

Environment

AGRO- EN BIOTECHNOLOGIE

ACADEMIEJAAR
2021-2022

Ratten trainen als detectiedier Detecteren van *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in geitenbiest

Bachelorproef voorgelegd tot het behalen van het diploma van
Bachelor in de Agro- en biotechnologie
Afstudeeroptie Dierenzorg
Door Manon De Meester
Promotor: Hilde Vervaecke
Co-promotor: Jo Vicca en Ellen Van Krunkelsven

Dit proefschrift is een examendocument dat niet werd gecorrigeerd voor eventueel vastgestelde fouten. Zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van zowel de promotor(en) als de auteur(s) is overnemen, kopiëren, gebruiken of realiseren van deze uitgave of gedeelten ervan verboden.

Voorwoord

Deze bachelorproef is verwezenlijkt dankzij een grote dosis enthousiasme en inzet. Hiermee verwijs ik niet alleen naar mijn eigen gretigheid en contentement wanneer er een uitdaging voor het grijpen valt, maar ook naar mijn collega's op vier pootjes waaronder Vlekje in het bijzonder. Een speciale bedanking gaat dus uit naar dit knaagdier, die door dik en dun, in voorspoed en tegenslag, zijn enthousiasme en liefde voor zonnebloempitten behield. Zonder Vlekje zou deze studie er heel anders hebben uitgezien, en zonder hem en zijn 3 broers was er helemaal geen studie geweest. Dus hierbij; een dankjewel aan mijn rattenmaatjes! Ze zullen dit nooit lezen, en moesten ze het kunnen lezen zouden ze gewoon hun speurneusjes ophalen voor al die rare toestanden waar wij vreemde mensen ons mee bezighouden. Nu ja, ook heel wat mensen trokken rare bekken wanneer ik vertelde wat mijn eindwerk inhield. "Dus jij traint ratten?" en dan een grimas vol afschuw erbij. Ook veel uitdrukkingen van pure confusie "wacht wat? Ik kan niet meer volgen. Iets over melk en bacteriën? Of ratten en geiten?". Hopelijk wordt na het lezen van dit werk alles wat duidelijker. Anders heb ik mijn werk niet goed gedaan. Ik heb mij tijdens het maken van dit eindwerk soms gefrustreerd en gedesillusioneerd, maar vooral ook geamuseerd, en dat kan niet elke student over zijn eindwerk zeggen.

Uiteraard wil ik ook de mensen bedanken die me hebben gesteund. Ellen Van Krunkelsven wil ik bedanken voor haar goede raad en feedback. Zeker wanneer ik soms met mijn handen in het haar zat omdat de ratten in stenen standbeelden veranderden wanneer iets anders verliep dan de dag ervoor. Ik kon dan rust en motivatie vinden in de geruststellende woorden dat ratten nu eenmaal soms verstenen. Who knew right? Haar ervaring bij APOPO en het werken met speurdieren was echt een hulp. Daarnaast wil ik Jo Vicca bedanken voor de moeite om aan stalen te geraken, zelfs wanneer die er niet waren, en voor de erg accurate telefonische wegbeschrijving wanneer ik volledig het noorden kwijt was toen ik de stalen bij haar thuis ging ophalen. Ook wil ik haar bedanken voor de feedback, in het bijzonder over het stuk in mijn literatuurstudie dat gaat over MAP. Hilde Vervaecke wil ik natuurlijk ook bedanken voor haar feedback en scherp oog voor typo's, maar ook voor de motiverende woorden en ruime selectie aan interessante papers. Een volgende bedanking, en wel de grootse ook, gaat uit naar mijn ouders, die ondanks alles dat er in mijn privéleven is verlopen, in mij bleven geloven. Ook wil ik ze bedanken om de praktische zaken, zoals het allemaal oké vinden dat een kwart van de diepvries nu uit Isomo-bakken vol MAP stalen bestaat. Of dat er in de garage nu een grote kooi staat waar vier ratten in leven. Of het feit dat hun dochter geen rijbewijs heeft en er ergens in de buurt van Leuven stalen moeten worden opgehaald. Ik schrijf het hier dus nog eens zwart op wit voor iedereen die mijn werk gaat lezen: mijn ouders zijn de max!

