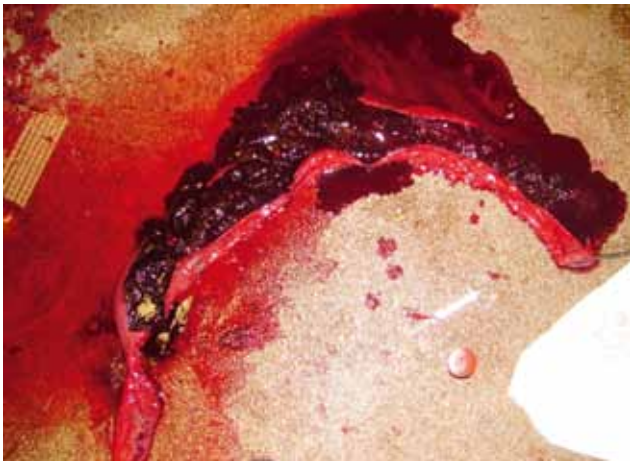
Hemorrhagic bowel disease (HBS) is een opkomende ziekte bij voornamelijk volwassen melkvee en waarvan de exacte oorzaak nog niet is bekend (Godden et al., 2001; Forsberg et al., 2003; Socket et al., 2004; Abutarbush et al., 2004; Abutarbush en Radostitis, 2005; Ceci et al., 2006; Baines et al., 2011; Elhanafy et al., 2013). Op sommige Noord-Amerikaanse hoogproductieve melkveebedrijven is deze aandoening verantwoordelijk voor 30% van de totale uitval van lacterende koeien (Elhanafy et al., 2013). In onze streken wordt HBS minder gezien, alhoewel er ook een duidelijk toenemende incidentie lijkt te zijn. De ziekte wordt gekenmerkt door een acute, progressieve, segmentele necro-hemorragische darmontsteking proximaal in de dunne darm, waarbij in het lumen vaak bloedklonters worden gevonden (Figuur 1).

Dit leidt tot obstructies van het lumen, met klinische tekenen van mechanische ileus, zoals depressie, weinig mestpassage, sufheid, een opgezet abdomen, kolieksymptomen, anorexie, dehydratie, shock, een gedaalde melkgift en uiteindelijk sterfte. Op het rectale onderzoek zijn er ofwel geen afwijkingen, ofwel zijn er enkele opgezette dunne darmen. Op het echografisch onderzoek wordt er vaak een verminderde motiliteit van de dunne darmen opgemerkt en in sommige gevallen kunnen bloedklonters in het lumen van de darm gevisualiseerd worden (Abutarbush et al., 2004). De ziekte verloopt in sommige gevallen zeer acuut, waarbij plotse sterfte kan optreden zonder voorafgaande symptomen (Abutarbush en Radostitis, 2005; Ceci et al., 2006).

#### Pathogenese

HBS is typisch een voedingsgeassocieerde aandoening, die voornamelijk gezien wordt bij hoogproductieve melkkoeien, en met een speciale predispositie van het brownswiss-ras (Berghaus et al., 2005). De ziekte wordt het meest gezien in de herfst en de winter, bij oudere koeien vroeg in de lactatie (Berghaus et al., 2005). “Total mixed ration” (TMR)-diëten rijk aan energie en eiwit met weinig structuur hebben een predisponerend effect (Godden et al., 2001; Berghaus et al., 2005). De ziekte werd reeds geassocieerd met verschillende pathogenen, waaronder *C. perfringens*, maar ook met *Aspergillus fumigatus*, mycotoxinen en shigatoxine-producerende *Escherichia coli*'s (ETEC's) (Forsberg, 2003; Socket, 2004; Elhanafy et al., 2013; Baines et al., 2011).

Er zijn een aantal overeenkomsten tussen HBS bij volwassen runderen en enterotoxemie bij kalveren. Zo zijn er gelijkaardige predisponerende factoren (intensieve voeding), het acute verloop van de ziekte en de aanwezigheid van een necro-hemorragische darmontsteking. Deze vaststelling draagt bij tot het vermoeden dat *C. perfringens* een belangrijke rol speelt in deze aandoening. Bovendien werd *C. perfringens* in hoge concentraties geïsoleerd uit aangetaste darmen (Ceci et al., 2006; Elhanafy et al., 2013). Een groot aantal van de geïsoleerde stammen bracht naast het alfatoxine echter ook het  $\beta$ 2-toxine tot expressie. Het aandeel van deze twee toxinen in de ontwikkeling van de geobserveerde letsels is echter tot op vandaag niet bekend. De overheersende hypothese betreffende de pathogenese van de ziekte is overvoeding met eiwit, met een bacteriële overgroei van *C. perfringens*, gevolgd door toxineproductie. Het alfatoxine zou dan kunnen leiden tot celschade en de productie van ontstekingsmediatoren, waardoor een lokale ontstekingsreactie in gang wordt gezet. In tegenstelling tot enterotoxemie bij kalveren, blijft de reactie bij HBS gelokaliseerd en veroorzaakt ze typisch segmentele hemorrhagische enteritis met bloedklonters in het lumen, terwijl bij kalveren een meer diffuus enteritisbeeld ontstaat. Vervolgens komt het dier terecht in een vicieuze cirkel, waarbij de ontstekingsreactie de



**Figuur 1.** Geresecteerd darmsegment (proximaal jejunum) van een rund met HBS, gevuld met bloedklonters (Foto: B. Valgaeren).

darmbarrière aantast, waardoor dan weer plasma-eiwitten en groeifactoren beschikbaar komen in het darmlumen voor bacteriële overgroei en kiemen en toxinen gemakkelijker in het weefsel diffunderen. Dit kan uiteindelijk leiden tot toxemie en sterfte (Elhafny et al., 2013).

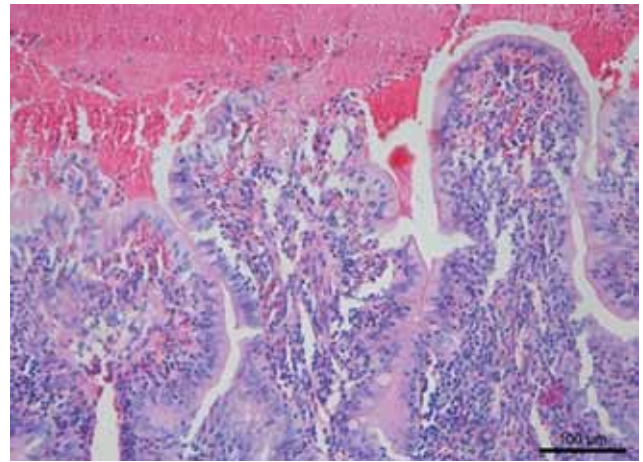
#### *Diagnose, behandeling en bestrijding*

Gezien de gebrekkige kennis van de pathogenese van de uitlokkende pathogenen, zijn geen eenduidige testen beschikbaar. De diagnose is dan ook vaak gebaseerd op de klinische bevindingen, echografie, autopsie en de uitsluiting van andere oorzaken van hemorrhagische enteritis, zoals salmonellose, bovine virale diarree virus (BVDV) en coccidiose. De letsels die gezien worden tijdens exploratieve laparotomie of lijkschouwing zijn zeer typisch. De behandeling van HBS gebeurt vaak chirurgisch door resectie van het aangetaste darmsegment (Figuur 2) of door het doormasseren van de bloedklonters. Er kan ook conservatief behandeld worden met antibiotica en prokinetica. De behandeling is zelden succesvol en de mortaliteit schommelt tussen 85 en 100% (Kirkpatrick et al., 2001; Denisson et al., 2002; Peek et al., 2009; Braun et al., 2010). De aanpak van de ziekte dient dus volledig op preventie gericht te zijn door goed uitgebalançeerde diëten met voldoende structuur en geen hoge eiwitconcentraties. De vaccinatie met commercieel beschikbare vaccins of met autologe toxoïd vaccins is niet in staat om de incidentie van HBS op aangetaste bedrijven te verminderen (Elhafny et al., 2013).

### **Enterotoxemie**

#### *Klinische bevindingen*

Enterotoxemie is een wijdverspreide, fatale darmontsteking bij jonge runderen. De ziekte komt voornamelijk voor in de eerste tien levensweken, hoewel ook



**Figuur 2.** Jejunum. Necrotische toppen van de villi met bloed in het darmlumen. H.E. 20x10. (Foto: K. Chiers).

oudere kalveren aangetast kunnen worden (Muylaert et al., 2010; Troxel et al., 1997). In het verleden werd deze ziekte voornamelijk gezien bij vleesrassen, met een hoge incidentie bij zoogkalveren (Griner en Bracken, 1953; Niilo et al., 1974). Vandaag wordt vooral een zeer hoge uitval ten gevolge van enterotoxemie gezien bij witvleeskalveren. Bij Belgisch witblauwe witvleeskalveren kan tot 20% van de totale mortaliteit aan deze ziekte toegewezen worden (Manteca et al., 2001; Pardon et al., 2012). In tegenstelling tot zoogkalveren wordt bij witvleeskalveren enterotoxemie vastgesteld in de hele productieronde met een piek rond 22 weken na de opzet (Pardon et al., 2012).

De ziekte verloopt steeds zeer acuut en de mortaliteit benadert 100%. Vaak worden de kalveren dood aangetroffen zonder voorafgaande symptomen (Barker et al., 1993). In een minderheid van de gevallen kan sterfte voorafgegaan worden door koliek, zenuwsymptomen en tekenen van agonie (Lebrun et al., 2010; Muylaert et al., 2010; Valgaeren et al., 2013a). Typisch voor de kadavers van kalveren die gestorven zijn aan clostridiose is een zeer snel postmortaal verval met opvallende tympanie van het abdomen (Figuur 3). Bij lijkschouwing wordt een segmentele of veralgemeende hemorrhagische ontsteking van de dunne darm met bloederige inhoud gezien (Lebrun et al., 2010; Manteca et al., 2002), alhoewel bijkomend ook andere darmsegmenten kunnen betrokken zijn (Figuur 4). Histologisch gaat de ziekte gepaard met een typerende necro-hemorrhagische enteritis met erosie van de darmvilli en necrose voornamelijk ter hoogte van de toppen van de darmvilli (Worrall et al., 1987; Manteca et al., 2002; Lebrun et al., 2010; Valgaeren et al., 2013b).

#### *Pathogenese*

Hoewel consequent de term enterotoxemie gebruikt wordt om deze ziekte te beschrijven, bestaat er controverse over de juistheid ervan. Tot op heden kon immers de aanwezigheid van de betrokken toxinen in



**Figuur 3. Acute sterfte in een Belgisch witblauw kalf met opgezet abdomen en opvallende tympanie (Foto: B. Pardon).**

de bloedbaan nooit worden aangetoond. Sommige auteurs spreken dan ook eerder van een *C. perfringens*-geassocieerde necrotische enteritis of hemorragische enteritis.

Recent onderzoek door de auteurs van het huidige artikel heeft enkele belangrijke inzichten in de pathogenese van deze opvallende ziekte opgeleverd. Waar tot enkele jaren geleden de rol van *C. perfringens* wel vermoed werd maar niet ontegensprekelijk bewezen was, kan nu met zekerheid gezegd worden dat zowel het alfatoxine als het perfringolysine een belangrijke rol speelt in de pathogenese van de ziekte (Songer, 1996; Manteca et al., 2001; Verherstraeten et al., 2013). Deze twee toxinen kunnen door elke stam geproduceerd worden, wat tot gevolg heeft dat elke *C. perfringens*-stam in principe het vermogen heeft om onder de juiste omstandigheden ziekte te induceren (Valgaeren et al., 2013b). Nochtans is *C. perfringens* een onderdeel van de normale microbiota bij gezonde kalveren. Onder normale omstandigheden wordt de overgroei van deze kiem geremd door de beperkte beschikbaarheid van nutriënten en door de aanwezigheid van een competitieve flora die een te sterke vermenigvuldiging van deze kiem verhindert door onder andere bacteriocineproductie. Vaak wordt enterotoxemie dan ook gezien na plotse voederwijzigingen of overvoeding, waarbij het normale evenwicht in de microbiota verstoord wordt (Lebrun et al., 2010).

Het zijn dan ook vooral deze predisponerende omstandigheden die de kans op ziekte bij een kalf bepalen en niet de aanwezigheid van *C. perfringens* in de stalomgeving of in de darmflora van het kalf. Wanneer *C. perfringens* samen met melkpoeder in het darmlumen wordt gebracht, predisponeert dit zeer sterk voor de inductie van necro-hemorragische letsels (Valgaeren et al., 2013a). Dit staft de empirische bevinding dat wanneer een kalf in één voederbeurt zeer grote hoeveelheden melk opneemt, dit aanleiding kan geven tot het ontstaan van enterotoxemie. Een mogelijke verklaring hiervoor is de aanwezigheid van onverteerd melkeiwit in de dunne darm, wat een direct schadelijk effect kan hebben op de darmmucosa.



**Figuur 4. Diffuse hemorragische enteritis bij een geval van enterotoxemia (Foto: B. Pardon).**

Een overmatige beschikbaarheid van nutriënten kan hierbij uiteraard een belangrijke factor zijn (Annett et al., 2002). Ook directe effecten op de gastheer kunnen deze predispositie verklaren. Wanneer er schade optreedt aan de darmbarrière, bijvoorbeeld door aanwezigheid van andere noxen in het darmlumen, kunnen er plasma-eiwitten naar het darmlumen lekken, wat overgroei en toxineproductie in de hand kan werken. Bovendien leidt een verzwakte darmbarrière tot meer contact tussen alfatoxine en perfringolysine enerzijds en het onderliggende endotheel, de belangrijkste target van deze twee toxinen anderzijds (Verherstraeten et al., 2013). Dit leidt uiteindelijk tot necrose van de toppen van de darmvilli, waardoor de darmbarrière beschadigd wordt en het dier in een vicieuze cirkel terechtkomt, met onherroepelijk sterfte tot gevolg (Valgaeren et al., 2013).

#### *Diagnose en bestrijding*

De diagnose wordt meestal gesteld op basis van de bevindingen tijdens de lijkschouwing, maar in enkele gevallen kan een bevestiging van een klinisch vermoeden van enterotoxemie nodig zijn. In het verleden werd er vaak bacteriologisch onderzoek verricht van de darminhoud, waarbij het aantal clostridia gekwantificeerd werd. Recent onderzoek toonde echter aan dat zowel de sensitiviteit als de specificiteit van deze techniek zeer laag is, wat verklaard kan worden door de zeer grote variabiliteit, de zeer snelle postmortale overgroei (\*100 binnen 2 uur na sterfte) en de moeilijkheden bij de bewaring en cultuur van anaerobe kiemen. Deze techniek is dus van zeer weinig waarde in de diagnostiek van enterotoxemie (Valgaeren et al., 2013b). Ook toxintypering van geïsoleerde stammen of toxinedetectietesten, zoals deze gebeuren voor ziekten die geïnduceerd worden door bètatoxine- of epsilontoxine-producerende stammen, is van weinig waarde voor het opsporen van enterotoxemie, omdat de belangrijkste betrokken toxinen (alfatoxine en perfringolysine) geproduceerd kunnen worden door alle *C. perfringens*-stammen (Verherstraeten et al.,

2013). Wel kan er verondersteld worden dat er hogere concentraties van deze toxinen worden bereikt in de darmen van aangetaste kalveren. Er zijn echter geen afkapwaarden bekend voor het tijdstip vanaf wanneer het vinden van alfatoxine (of perfringolysine) in de darminhoud als diagnostisch voor enterotoxemie kan worden beschouwd. De histologische letsels zijn vrij typisch en histologisch onderzoek van de darmen kan diagnostisch zijn. Een praktisch probleem is het zeer snelle postmortale verval van voornamelijk de mucosa van de darm, wat de interpretatie bemoeilijkt. Tot op heden zijn er dan ook geen afdoende betrouwbare laboratoriumtechnieken beschikbaar om een klinisch vermoeden van enterotoxemie te bevestigen. Een combinatie van de verschillende diagnostische testen is dan ook aangewezen om tot een zo betrouwbaar mogelijke conclusie te komen.