Samenvatting

In deze bachelorproef wordt een uitgebreide literatuurstudie voorgesteld waarin de thema's paratuberculose, detectiehonden en detectieratten aan bod komen. Er wordt uitgelegd wat paratuberculose is en wat de implicaties zijn op vlak van volksgezondheid en economie. De inzetbaarheid, taken en training van zowel detectiehonden als detectieratten worden overlopen en er wordt gekeken naar de voordelen en de nadelen. Vervolgens worden de doelstellingen onderzocht. De hoofddoelstelling was de vraag of ratten kunnen discrimineren tussen negatieve en positieve bieststalen¹ en of ze een voldoende hoge sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid (accuraatheid) kunnen bekomen. Vier ratten werden dus getraind en het verloop van deze training wordt tot in detail in kaart gebracht. Daarnaast wordt ook bekeken wat de storingsfactoren zijn die de training in de weg stonden en wat het individuele verschil is tussen de vier ratten met betrekking tot gedrag, stressniveau en prestaties. De resultaten van de laatste 20 sessies van de discriminatietraining worden genomen om de sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid te berekenen. Deze 20 sessies worden in twee gedeeld om te zien of deze twee delen gelijkaardig zijn. Ook de trainingsduur wordt besproken. In de discussie worden dan de resultaten overlopen en geïnterpreteerd en zien we dat slechts één van de vier ratten de discriminatietraining heeft afgerond. De resultaten duiden op een goede sensitiviteit van 84% en 83,3%, een hoge specificiteit van 93,9% en 94,4% en een hoge nauwkeurigheid van 91,7% en 92,4%. De conclusie is dat slechts 25% van de subjecten voldoende vordering maakte om de discriminatietraining af te ronden. Gezien de niet ideale trainingsomstandigheden en gebrek aan ervaring met het trainen van ratten, is dit resultaat toch erg goed. In deze studie worden de valkuilen en bedenkingen overlopen en oplossingen gezocht. Indien hier in de toekomst rekening mee wordt gehouden is het dus goed mogelijk om de sensitiviteit, specificiteit en accurateid op te drijven en meer ratten te trainen die voldoende nauwkeurigheid behalen om in de praktijk te kunnen worden ingezet. Dit kan echter enkel verder onderzoek bepalen.

¹ Biest is de eerste melk die het moederdier produceert na de bevalling. Een ander woord is colostrum.

Inhoudstafel

VOORWOORD	2
SAMENVATTING	3
INLEIDING	6
1 DOELSTELLINGEN	7
2 LITERATUURSTUDIE	8
2.1 PARATUBERCULOSE EN MAP	8
2.1.1 <i>Symptomen van paratuberculose</i>	8
2.1.2 <i>Het stellen van de diagnose</i>	9
2.1.3 <i>Verspreiding, opname en overdracht</i>	10
2.1.4 <i>Behandeling, preventie en controle</i>	11
2.1.5 <i>Prevalentie</i>	12
2.1.6 <i>Economische schade</i>	12
2.1.7 <i>Volksgezondheidsprobleem</i>	13
2.2 ZOEKDIEREN	14
2.2.1 <i>De diverse taken van detectiehonden</i>	14
2.2.2 <i>Het verloop van de training van detectiehonden</i>	15
2.2.3 <i>De voordelen bij het inzetten van detectiehonden</i>	17
2.2.4 <i>De valkuilen bij het inzetten van detectiehonden</i>	18
2.3 INZETTEN VAN RATTEN ALS ZOEKDIER	21
2.3.1 <i>Inzetten van ratten bij het opsporen van landmijnen</i>	21
2.3.2 <i>Inzetten van ratten bij het opsporen van Mycobacterium tuberculosis</i>	22
2.3.3 <i>Voordelen bij het inzetten van ratten</i>	22
2.3.4 <i>Bedenkingen bij het inzetten van ratten</i>	23
2.3.5 <i>Training van detectieratten</i>	23
3 MATERIAAL EN METHODEN	25
3.1 SUBJECTEN	25
3.2 OBJECTEN.....	26
3.2.1 <i>De stalen</i>	26
3.2.2 <i>De trainingskooi</i>	26
3.2.3 <i>Hygiëne</i>	28
3.2.4 <i>Notitieboek</i>	28
3.3 DE TRAINING.....	29
3.3.1 <i>Socialisatietraining</i>	29
3.3.2 <i>Clickertraining</i>	29
3.3.3 <i>Fixatietraining</i>	30
3.3.4 <i>Discriminatietraining</i>	32
3.3.5 <i>Werken met blank trials (enkel negatief)</i>	34
3.3.6 <i>Werken met meerdere positieve stalen</i>	34
3.4 DE BLINDE TEST	35
3.5 SENSITIVITEIT, SPECIFICITEIT EN NAUWKEURIGHEID	35
4 RESULTATEN	37
4.1 CLICKERTRAINING.....	37
4.2 FIXATIETRAINING	38
4.2.1 <i>Fase 1</i>	38
4.2.2 <i>Fase 2</i>	40
4.3 DISCRIMINATIETRAINING	42
4.3.1 <i>Fase 1</i>	42