Gezien het zeer acute verloop van de ziekte en de hoge mortaliteit komt een curatieve behandeling steeds te laat. De bestrijding is dan ook volledig op preventie gericht. Net als voor andere perfringens-gerelateerde ziekten dient een evenwichtig, structuurrijk en vooral stabiel dieet centraal te staan in de preventie van enterotoxemie. Voornamelijk overvoeding met melk of melkvervangers blijkt een zeer belangrijke rol te spelen in de pathogenese en dient dus vermeden te worden (Lebrun et al., 2010; Valgaeren et al., 2013a). Door het voeren van kleinere porties kan darmstase en lebmaagovervloed vermeden worden, wat hypothetisch tot een verminderde kans op enterotoxemie kan leiden. Naast een goed voedermanagement kan ook het gebruik van pro- of prebiotica helpen om het evenwicht in de intestinale microbiota te bewaren en zo overgroei en toxineproductie te vermijden. Sommige prebiotica, bijvoorbeeld lookextracten, en probiotica, bijvoorbeeld *Bifidobacter lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus subtilis*, hebben rechtstreeks inhiberende effecten op *C. perfringens* (Collado et al., 2007; Jimoh et al., 2013; Lee et al., 2013). Er is een zeer grote variëteit aan producten op de markt en er zijn zeer weinig in-vivostudies uitgevoerd naar het gebruik van deze producten bij rundvee.

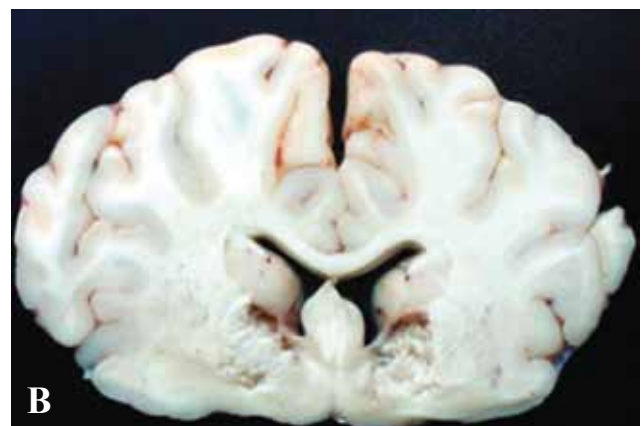
Een derde luik in de preventie van enterotoxemie

is het induceren van immuniteit bij de kalveren. Dit kan via natuurlijke weg of via vaccinatie. Recent werd in een studie aangetoond dat 80% van de kalveren die op jonge leeftijd gespeend werden en intensief gevoerd werden met een dieet bestaande uit ruw- en krachtvoer, spontaan hoge antistoffentiters produceerden tegen het alfatoxine. Hoewel niet specifiek aangetoond werd dat de aanwezigheid van deze antistoffen tegen enterotoxemie beschermt, werd binnen die populatie een lagere incidentie van enterotoxemie vastgesteld dan bij witvleeskalveren. Bij deze witvleeskalveren gevoerd met een hoofdzakelijk vloeibaar dieet van melkvervanger, ontwikkelde slechts 7% vergelijkbare titers. Het spenen op jonge leeftijd blijkt dus de ontwikkeling van een goede immuniteit tegen enterotoxemie in de hand te werken en kan daarom beschermend werken (Valgaeren et al., 2015b). Uiteraard kan er ook gebruik gemaakt worden van vaccinatie om immuniteit bij kalveren te induceren. In tegenstelling tot de situatie bij bèta-toxine- of epsilontoxine-geïnduceerde aandoeningen, worden vanuit de praktijk teleurstellende resultaten gemeld van deze vaccinatie tegen enterotoxemie bij kalveren. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat de commercieel beschikbare vaccins formaldehyde-geïnactiveerde toxoïd bevatten. Deze manier van inactivatie tast de tertiaire eiwitstructuur aan, waardoor de geproduceerde antistoffen nauwelijks beschermen tegen het "wild-type" toxine (Goossens et al., 2015). Mogelijk is het minder stabiele alfatoxine gevoeliger voor deze structuraantasting dan de andere toxinen, waardoor vaccinatie vaak tot teleurstellende resultaten leidt bij enterotoxemie (Songer, 1996; Goossens et al., 2015).

### “Overeating disease”

#### Klinische bevindingen

Deze ziekte wordt vaak onder één noemer met enterotoxemie geplaatst, maar vertoont eigenlijk meer gelijkenissen met 'bloed' bij schapen. De ziekte wordt



**Figuur 5.** Letsels bij kalveren die experimenteel geïnfecteerd werden met een epsilontoxine-producerende *C. perfringens*-stam. **A.** Long met acuut longoedeem. **B.** Corpus striatum met focale, symmetrische encefalomalacia (Filho et al., 2009).

meer gezien bij vleesrassen, hoewel er occasioneel ook uitbraken voorkomen bij intensief gevoederde kalveren van andere rassen. Zowel volwassen runderen (vooral in de afmestperiode), als kalveren kunnen aangetast worden. In tegenstelling tot enterotoxemie, gaat deze ziekte zelden gepaard met gastro-intestinale symptomen, maar eerder met ademhalingsproblemen en zenuwsymptomen, zoals acuut verlies van bewustzijn, hyperesthesie, intermitterende convulsies, decubitus en dyspneu (Niilo et al., 1963). Op lijkschouwing worden longoedeem en een typische focale, symmetrische encefalomalacie gezien (Griesemer en Krill, 1962; Filho et al., 2009) (Figuur 5).

### Pathogenese

In tegenstelling tot necro-hemorragische enteritis die voornamelijk door alfatoxine en perfringolysine wordt veroorzaakt, wordt overeating disease veroorzaakt door het epsilon-toxine. Dit toxine komt enkel voor bij toxinotypes B en D (Aichelmann, 1956; Atkinson, 1998; Griesemer en Krill, 1962; Keast en McBarron, 1954). Het toxine wordt voornamelijk gevormd ter hoogte van het duodenum. Een overmaat aan nutriënten in dit darmsegment predisponert dan ook voor overgroei en toxineproductie. Dit lijkt echter niet specifiek te zijn voor overeating disease en geldt waarschijnlijk voor de meeste *C. perfringens*-geassocieerde aandoeningen. Een te intensieve voeding is hier dan ook de belangrijkste risicofactor in de pathogenese van de ziekte. Daarnaast is het voorkomen van epsilon-toxine-producerende stammen op een bedrijf een belangrijke risicofactor. In tegenstelling tot type A-stammen, die zeer algemeen voorkomen, komen toxinotype B en D minder algemeen voor. Een hoge infectiedruk van deze stammen kan bijdragen tot het ontstaan van uitbraken van de ziekte tijdens de afmestperiode van vleesvee (Niilo et al., 1963). Het epsilon-toxine wordt geproduceerd in de darmen en wordt opgenomen in de bloedbaan, zodat men in dit geval van een echte enterotoxemie kan spreken. Vervolgens veroorzaakt het toxine perivasculair eiwitrijk oedeem, voornamelijk in de hersenen en in de longen, wat tot het typische ziektebeeld en de typische letsels leidt (Niilo et al., 1963).

### Diagnose en bestrijding

De diagnose wordt meestal gesteld op basis van de typische klinische symptomen en letsels en kan bevestigd worden door de detectie van het epsilon-toxine in de darminhoud, bloedbaan of weefsels van aangeaste dieren (Filho et al., 2009).

De belangrijkste preventiemaatregel is ook hier een goed uitgebalanceerde voeding, waarbij voldoende structuur wordt aangeboden zonder een grote eiwitovermaat (Niilo et al., 1963).

Net zoals bij kleine herkauwers kan ook bij runderen gevaccineerd worden tegen het epsilon-toxine



**Figuur 6.** Maagdarmstelsel van een kalf met necro-hemorragische abomaso-entero-tyflocolitis (Foto: B. Pardon).

met de commercieel beschikbare clostridiumvaccins. Hoewel er geen studies beschreven zijn waarin het effect van deze vaccinatie bij runderen onderzocht werd, werden bij enkele gerapporteerde gevallen uit de praktijk goede effecten van deze vaccinatie waargenomen; dit in tegenstelling tot de situatie bij enterotoxemie.

### Necrotische enteritis bij neonatale kalveren

#### Klinische bevindingen

Net als de overige clostridium-geassocieerde aandoeningen, kent necrotische enteritis bij neonatale kalveren een zeer snel verloop. De ziekte wordt voornamelijk bij vleeskalveren van nul tot zeven dagen oud gezien die ofwel plots sterven, ofwel erg acute, vaak bloederige diarree vertonen. Andere klinische tekenen die met deze ziekte gepaard gaan, zijn anorexie, zwakte, sufheid, een opgezet abdomen en kolieksymptomen (Niilo et al., 1974; Garcia et al., 2013). De letsels situeren zich hoofdzakelijk (maar niet uitsluitend) in de dunne darmen die opvallend gestuwd of hemorragisch zijn. Naast de dunne darmen kunnen ook de pens, netmaaglebmaag, caecum en het colon aangetast zijn (Figuur 6). Histologisch worden een villusatrofie, diffuse bloedingen en een leukocytinfiltratie gezien. Bijkomend kunnen segmentele necrotiserende vasculitis en fibrineuze trombi in de bloedvaten van de mucosa worden vastgesteld. Deze letsels zijn zeer sterk suggestief voor een clostridiuminfectie en kunnen dan ook als diagnostisch worden beschouwd.



## Pathogenese

De belangrijkste virulentiefactor van *C. perfringens* die geassocieerd wordt met deze ziekte is het bètatoxine, dat enkel voorkomt bij toxinotypes B en C. Dit toxine vormt poriën in de enterocyten, waardoor er darmnecrose ontstaat (Garcia et al., 2013). Bèta-toxine is zeer gevoelig voor inactivatie door trypsine. Daarom wordt deze aandoening vooral bij neonatale dieren gezien, waarbij enerzijds de trypsine-inhibitor, aanwezig in colostrum, het bètatoxine beschermt tegen inactivatie door trypsine, en anderzijds het neonatale dier zelf lagere hoeveelheden trypsine produceert (Garcia et al., 2012). Neonatale dieren kunnen besmet worden met bètatoxine-producerende stammen uit een gecontamineerde omgeving, door contact met zieke dieren of asymptomatische uitscheiders (Garcia et al., 2013). Recent werd bovendien vastgesteld dat sondes en materiaal dat gebruikt wordt om biest te verschaffen, gecontamineerd kan worden met clostridiumsporen wanneer deze niet voldoende gereinigd en gedesinfecteerd worden (Valgaeren et al., 2015a).

De diagnose wordt meestal gesteld door het bevestigen van de aanwezigheid van het bètatoxine in de darminhoud (Garcia et al., 2012). Zoals hierboven beschreven kan ook histologisch onderzoek van de verse darm een grote hulp zijn in de diagnostiek van deze aandoening. Desinfectie van al het materiaal dat gebruikt wordt om biest te verschaffen met 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-oplossing na een grondige reiniging is voldoende om zowel sporen als vegetatieve kiemen van *C. perfringens* te doden en de kans op neonatale necrotische enteritis te verkleinen (Valgaeren et al., 2015a). In de praktijk wordt op bedrijven waar er problemen optreden met neonatale clostridiose vaak overgegaan tot vaccinatie van de moederdieren met toxoid vaccins die het bètatoxine bevatten om op die manier de kalveren te beschermen via passieve immuniteit. Hoewel er geen studies konden worden gevonden over de efficiëntie van de vaccinatie voor deze specifieke indicatie worden door pratici ook hier vaak goede resultaten gemeld.

## Hemorragische abomasitis bij neonatale kalveren

### Klinische bevindingen

Deze aandoening leunt sterk aan bij necrotische enteritis en kan er niet altijd van onderscheiden worden. De ziekte gaat gepaard met anorexie, opzetting van het abdomen, regurgitatie, ernstige depressie en shock. De dieren vertonen een bloederige lebmaaghoud en een necro-hemorragische ontsteking van de lebmaagmucosa die vaak gepaard gaat met emfyseem van de wand (Songer en Miskimins, 2005).

## Pathogenese

In tegenstelling tot necrotische enteritis wordt deze ziekte niet geassocieerd met het bètatoxine maar met een klonale overgroei van type A-stammen. Deze stammen produceren enkel het alfatoxine en geen van de andere “major toxines”. Over de verdere pathogenese van deze aandoening is zeer weinig bekend (Manteca et al., 2001; Songer en Miskimins, 2005; Van Kruiningen, 2009). Algemeen wordt aangenomen dat het gebrek aan een competitieve flora en de lage endogene productie van enzymen bij neonatale kalveren bijdragen tot deze aandoening. Bovendien kan het toedienen van grote hoeveelheden colostrum in één voederbeurt, bijvoorbeeld via sondage, leiden tot een uitzetting van de lebmaag, waardoor de pH-daling, de stremming van het colostrum en het legen van de lebmaag vertraagd worden, wat kan predisponeren voor bacteriële overgroei.

## Diagnose en bestrijding

De diagnose wordt meestal gebaseerd op het klinisch verloop van de ziekte en op autopsiebevindingen, eventueel aangevuld met resultaten van het histologisch onderzoek. Aangezien de ziekte geassocieerd wordt met type A-stammen, die een normaal onderdeel zijn van de gastro-intestinale flora, is bacteriologisch onderzoek of toxinedetectie, net zoals voor enterotoxemie, van zeer weinig waarde voor de diagnose van deze aandoening bij oudere kalveren (Valgaeren et al., 2013b).

Gezien de ziekte zeer moeilijk te onderscheiden is van bètatoxine-gemedieerde necrotische enteritis, ligt ook de preventie in dezelfde lijn. Bijkomend wordt een hygiënische verschaffing van colostrum met adequate reiniging en desinfectie van het materiaal uitermate belangrijk geacht wanneer grote hoeveelheden biest in één keer worden verschaft (Valgaeren et al., 2015a).

## CONCLUSIE

*C. perfringens* kan verschillende types gastro-intestinale ontstekingen veroorzaken, waarbij het ziektebeeld voornamelijk afhankelijk is van de leeftijd van het dier en de geproduceerde toxinen. Overvoeding met structuurarme, eiwitrijke voeders blijkt een gemeenschappelijke risicofactor te zijn bij al deze aandoeningen. Een goed uitgebalanceerd dieet dat zo stabiel mogelijk gehouden wordt, is dan ook het belangrijkste aandachtspunt op bedrijven die problemen hebben met clostridiose. Daarnaast dient bij jonge kalveren voldoende aandacht gegeven te worden aan een correcte en hygiënische biestverstrekking om problemen met neonatale clostridiose te vermijden.