4.3.2	<i>Fase 2</i>	43
4.3.3	<i>Fase 3</i>	44
4.3.4	<i>Fase 4</i>	46
4.4	BIJZONDERE OPSTELLINGEN.....	49
4.4.1	<i>Blank trials</i>	49
4.5	SENSITIVITEIT, SPECIFICITEIT EN NAUWKEURIGHEID.....	50
5	DISCUSSIE	51
5.1	MOGELIJKE OORZAKEN VOOR VALS POSITIEVE EN VALS NEGATIEVE SIGNALLEN.....	51
5.2	TIJDSDUUR.....	52
5.3	EFFECT VAN INDIVIDUELE FACTOREN OP RESULTATEN.....	53
5.4	EFFECT VAN OMGEVINGSFACTOREN OP RESULTATEN.....	54
5.5	SUGGESTIES VOOR BETER TRAININGSPROTOCOL.....	55
5.6	BEDENKINGEN BIJ INZETBAARHEID IN DE PRAKTIJK.....	57
	BESLUIT	59
	LIJST VAN TABELLEN EN FIGUREN	60
	LIJST VAN TABELLEN.....	60
	LIJST VAN FIGUREN.....	60
	BRONNENLIJST	61

Inleiding

Ratten; menig mens krijgt de kriebels bij het denken aan deze kleine trippelende viervoeters, met hun kale staart, zwarte kraalootjes, scherpe snijtandjes en vooral hun reputatie om ziektes met zich mee te dragen. Wie zou er dus aan denken dat net deze diertjes kunnen worden ingezet om te helpen bij het bestrijden van ziekten en het redden van levens? Want jawel, daar doen ze aan mee. De grote Afrikaanse buidelrat heeft een goede reputatie gemaakt dankzij de VZW APOPO, een organisatie die deze ratten traint en inzet tijdens het opsporen van pulmonale tuberculose bij mensen in Zuid Afrikaanse ontwikkelingslanden. Daarnaast worden ze zelfs getraind en ingezet om landmijnen op te sporen, zodat ze door een ontmijningsteam onschadelijk kunnen worden gemaakt (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011; Webb et al., 2020). Ratten zijn dus met andere woorden *under-rat-ed*, tijd dus om hun kwaliteiten verder uit te diepen. Misschien kunnen ze wel een antwoord bieden op problemen waar nog geen goed antwoord op is gevonden, waaronder het paratuberculose probleem in geitenbedrijven. Paratuberculose is een chronische intestinale ziekte bij geiten veroorzaakt door de bacterie *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP) (Sevilla et al., 2008). Het is een dodelijke en extreem besmettelijke ziekte die moeilijk te controleren is door de lange incubatietijd, hoge besmettingsgraad en lastig te stellen diagnose (National Research, 2003; Sevilla et al., 2008; Woo & Czuprynski, 2008). Daarnaast heeft het ook economische gevolgen zoals financiële verliezen voor de veehouder (Garcia & Shalloo, 2015), en zijn er zelfs implicaties op vlak van volksgezondheid. Er is namelijk een link gevonden tussen besmette geitenmelk en de ziekte van Crohn bij mensen (Honap et al., 2021). Een moeilijk probleem dat roept om goedkope, snelle en betrouwbare diagnosemiddelen. Misschien is dit een taak voor viervoeters die er een goede neus voor hebben, namelijk ratten!