## LITERATUUR

- Abutarbush S.M., Carmalt J.L., Wilson D.G., O'Connor B.P., Clark E.G., Naylor J.M. (2004). Jejunal haemorrhage syndrome in 2 Canadian beef cows. *Canadian Veterinary Journal* 45, 48-50
- Abutarbush S.M., Radostits O.M. (2005). Jejunal haemorrhage syndrome in dairy and beef cattle: 11 cases (2001-2003). *Canadian Veterinary Journal* 46, 711-715
- Aichelman W.W., Griner L.A., Brown G.D. (1956). *Clostridium perfringens* type D (ETX) enterotoxaemia in brown Swiss dairy calves. *Journal of American Veterinary Medicine* 140, 154-158
- Annett C.B., Viste J.R., Chirino-Trejo M., Classen H.L., Middleton D.M., Simko E. (2002). Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *Clostridium perfringens* type A. *Avian Pathology* 31, 598-601
- Atkinson P.N. (1998). *Clostridium perfringens* type D in a dairy cow. *Veterinary Record* 142(5), 120
- Bains D., Erb S., Turkington K., Kuldau G., Juba J., Masson L., Mazza A., Robers R. (2011). Mouldy feed, mycotoxins and shiga toxin-producing *Escherichia Coli* colonization associated with jejunal haemorrhage syndrome in beef cattle. *BMC Veterinary Journal* 7, 24
- Barker I.K., van Dreumel A.A., Palmer N. (1993). The alimentary system, disease associated with enteric clostridial infection. In: Jubb V.F., Kennedy P.C., Palmer N. (editors). *Pathology of Domestic Animals*. 5de Ed., vol. 2, Academic Press, New York, p. 213-221
- Berghaus R.D., McCluskey B.J., Callan R.J. (2005). Risk factors associated with haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226, 1700-1706
- Ceci L., Paradies P., Sasanelli M., De Caprariis D., Guarda F., Capucchio M.T., Carelli G. (1998). Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of *Clostridium perfringens* type A in the disease complex. *Journal of Veterinary Medicine Series A* 53, 518-523
- Collado M.C., Sanz Y. (2007). Induction of acid resistance in *Bifidobacterium*: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *Journal of Applied Microbiology* 103(4), 1147-1157
- Doyle E. (2002). Survival and growth of *Clostridium perfringens* during the cooling step of thermal processing of meat products. *FRI briefing*, Food Research Institute.
- Elhanafy M.M., French D.D., Braun U. (2013). Understanding jejunal haemorrhage syndrome. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 243, 352-358
- Filho E.J., Carvalho A.U., Assis R.A., Lobato F.F., Rachid M.A., Carvalho A.A., Ferreira P.M., Nascimento R.A., Fernandes A.A., Vidal J.E., Uzal F.A. (2009). Clinicopathologic features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxaemia in cattle. *Veterinary Pathology* 46(6), 1213-1220
- Forsberg N. (2003). New findings on jejunal haemorrhagic syndrome. *Hoard's Dairyman* 148, 311
- Fuchs R., Bonde G. (1957). The nutritional requirements of *Clostridium perfringens*. *Journal of Genetic Microbiology* 16, 317-329
- Garcia J.P., Beingesser J., Fisher D.J. (2012). The effect of *Clostridium perfringens* type C strain CN3685 and its isogenic beta toxin null mutant in goats. *Veterinary Microbiology* 157, 412-418
- Garcia J.P., Anderson M., Blanchard P., Mete A., Uzal F.A. (2013). The pathology of enterotoxaemia by *Clostridium perfringens* type C in calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 25, 438
- Glock R.D., DeGroot B.D. (1998). Sudden death of feedlot cattle. *Journal of Animal Science* 76, 315-319
- Godden S., Frank R., Ames T. (2001). Survey of Minnesota dairy veterinarians on the occurrence of and potential risk factors for haemorrhage syndrome in adult dairy cows. *The Bovine Practitioner* 35, 97-103
- Goossens E., Verherstraeten S., Valgaeren B., Pardon B., Timbermont L., Schauvliege S., Rodrigo-Mocholi D., Haesebrouck F., Ducatelle R., Deprez P., Van Immerseel F. Toxin-neutralizing antibodies protect against *C. perfringens*-induced necrosis in an intestinal loop model for bovine enterotoxaemia. (In preparation)
- Griesemer R.A., Krill W.R. (1962). Enterotoxaemia in beef calves – 30 years observation. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 140, 154-158
- Griner L.A., Brackken E.K. (1953). *Clostridium perfringens* (type C) in acute haemorrhagic enteritis in calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 122, 99-102
- Hasan S.M., Hall J.B. (1975). The physiological function of nitrate reduction in *Clostridium perfringens*. *Journal of Genetic Microbiology* 87(1), 120-128
- Hatheway C.L. (1990). Toxigenic *Clostridia*. *Clinical Microbiology Reviews* 3(1), 66-98
- Hurst L.D., Merchant A.R. (2001). "High guanine-cytosine content is not an adaptation to high temperature: a comparative analysis amongst prokaryotes". *Processed Biology Science* 268 (1466), 493-497
- Jimoh A., Ibitoye E., Dabai Y., Garba S. (2013). *In vivo* antimicrobial potentials of garlic against *Clostridium perfringens* and its promotant effects on performance of broiler chickens. *Pakistanian Journal of Biology Science* 16(24), 1978-1984
- Keast J.C., McBarron E.J. (1954). A case of bovine enterotoxaemia. *Australian Veterinary Journal* 56, 305-306
- Keyburn A.L., Bannam T.L., Moore R.J., Rood J.I. (2010). NetB, a pore-forming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins (Basel)* 2(7), 1913-1927
- Kirkpatrick M.A., Timms L.L., Kersting K.W., Kinyon J.M. (2001). Jejunal haemorrhage syndrome of dairy cattle. *Bovine Practitioner* 35, 104-116
- Lebrun M., Mainil J.G., Linden A. (2010). Cattle enterotoxaemia and *Clostridium perfringens*: description, diagnosis and prophylaxis. *Veterinary Record* 167, 13-22
- Lee S.H., Lillehoj H.S., Jang S.I., Lillehoj E.P., Min W., Bravo D.M. (2013). Dietary supplementation of young broiler chickens with Capsicum and turmeric oleoresins increases resistance to necrotic enteritis. *British Journal of Nutrition* 110(5), 840-847
- Manteca C., Daube G., Pirson V., Limbourg B., Kaeckenbeeck A., Mainil J.G. (2001). Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves. *Veterinary Microbiology* 81(1), 21-32
- Manteca C., Daube G., Jauniaux T., Linden A., Pirson V., Dettleux J., Ginter A., Coppe P., Kaeckenbeeck A., Mainil J.G. (2002). A role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia? *Veterinary Microbiology* 86(3), 191-202
- Muyllaert A., Lebrun M., Duprez J.N., Labrozso S., Theys