1 Doelstellingen

Het doel van deze bachelorproef is om enerzijds te testen of tamme ratten (*Rattus norvegicus*) kunnen discrimineren tussen negatieve bieststalen en positieve bieststalen, besmet met MAP (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*) en met welke sensitiviteit, specificiteit en accuraatheid ze dit doen. Daarnaast worden de factoren bekeken die de training kunnen beïnvloeden zoals de individuele verschillen tussen de ratten met betrekking tot stressgevoeligheid, type van stressgedragingen, motivatie en leertijd, maar omgevingsfactoren zoals geluid en geur. Deze bevindingen worden gebruikt om het trainingsprotocol te verbeteren en de inzetbaarheid van de ratten in de praktijk te kunnen inschatten.

2 Literatuurstudie

2.1 Paratuberculose en MAP

Paratuberculose, ook wel de ziekte van Johne, is een chronische en fatale intestinale ziekte veroorzaakt door *Mycobacterium avium subsp. oftewel de MAP bacterie* (Sevilla et al., 2008). Dit zijn zuurvaste, aerobe bacteriën met een lipide rijk celomhulsel die behoren tot het *Mycobacterium avium*-complex. Ze hebben een erg langzame groei in vergelijking met andere bacteriën en zijn beter bestand tegen warmtebehandelingen dan andere mycobacterie-soorten (Chacon et al., 2004; Schulze-Röbbecke & Buchholtz, 1992). Er zijn drie verschillende stammen beschreven: S-sheep, Cattle-C en B-bison (de Souza et al., 2016). De natuurlijke gastheren van *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* zijn voornamelijk gedomesticeerde herkauwers. Echter kunnen ook niet gedomesticeerde herkauwers besmet raken zoals bizon, herten en elanden en lopen ook konijnen, kraaien, kameelachtigen, zwijnen, ratten, muizen en niet-menselijke primaten risico (Anderson et al., 2007; Beard et al., 2001; Kopečna et al., 2006; Manning et al., 2003; Palmer et al., 2005; Pedersen et al., 2008; Stehman, 1996; Whittington & Sergeant, 2001). In het geval van ratten werd in een studie uit 2000 gezien dat de rattensubjecten niet besmet konden geraken met MAP, en dat ze dus ook geen weefselschade hadden opgelopen door MAP (Koets et al., 2000). In een studie uit 2001 echter werden bij 3 van de 35 ratten wel MAP-bacteriën teruggevonden in het weefsel hoewel er geen weefselschade was (Beard et al., 2001). Het is dus mogelijk dat ratten, hoewel ze een risico lopen op besmetting, niet ziek worden van de bacterie. Bij enkele carnivoren zoals dassen, vossen en wezels is bewezen dat ook zij risico lopen om besmet te raken met MAP, maar dit komt dan waarschijnlijk door predatie op met MAP besmette prooidieren (Palmer et al., 2005). Het is niet zeker of er overdracht tussen verschillende diersoorten mogelijk is, er is echter wel vermoeden naar. De mogelijke overdracht tussen gedomesticeerde en wilde herkauwers baart dan ook zorgen aangezien dit de controle van MAP nog complexer maakt (Anderson et al., 2007; Over et al., 2011). MAP veroorzaakt granulomateuze beschadiging en infectie van het darmweefsel, voornamelijk in het ileum oftewel kronkeldarm, het laatste gedeelte van de dunne darm (Koets et al., 2019). De ziekte is het meest beschreven bij runderen, schapen en geiten. De epidemiologie echter verschilt erg tussen deze drie soorten. Ook het productietype van het dier heeft effect op het verloop van de ziekte. Zo zijn er verschillen tussen vlees- en melkgevende runderen, en tussen schapen en geiten geselecteerd op vlees, wol of melk (Barkema et al., 2018). Bij geiten bijvoorbeeld ontstaat de klinische vorm van de ziekte in een vroeger stadium en is er een minder efficiënte humorale immuniteitsreactie (reactie van de antistoffen en B-lymfocyten) dan bij runderen of schapen. Runderen hebben dan weer erg duidelijk waterige diarree als typisch klinisch symptoom, terwijl dit bij geiten niet het geval is (Robbe-Austerman, 2011).

2.1.1 Symptomen van paratuberculose

Paratuberculose wordt gekenmerkt door chronische diarree, vermagering, verminderde melkproductie en sterfte. Ook door regionale lymfangitis (ontsteking van de lymfevaten, gekenmerkt door rode strepen op de huid) en lymfadenitis (ontsteking van de lymfeklieren, gekenmerkt door gezwollen klieren) alsook granulomateuze enterocolitis (erge ontsteking van de darmen, met typerend korrelig beschadigd weefsel). Grote laesies worden vooral gevonden in de mesenteriale lymfeklieren, gelegen in het mesenterium, een deel van het buikvlies dat de dunne darm in de buikholte fixeert (Olsen et al., 2002; Over et al., 2011). Cachexie (extreem hard vermageren) is vooral bij geiten het duidelijkste symptoom omdat waterige diarree bij geiten niet zo uitgesproken voorkomt, dit in tegenstelling tot bij runderen (Rawther et al., 2012; Shulaw, 2011). Cachexie en spieratrofie zijn het

gevolg van het verminderd vermogen om eiwitten en andere voedingsstoffen op te nemen vanwege de ileale laesies in het later stadium van de ziekte. Naast cachexie kan ook vervelling en schilfering van de huid optreden en wordt de vacht ruw en dof. Zoals eerder vermeld komt diarree bij geiten zelden voor (Clarke, 1997; Sigurðardóttir et al., 2004; Windsor, 2015). Bij een studie op 54 zieke geiten had namelijk maar 7% chronische diarree. 15% had af en toe diarree, 24% had plattere mest dan normaal en 54% had normale faeces. Bij dwerggeiten werd diarree wel vaker waargenomen (GD, 2004). Naast cachexie en andere eerder vernoemde symptomen, kunnen de dieren niet meer omgaan met inspanning en worden ze selectief tijdens het eten (Boelaert et al., 2000; Windsor, 2015). Slechts 10 tot 15% van de dieren vertonen klinische symptomen, en deze worden pas getoond twee tot vier en soms wel tot vijf jaar na de infectie (Woo & Czuprynski, 2008). Voor elk klinisch bevestigd dier zouden dus 25 andere geïnfecteerde dieren zijn die geen symptomen vertonen (Whitlock & Buergelt, 1996). De cel gemedieerde immuniteit verzwakt wanneer het dier geïnfecteerd is. Het kan ook zijn dat er een Th 2-type reactie plaatsvindt via de humorale immuniteit op de plaats van de infectie. Hierdoor ontstaat een ontsteking en verhoogde bloedspiegels van antilichamen gericht tegen de bacteriën (Perez et al., 1997; Sweeney et al., 1998).