- H., Taminiu B., Mainil J. (2010). Enterotoxaemia-like syndrome and *Clostridium perfringens* in veal calves. *Veterinary Record* 167, 64-65
- Niilo L., Moffat R.E., Avery R.J. (1963). Bovine enterotoxaemia II: experimental reproduction of the disease. *Canadian Veterinary Journal* 4, 288-297
- Niilo L., Harris W.N., Jones G.A. (1974). *Clostridium perfringens* type C in haemorrhagic enterotoxaemia of neonatal calves in Alberta. *Canadian Veterinary Journal* 15, 224-226
- Niilo L. (1980). *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge. *Canadian Veterinary Journal* 21(5), 141-148
- Orsburn B., Melville S.B., Popham D.L. (2008). Factors contributing to heat resistance of *Clostridium perfringens* endospores. *Applied Environmental Microbiology* 74(11), 3328-3335
- Paredes-Sabja D., Torres J.A., Setlow P., Sarker M.R. (2008). *Clostridium perfringens* spore germination: characterization of germinants and their receptors. *Journal of Bacteriology* 190(4), 1190-1201
- Pardon B., De Bleecker K., Hostens M., Callens J., Dewulf J., Deprez P. (2012). Longitudinal study on morbidity and mortality in white veal calves in Belgium. *BMC Veterinary Research* 8, 26
- Shimizu T., Ohtani K., Hirakawa H., Ohshima K., Yamashita A., Shiba T., Ogasawara N., Hattori M., Kuhara S., Hayashi H. (2002). Complete genome sequence of *Clostridium perfringens*, an anaerobic flesh-eater. In: *Proceeding of the National Academy of Science USA* 99(2), 996-1001
- Socket D.C. (2004). Haemorrhagic bowel syndrome. In: *Proceedings of the 2nd Mid-Atlantic Nutrition Conference, Timonium, USA*, 139-145
- Songer G. (1996). Clostridial enteric diseases of domestic animals. *Clinical Microbiology reviews* 9(2), 216-234
- Songer G., Miskimmins D. (2004). *Clostridium perfringens* type E enteritis in calves: two cases and a brief review of the literature. *Anaerobe* 10, 239
- Troxel T.R., Burke G.L., Wallace W.T., Keaton L.W., McPeake S.R., Smith D., Nicholson I. (1997). Clostridial vaccination efficacy on stimulating and maintaining an immune response in beef cows and calves. *Journal of Animal Science* 75(1), 19-25
- Valgaeren B., Pardon B., Goossens E., Verherstraeten S., Schauvliege S., Timbermont L., Ducatelle R., Deprez P., Van Immerseel F. (2013a). Lesion development in a new intestinal loop model indicates the involvement of a shared *Clostridium perfringens* virulence factor in haemorrhagic enteritis in calves. *Journal of Comparative Pathology* 149, 103-112
- Valgaeren B., Pardon B., Verherstraeten S., Goossens E., Timbermont L., Haesebrouck F., Ducatelle R., Deprez P., Van Immerseel F. (2013b). Intestinal clostridial counts have no diagnostic value in the diagnosis of enterotoxaemia in veal calves. *Veterinary Record* 172(9)
- Valgaeren B., Pardon B., Verherstraeten S., Goossens E., Timbermont L., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F., Deprez P. (2015a). Haemorrhagic enteritis in new-born calves associated with *Clostridium perfringens* and colostrum delivery. *JMM Case Reports*, In press
- Valgaeren B., Pardon B., Goossens E., Verherstraeten S., Roelandt S., Timbermont L., Van Der Vekens N., Stuyvaert S., Gille L., Van Driessche L., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F., Deprez P. (2015b). Veal calves produce less antibodies against *C. Perfringens* alpha toxin compared to beef calves. *Toxins* 7(7), 2586-2597
- Van Kruiningen H.A., Nyaoke C.A., Lindell K.A. (2009). Clostridial abomasal disease in Connecticut dairy calves. *Canadian Veterinary Journal* 50(8), 857-860
- Verherstraeten S., Goossens E., Valgaeren B., Pardon B., Timbermont L., Vermeulen K., Schauvliege S., Haesebrouck F., Ducatelle R., Deprez P., Van Immerseel F. (2013). The synergistic necrohaemorrhagic action of *Clostridium perfringens* perfringolysin and alpha toxin in the bovine intestine and against bovine endothelial cells. *Veterinary Research* 19, 44-45
- Worrall E.E., Natalia L., Ronohardjo F., Partoutomo S., Tarmudji V. (1987). Enterotoxaemia in water buffaloes caused by *Clostridium perfringens* type A. *Veterinary Record* 121, 278-279

BESTRIJDING VAN *STREPTOCOCCUS SUIS*-INFECTIES BIJ BIGGEN

## VRAAG

**“Kan het wassen van zeugen overdracht van *Streptococcus suis*-bacteriën van zeug naar big verhinderen?”**

## ANTWOORD

*Streptococcus suis* (*S. suis*) komt bij varkens voor in de bovenste luchtwegen, vooral ter hoogte van de tonsillen en de neus, en in het urogenitale en maag-darmstelsel. Bij de meeste dragerdieren worden geen klinische symptomen vastgesteld. Meestal zijn er in eenzelfde dier ook meerdere serotypes van *S. suis* aanwezig.

Tussen bedrijven gebeurt transmissie vooral via het transport van subklinisch geïnfecteerde dieren. Binnen een bedrijf infecteren de zeugen de biggen tijdens de geboorte via contaminatie door de vaginale microbiota (Cloutrier et al., 2003) en na de geboorte via excreties en secreties. In een studie werden in de tonsillen van biggen van één dag oud dezelfde *S. suis*-stammen gevonden als bij de zeug (Amass et al., 1995). Bij het spenen worden bijna alle biggen besmet met *S. suis*. Echter, niet alle biggen zijn besmet met virulente *S. suis*-stammen (Marois et al., 2007). Naast de transmissie van zeug naar big tijdens en kort na de geboorte is horizontale transmissie belangrijk. Dit is vooral het geval bij klinische uitbraken, waarbij zieke dieren veel kiemen uitscheiden en andere biggen besmetten via direct contact of via aerosolen (Cloutier et al., 2003). *S. suis*-serotype 1- en 2-stammen kunnen ook geïsoleerd worden van voederbakken van biggen en zeugen (Robertson et al., 1991), wat erop wijst dat contaminatie van de omgeving mogelijk is. Ook vliegen kunnen *S. suis* herbergen en een rol spelen in de transmissie binnen en zelfs tussen bedrijven. *S. suis* serotype 2-stammen kunnen bij vliegen minstens vijf dagen vastgesteld worden en de vliegen kunnen de materialen waarop ze zitten contamineren voor minstens vier dagen (Enright et al., 1987). Het is niet duidelijk in hoeverre andere dieren, zoals vogels belangrijk zijn als reservoir of vector voor de verspreiding van *S. suis*.

De overleving van *S. suis* in de stalomgeving werd vooral bestudeerd voor *S. suis*-type 2-stammen. De overleving in water bij 4°C bedroeg één tot twee weken. In experimenteel geïnculeerde feces was de overleving 104 dagen (0°C), 10 dagen (9°C) en 8 dagen (22-25°C). In stof was de overleving 54 dagen (0°C), 25 dagen (0°C) en 0 dagen (22-25°C). In de zomer (22-25°C) kan de kiem dus ongeveer 8 dagen overleven in feces en minder dan 24 uur in stof (Clifton-Hadley en Enright, 1984). De kiem wordt vrij snel (minder dan één minuut) geïnactiveerd door courant gebruikte desinfectantia. Als algemene regel geldt dat

alvorens te ontsmetten eerst het organisch materiaal moet verwijderd worden want het vermindert sterk de efficaciteit van de desinfectantia. *S. suis* overleeft tot ongeveer 2 uur in water van 50°C en slechts 10 minuten in water van 60°C. Toch geeft men aan dat het reinigen met warm water weinig extra effect heeft omdat het water zeer snel afkoelt op de oppervlakten die men reinigt (Clifton-Hadley en Enright, 1984).

Om de infectiedruk in de kraamstallen te verminderen, is het dus belangrijk om de afdelingen goed te reinigen en te ontsmetten alvorens de hoogdrachtige zeugen erin worden gebracht. Het wassen van de zeugen kan helpen om (fecale) bevuiling van de huid, met eventuele aanwezige wormeieren en ziektekiemen (vooral maagdarmpathogenen, zoals *E. coli* en *Clostridia*, maar ook *Staphylococcus hyicus* en *S. suis*), te verwijderen (Donavan, 2003; Kemper en Preissler, 2011). In dit opzicht kan het wassen van de zeugen bijdragen tot het verminderen van de overdracht van *S. suis*-kiemen van zeug naar big. Het is niet duidelijk of door het wassen alle *S. suis*-kiemen worden verwijderd van de huid. Verheghe et al. (2013) vonden dat het wassen van zeugen geen invloed heeft op het aanwezig zijn van methicillineresistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) op de huid van zeugen. Zoals hoger aangegeven, is overdracht via de huid van de zeug niet de enige of voornaamste transmissieroute voor *S. suis*. Door het wassen van de zeug wordt infectieoverdracht tijdens de geboorte via het geboortekanaal of na de geboorte via excreties en secreties van de zeug niet verhinderd. Verder zijn de wijze waarop en de plaats waar de zeugen worden gewassen belangrijk. Er wordt geadviseerd om het wassen van de zeugen niet in de pas gereinigde kraamstallen uit te voeren, maar op een plaats buiten de kraamstallen. Het wassen van de zeugen, vooral als het met een hogedrukreiniger gebeurt, geeft aanleiding tot het genereren van aerosolen. Op deze manier kunnen eventuele pathogenen op de huid van de zeug snel en homogeen verspreid worden en aldus de volledige kraamstal contamineren. De gecontamineerde oppervlakten vormen dan een infectiebron voor de biggen. Het belang van ziekteoverdracht via dergelijke aerosolen werd eerder aangetoond voor het klassieke varkenspest virus. Elbers et al. (2001) rapporteerden een geval van transmissie van het klassieke varkenspestvirus tussen bedrijven via aerosolen die waren ontstaan na het reinigen met een hogedrukspuit van elektrocutiemateriaal om de dieren te euthanaseren op een bedrijf dat moest opgeruimd worden. Gezien het zoönotisch karakter van *S. suis* vormen aerosolen die ontstaan tijdens het gebruik van een hogedrukreiniger ook een potentieel risico voor de mens.