2.1.2 Het stellen van de diagnose

De detectie van MAP en het diagnosticeren van paratuberculose is moeilijk. Vanwege de erg lange incubatietijd en de vage symptomen is het niet mogelijk om paratuberculose te diagnosticeren aan de hand van klinisch onderzoek. De meeste symptomen treden pas op in een later stadium van de ziekte en vaak worden gewoon geen symptomen vertoond. Bovendien zijn er ook veel andere ziekten die dezelfde symptomen vertonen. Zo komen abscessen en laesies in de darmen ook voor bij chronische hepatitis en chronische malnutritie (National Research, 2003). MAP zou kunnen worden gedetecteerd aan de hand van MAP-kweekculturen en MAP-isolatietechnieken. Dit wordt echter enorm bemoeilijkt door de zeer langzame groei van deze bacterie (Harris & Barletta, 2001). Deze lange generatietijd kan te wijten zijn aan de dikke celwand. Ook is MAP niet in staat om mycobactine (een siderofoor; ijzerbindende oligopeptide) te produceren in tegenstelling tot andere *Mycobacterium spp*, wat nog een reden kan zijn voor deze trage voortplanting (Rowe & Grant, 2006). Bepaalde MAP-stammen bij runderen groeien zo traag dat het wel 24 weken kan duren voor de eerste zichtbare kolonies in de kweek verschijnen. Ook bepaalde stammen bij schapen, hebben soms maanden nodig (Over et al., 2011). Kweek is ook erg arbeidsintensief en door de intermitterende uitscheiding van MAP, is er een grote onzekerheid over de eigenlijke infectiestatus van de dieren (Souriau et al., 2017). De belangrijkste serologische testen nu zijn complementfixatie (CF) (zoeken van antigenen en antilichamen via serum door te kijken welke complement fixatie er optreedt), agargel-immunodiffusie (AGID) (een serologische reactie in een agar-gel als medium, waarbij een oplosbaar antigen kenbaar wordt door de toevoeging van een antilichaam) en enzymgekoppelde immunosorbenttest (ELISA) (Het reageren van antilichamen op antigenen die gebonden zijn aan enzymen welke een kleuring doen ontstaan) (Yakes et al., 2008). Dankzij het lipoarabinomannan-antigen kan MAP snel via een ELISA test gevonden worden in mest, melk of vlees van een geïnfecteerd dier (Sugden et al., 1989; Sweeney et al., 1994; Sweeney et al., 1992). De resultaten voor dit soort ELISA test zijn beschikbaar binnen 1 tot 2 uur na de eerste bereiding van de microtiterplaten, waarna deze resultaten verder kunnen worden onderzocht. Deze test is dus veel sneller dan onderzoek via kweek, echter ook een stuk minder sensitief. Zo kunnen ELISA testen vaak geen MAP opsporen bij subklinisch geïnfecteerd vee (Collins et al., 2005; Sergeant et al., 2002; Sockett et al., 1992). Ook PCR (polymerase chain reaction test) wordt gebruikt om MAP op te sporen, het blijkt echter in vergelijking met ELISA testen minder specifiek. PCR blijkt dan weer wel gevoeliger dan ELISA testen bij de detectie van MAP uit fecale stalen (Clark Jr et al., 2008). Deze gevoeligheid is erg nodig vanwege het risico dat de mest vals negatief wordt getest bij geïnfecteerde dieren die een minder grote hoeveelheid bacteriën uitscheiden; de zogezegde "low

shedders" (Lilenbaum et al., 2007). PCR zou gevoeliger zijn dan bacteriecultuur en heeft slechts een kleine hoeveelheid DNA nodig (Moss et al., 1991; Sivakumar et al., 2005). PCR kon monsters als positief detecteren die als kweeknegatief beoordeeld werden (Huntley et al., 2005). Naast PCR en ELISA testen kan ook gebruik worden gemaakt van Johnin PPD testen. Dit is een preparaat waar MAP met warmte is behandeld om de groei en ontbinding te volgen en de producten van deze groei en ontbinding te onderzoeken. Deze test zou geschikt zijn bij het detecteren van geïnfecteerde dieren in het vroege stadium van de ziekte. Dit omdat de celgemedieerde immuunrespons aan het begin overheerst. Naargelang de ziekte vordert, neemt deze immuunrespons echter af (Robbe-Austerman et al., 2006). Hoewel interdermale Johnintesten geschikt zijn, blijft IS 900 PCR beter scoren voor vroegtijdige diagnose bij geiten, en tevens ook beter dan Ziehl Neelsen kleuring testen (Rawther et al., 2012). Tenslotte zou paratuberculose ook kunnen worden aangetoond via een abdominale echografie waarbij de aanwezigheid van vergrote intestinale lymfeknopen het vermoeden van paratuberculose kunnen versterken (Tuerlinckx et al., 2018). De diagnosemiddelen zijn dus vaak te duur, te arbeidsintensief, niet nauwkeurig genoeg of te omslachtig. Er is dus nood aan snellere, zuinigere, gemakkelijkere en toch nauwkeurige detectiemethoden voor de identificatie van subklinisch geïnfecteerde dieren. De vraag is dus of detectieratten hier hulp in kunnen bieden.

2.1.3 Verspreiding, opname en overdracht

MAP kan opgenomen worden rechtstreeks via faeces of via voedsel en water dat in contact is gekomen met faeces. Ook kan MAP worden opgenomen door een jong via melk en colostrum (Momotani et al., 1988). De hoeveelheid MAP-uitscheiding hangt af van het stadium van de ziekte. Tijdens het klinische stadium is er veel meer uitscheiding dan in het subklinische stadium (Sweeney et al., 1992). Bij runderen kan het aantal bacteriën in de faeces tot wel meer dan 10^8 cellen per g mest bevatten. Dit werd onderzocht op de mest van koeien die aan de gevolgen van paratuberculose zijn overleden (Chiodini et al., 1984). Ook geïnfecteerde geiten kunnen tot wel 10^8 MAP bacteriën per gram mest uitscheiden (Windsor, 2015). Verspreiding van MAP via faeces komt voor tijdens het volledige ziekteverloop. Het komt echter vaker en intensiever voor wanneer er een antilichaam respons ontwikkeld is (Ganusov et al., 2015). Subklinisch zieke dieren blijven heel hun leven besmet, ook als ze geen klinisch stadium bereiken, en scheiden de MAP bacteriën met tussenpozen uit in hun faeces (Djonne, 2010). Naast verspreiding via faeces, melk en colostrum, is er ook een verspreiding via bio-aërosolen mogelijk, voornamelijk in meer intensieve veehouderijen (Eisenberg et al., 2010; Eisenberg et al., 2012; Poyntz et al., 2014). MAP kan meer dan een jaar in de omgeving overleven, en ook omliggende gebieden zoals naastgelegen weides waar andere koeien, schapen of geiten op grazen, kunnen besmet zijn door MAP (Robbe-Austerman, 2011).

Wanneer MAP is opgenomen, treden ze bij jonge dieren de intestinale macrofagen binnen (Momotani et al., 1988). De macrofagen migreren dan naar de mesenteriale lymfeklieren wat tot verspreiding van MAP doorheen het lichaam zorgt via lymfevocht en bloed (Stabel et al., 2014). MAP gebruikt dus de macrofagen als middel om zichzelf doorheen het lichaam te verplaatsen (Valentin-Weigand & Goethe, 1999). MAP kon al uit supra-mammaire lymfeklieren worden geïsoleerd, evenals uit lymfevloeiend van de uier (Chiodini, 1996; Khol et al., 2012; Sweeney et al., 1992). MAP kan naast mammaire lymfeklieren (melkklieren), lymfevocht, melk en bloed, ook sperma infiltreren (Ayele et al., 2004; Chiodini, 1996; Koenig et al., 1993; Sweeney et al., 1992). Bij MAP in melk of biest, kon worden ontdekt dat de bacteriën vooral in het crème-achtige gedeelte van de melk te vinden waren. Melk met een hoger vetgehalte heeft dus meer kans om MAP te bevatten (Gao et al., 2005). Oudere dieren hebben een hogere infectiedosis MAP nodig dan jongere dieren voor ze ziek worden. Bovendien is de incubatietijd vooraleer klinische symptomen verschijnen, langer bij oudere dieren (Whitlock & Buergelt, 1996). Als dieren één jaar oud zijn, kunnen ze worden vergeleken met volwassen en oudere dieren en raken ze

minder snel besmet dan jongere dieren (Larsen et al., 1975). Wanneer een besmette kudde moet worden vervangen, is het dus verstandig om negatieve volwassen dieren, ouder dan één jaar aan te kopen (Sweeney, 1996). Wilde dieren, zoals herten en konijnen, kunnen een rol spelen in de verspreiding van MAP via hun uitwerpselen die op de weides terecht komen en zo het gras kunnen contamineren, wat vervolgens wordt opgenomen door het vee (Stevenson et al., 2009).