Als besluit kan gesteld worden dat het wassen van hoogdrachtige zeugen de contaminatie van de huid met ziekteverwekkers zoals *S. suis* kan verminderen.

Het zal echter niet leiden tot het verhinderen van de overdracht van *S. suis* naar de biggen omdat er veel andere belangrijke transmissiewegen zijn die door het wassen van de zeugen niet verhinderd kunnen worden. Het wassen van de zeugen gebeurt het beste buiten de kraamstal omdat de gegenereerde aerosolen de kraamstal contamineren.

## REFERENTIES

- Amass S., Clark K., Ching C. (1995). Source and timing of *Streptococcus suis* infection in neonatal pigs: implications for early weaning procedures. *Swine Health and Production* 3, 189-193.
- Clifton-Hadley F., Enright M. (1984). Factors affecting the survival of *Streptococcus suis* type 2. *The Veterinary Record* 114, 584-586.
- Cloutier G., D'Allaire S., Martinez G., Surpenant C., Lacouture S., Gottschalk M. (2003). Epidemiology of *Streptococcus suis* serotype 5 infection in a pig herd with and without clinical disease. *Veterinary Microbiology* 97, 135-151.
- Donovan T. (2003). To wash or not to wash? *Journal of Swine Health and Production* 11, 266-267.
- Elbers A., Stegeman J., De Jong M. (2001). Factors associated with the introduction of classical swine fever virus into pig herds in the central area of the 1997/98 epidemic in the Netherlands. *The Veterinary Record* 149, 377-382.
- Enright M., Alexander T., Clifton-Hadley F. (1987). Role of houseflies (*Musca domestica*) in the epidemiology of *Streptococcus suis* type 2. *The Veterinary Record* 12, 132-133.
- Kemper N., Preissler R. (2011). Bacterial flora on the mammary gland skin of sows and in their colostrum. *Journal of Swine Health and Production* 19, 112-115.
- Marois C., Le Devendec L., Gottschalk M., Kobisch M. (2007). Detection and molecular typing of *Streptococcus suis* in tonsils from live pigs in France. *Canadian Journal of Veterinary Research* 71, 14-22.
- Robertson I., Blackmore D., Hampson D., Fu Z. (1991). A longitudinal study of natural infection of piglets with *Streptococcus suis* types 1 and 2. *Epidemiology and Infection* 107, 119-126.
- Verheghe M., Crombé F., De Man I., Haesebrouck F., Butaye P., Heyndrickx M., Rasschaert G. (2013). Preliminary study of the effect of sow washing, as performed on the farm, on livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin status and strain variability. *Journal of Swine Health and Production* 21, 313-318.

Prof. dr. D. Maes

Eenheid Gezondheidszorg Varken

Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfsdiergeneeskunde

Faculteit Diergeneeskunde, UGent,

Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

Dominiek.Maes@UGent.be

---

## SCHIJNDRACHT BIJ GEITEN

---

### VRAAG

**“Wat zijn de huidige inzichten omtrent het ontstaan en behandelingsmogelijkheden voor pseudolactatie bij de melkgeit?”**

### ANTWOORD

Hydrometra of schijndracht is bij geiten een veelvoorkomend probleem en bekend bij geitenhouders. Bij hydrometra vormt zich vocht in de baarmoeder en vertoont de geit alle kenmerken van drachtigheid. Ze komt niet meer in bronst (anoestrus) en de omvang van de buik neemt toe. Ook is er vaak een ontwikkeling van uierweefsel en zelfs melkgift. Net zoals bij een gewone dracht is steeds een corpus luteum aanwezig. In de baarmoeder stapelt zich aseptisch anechoogeen vocht op dat door klieren van de baarmoederwand geproduceerd wordt en een andere samenstelling heeft dan amnionvocht. De inhoud van de baarmoeder bij een hydrometra ligt tussen 250 ml en 8 liter.

Hydrometra kan zich doorheen gans het jaar voordoen, maar komt eerder voor na het bronstseizoen; zowel bij geiten die door een bok gedekt werden (maar niet drachtig werden) als bij geiten die niet met een bok in contact kwamen. Schijndracht wordt eerder gezien bij geiten die reeds enkele malen gelammerd

hebben dan bij primipare of nullipare dieren. Melkgeiten zijn gevoeliger om de aandoening te ontwikkelen dan geitenrassen die voor het vlees gehouden worden. In een geitenkudde ontwikkelt gemiddeld 9% van de dieren de stoornis, met variaties tussen 3% en 20%. Geiten die niet jaarlijks lammeren, hebben meer kans om schijndracht te ontwikkelen. Rekening houdend met het feit dat duurmelken meer en meer voorkomt in de geitenhouderij, zal het probleem wellicht nog toenemen. Wat de exacte oorzaak is van de aandoening is niet geheel duidelijk, maar er wordt aangenomen dat er door een hormonale storing onvoldoende luteolyse van het corpus luteum is.

De diagnose kan het beste gesteld worden door met een lineaire echosonde de liesstreek van de geit te scannen. Er wordt anechoogeen vocht waargenomen in de baarmoeder maar een vrucht of vruchtvliezen zijn niet aanwezig. Om een werkelijke dracht van schijndracht te differentiëren, kan drachtcontrole dan ook het beste tussen de 40 en 70 dagen na inseminatie of dekking uitgevoerd worden, omdat vruchtdelen of vruchtvliezen dan reeds duidelijk zichtbaar zijn.

Wanneer het probleem van schijndracht niet behandeld wordt, dan zal in de meeste gevallen geaccumuleerd vocht op geregelde tijdstippen als vaginale uitvloeï naar buiten komen, maar er zal geen afbraak zijn van het corpus luteum en nieuw vocht zal steeds

gevormd en opgestapeld worden. Dit brengt in de eerste plaats langdurige infertiliteit met zich mee maar kan ook leiden tot infectie van de baarmoeder of obstructie van andere organen wegens dilatatie van de baarmoeder. Behandelen is dus aangewezen, hoewel soms een spontane “cloudburst” kan voorkomen met nadien een normale cyclus, en met genezing als gevolg.

Wat de behandeling betreft, kan er het beste tweemaal prostaglandine F2 $\alpha$  (2,5mg) IM toegediend worden met een tussentijd van 12 dagen. Bij hydrometra is een corpus luteum persistens altijd aanwezig en is het progesterongehalte in het bloed steeds te hoog. Prostaglandinen breken het corpus luteum persistens af en zorgen dus voor een daling van de progesteronspiegel. De behandeling leidt tot het ledigen van de baarmoeder ten laatste vier dagen na de injectie. Dit gaat meestal gepaard met ritsheid (bronst). Het ledigen van de baarmoeder is duidelijk op te merken omdat de achterhand van de geit geheel nat is, hetgeen “cloudburst” wordt genoemd. De behandeling slaat steeds aan, maar na een cloudburst treedt vaak opnieuw een accumulatie van vocht in de baarmoeder op, zodat een tweede toediening van prostaglandine aangewezen is. Dit wordt het beste 12 dagen na de eerste injectie gegeven. Wordt de behandelde geit strikt opgevolgd en echografisch onderzocht korte tijd na de behandeling, dan is een tweede injectie in principe niet nodig op voorwaarde dat geen accumulatie van vocht via echografie wordt vastgesteld. Wordt de geit tijdens de ritsheid gedekt, dan is er een goede kans dat ze drachtig wordt en is een PG2 $\alpha$ -behandeling natuurlijk niet meer nodig.

Soms wordt ook bromocryptine gebruikt om hydrometra te behandelen omdat deze als prolactine-inhibitor de prolactine in het bloed doet dalen. Het is

een feit dat het prolactineniveau in het bloed van geiten met hydrometra vaak te hoog is. Maar dit is volgens onderzoek slechts het geval in de helft van de gevallen. Er kan dan ook getwijfeld worden aan het nut van het toedienen van bromocryptine in de gevallen van hydrometra waar het prolactineniveau normaal is. In de gevallen waarin het effectief te hoog is, brengt het toedienen van bromocryptine een daling van het prolactineniveau met zich mee, wat dan weer afbraak van het corpus luteum persistens (met een daling van het progesterongehalte) kan veroorzaken. Omdat in de praktijk een voorafgaande bloedafname om het prolactineniveau te bepalen, kosten meebrengt, lijkt een behandeling met PG F2 $\alpha$  dan ook logischer en is minstens even efficiënt.

Er is eveneens beschreven dat de toediening van oxytocine leidt tot een cloudburst, op voorwaarde dat deze twee keer per dag IM gedurende vier opeenvolgende dagen wordt toegediend (50 IU). De langdurige toediening van oxytocine veroorzaakt luteolyse van het corpus luteum, wellicht doordat meer endogene prostaglandine geproduceerd wordt. Gezien de omslachtigheid van acht injecties gedurende vier dagen, is een behandeling met prostaglandine F2 $\alpha$  verkiesbaar. Bovendien is ook na het toedienen van oxytocine, de kans vrij groot dat de hydrometra terugkeert. Ook hier is dus opvolging of een tweede behandeling aangewezen.

Dierenarts B. De Temmerman  
Vakgroep Voortplanting, Verloskunde en Bedrijfs-  
diergeneeskunde  
Faculteit Diergeneeskunde, UGent,  
Salisburylaan 133, B-9820 Merelbeke

## Errata

### Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift nr 6-2015

**De eerste korte titel op de voorpagina “*Angiostrongylus vasorum*-infectie bij het varken”**  
moet zijn: “*Actinobacillus pleuropneumoniae*”-infecties bij het varken

### De *Maréchal-Vétérinaire* in de Grande Armée van Napoleon (1805-1815)

pg. 333, Inleiding, tweede regel:

18 juni 1815 moet zijn: 18 juli 2015



**EviBAN**<sup>®</sup>  
Evidence Based Nutraceuticals



**Aminovitasol AD**  
Aanvullend diervoeder  
met natuurlijke  
aminozuren en  
toegevoegde vitaminen



**Osteosol AD**  
Aanvullend diervoeder  
met mineralen,  
sporelementen,  
vitamine B<sub>2</sub> en choline



**Ammo-mix AD**  
Aanvullend diervoeder  
met een hoge  
concentratie  
ammoniumchloride  
en vitamine C



**Diavit Plus**  
Dieetvoedermiddel  
voor gebruik bij  
spijsverteringsstoornissen,  
ter stabilisatie van de  
water en  
elektrolytenbalans



Filip Timmerman (+32) (0)475 36 77 76 • belgium@dopharma.com • www.dopharma.be • www.eviban.eu

**Mediaservice**    
gericht adverteren

Hebben wij al een afspraak?  
**016 28 63 33**



[www.mediaservice.be](http://www.mediaservice.be)

# BRAVECTO®



**2** tabletten per doos  
behandelingen van 12 weken bescherming  
waarborgen op langdurige bescherming

- ✓ **Kauwtablet voor honden**
- ✓ **12 weken bescherming tegen vlooiën**
- ✓ **12 weken bescherming tegen de teken *Ixodes* en *Dermacentor spp.***
- ✓ **8 weken bescherming tegen de teek *Rhipicephalus sanguineus***



Bravecto 112,5 mg kauwtabletten voor zeer kleine honden (2-4,5 kg), Bravecto 250 mg kauwtabletten voor kleine honden (>4,5-10 kg), Bravecto 500 mg kauwtabletten voor middelgrote honden (>10-20 kg), Bravecto 1000 mg kauwtabletten voor grote honden (>20-40 kg), Bravecto 1400 mg kauwtabletten voor extra grote honden (>40-56 kg). Indicaties: Voor de behandeling van teken- en vlooiëninfestaties bij honden. Dit diergeneesmiddel is een systemisch insecticide en acaricide met: onmiddellijke en aanhoudende vlododende werking (*Ctenocephalides felis*) gedurende 12 weken, onmiddellijke en aanhoudende tekendodende werking tegen *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus* en *D. variabilis* gedurende 12 weken, onmiddellijke en aanhoudende tekendodende werking tegen *Rhipicephalus sanguineus* gedurende 8 weken. Vlooiën en teken moeten aangehecht zijn aan de gastheer en beginnen met voeden om blootgesteld te worden aan het werkzame bestanddeel. Binnen 8 uur na aanhechting van vlooiën (*C. felis*) en binnen 12 uur na aanhechting van teken (*I. ricinus*) treedt het effect op. Het product kan gebruikt worden als onderdeel van een behandelingsstrategie tegen vlooiënallergiedermatitis (VAD). Contra-indicaties: Niet gebruiken bij overgevoeligheid voor het werkzame bestanddeel of één van de hulpstoffen. Bijwerkingen: Vaak voorkomende bijwerkingen in klinische studies (1,6% van de behandelde honden) waren milde en voorbijgaande gastro-intestinale verschijnselen zoals diarree, braken, gebrek aan eetlust en kwijlen. De frequentie van het optreden van bijwerkingen is gedefinieerd aan de hand van de volgende indeling: zeer vaak (meer dan 1 op de 10 dieren vertonen bijwerking(en)) gedurende de duur van één behandeling, vaak (meer dan 1 maar minder dan 10 van de 100 dieren), soms (meer dan 1 maar minder dan 10 van de 1.000 dieren), zelden (meer dan 1 maar minder dan 10 van de 10.000 dieren), zeer zelden (minder dan 1 van de 10.000 dieren, inclusief op zichzelf staande meldingen). Dosering en toedieningsweg: Voor oraal gebruik. Bravecto dient toegediend te worden volgens onderstaande tabel (overeenkomstig een dosering van 25-56 mg fluralaner/kg lichaamsgewicht binnen een gewichtsklasse): Gewicht van de hond (kg)/ Sterkte en hoeveelheid van de toe te dienen tabletten: 2-4,5 kg: 1x Bravecto 112,5 mg, >4,5-10 kg: 1x Bravecto 250 mg, >10-20 kg: 1x Bravecto 500 mg, >20-40 kg: 1x Bravecto 1000 mg, >40-56kg: 1x Bravecto 1400 mg. De kauwtabletten dienen niet gebroken of verdeeld te worden. Voor honden boven 56 kg lichaamsgewicht, dient een combinatie van twee tabletten te worden gebruikt die het beste bij het lichaamsgewicht past. Toedieningswijze: Dien Bravecto kauwtabletten toe tijdens of rond een maaltijd. Bravecto is een kauwtablet die door de meeste honden goed wordt geaccepteerd. Als de tablet niet vrijwillig wordt opgenomen kan de tablet met voedsel of direct in de mond gegeven worden. Bij de toediening dient de hond in de gaten gehouden te worden om er zeker van te zijn dat de tablet wordt doorgeslikt. Behandelschema: Voor een optimale controle van een vlooiëninfestatie, dient het diergeneesmiddel toegediend te worden met een interval van 12 weken. Voor een optimale controle van een tekeninfestatie is het tijdstip van een herhalingsbehandeling afhankelijk van de tekensort. EU/2/13/158/001-015

PUB2014\_267

Uitsluitend op diergeneeskundig voorschrift

 **MSD**  
Animal Health