2.1.4 Behandeling, preventie en controle

De meest gebruikte methoden om MAP te controleren zijn “test and cull” methoden, waarbij de dieren worden getest, en zij die positief scoren, worden geruimd (Benedictus et al., 2000; Kennedy & Allworth, 2000). De redenering hierachter is dat in theorie een bacterie kan uitsterven als alle geïnfecteerde dieren worden gedood. In de praktijk echter is het complexer, gezien de capaciteit van MAP om lang buiten de gastheer te overleven (Eisenberg et al., 2010; Eisenberg et al., 2012; Penberthy, 1912; Poyntz et al., 2014; Thorel et al., 1990). MAP kan in mest overleven voor meer dan 250 dagen (Lovell et al., 1944). In neutraal pH water meer dan 17 maanden (Larsen et al., 1956). Op weilanden kan MAP dus erg lang overleven in regenplassen en mest, zelfs als er al lang geen dieren meer op de wei hebben gestaan. Wat vooral bij koeien wordt gebruikt als preventieve maatregel is het wegnemen van het kalf van de moeder voor het kalf bij de moeder heeft gezogen. Dit om MAP overdracht via biest te voorkomen. Het kalf wordt dan gevoed met commerciële biest of biest van MAP vrije dieren (Over et al., 2011). Bij geiten lijkt de kans om MAP door te geven via biest kleiner. Toch wordt het erg aangeraden om het jong van de moeder te scheiden aangezien MAP wel werd teruggevonden in geitenmelk (in 4% van de gevallen) (Lievaart-Peterson, 2017; Robbe-Austerman, 2011; Tuerlinckx et al., 2018). Aangezien jonge dieren veel vatbaarder zijn dan volwassen dieren, wordt aangeraden om aparte weilanden, drink- en voeder plekken te voorzien voor volwassen en jonge dieren (Over et al., 2011).

Om MAP onder controle te krijgen, is het nodig om de geschiedenis van de dieren bij te houden waarin wordt vermeld of de dieren positief of negatief zijn en of ze indien negatief in het verleden in aanraking zijn geweest met positieve dieren of met kuddes die een positief dier bevatten. Ook moet worden vermeld of het dier in een omgeving is geweest waar positieve dieren hebben rondgelopen. Hoewel dit in de praktijk erg moeilijk haalbaar is, kan het wel enorm helpen met de controle van MAP. Op basis van deze informatie zou dan een classificatie kunnen worden opgesteld met een risico-indeling en moeten dieren die “safe” zijn verklaard een certificaat krijgen. Op die manier kunnen ziekte dieren die geruimd zijn, vervangen worden door veilig verklaarde dieren zodat een nieuwe uitbraak kan worden vermeden (Kennedy & Benedictus, 2001; Sternberg & Viske, 2003). Test- en ruiming strategieën kunnen de prevalentie verminderen, maar om tot volledige uitroeiing van MAP te komen zou het nodig zijn om de volledige kudde te vervangen. Uitroeiing van MAP binnen een kudde aan de hand van “test and cull” kon namelijk tot 20 jaar duren, en in vele gevallen is volledige uitroeiing niet geslaagd (Lu et al., 2010; Whittington & Sergeant, 2001). Dit komt omdat herinfectie moeilijk is uit te sluiten vanwege de erg lange incubatietijd van MAP, waardoor er veel gezond ogende dieren toch besmet kunnen zijn en daarmee ook verantwoordelijk zijn voor de verspreiding van MAP. Ook het vermogen van MAP om lang te overleven in de omgeving zoals in de bodem en in mest, het vermogen van MAP om zich te kunnen verplaatsen via bio-aerosolen en water, alsook het risico dat wilde dieren een vector vormen, maken de kans op herinfectie erg reëel (Over et al., 2011). Het is nodig om een vroege diagnose te stellen voor erge verspreiding van MAP optreedt. Dit is moeilijk door de lange subklinische fase. Aan de hand van het testen op een cel gemedieerde immuunrespons echter, kunnen dieren met deze respons worden geruimd voor ze MAP verspreiden via hun mest (Rawther et al., 2012). Hoewel de controle strategie in de meeste landen is gebaseerd op test and cull strategieën, zijn er sommige landen waar er juist wordt gefocust op het identificeren van negatieve kuddes en deze negatief te houden zodat er altijd negatieve dieren zijn om besmette kuddes te vervangen. Landen die deze strategie

toepassen zijn Australië, Zweden en Noorwegen, waar al hele regio's negatief zijn (Kalis et al., 2004; Kennedy, 2011; Whist et al., 2014).

Er zijn ook vaccinaties tegen MAP beschikbaar die zijn gebaseerd op volledige dode MAP-cellen en volledige verzwakte MAP-cellen. Deze worden voornamelijk toegepast bij geiten en schapen, maar niet of zelden bij runderen (Over et al., 2011). De vaccinaties kunnen helpen om MAP onder controle te krijgen door de gevoeligheid van jongvee voor MAP te verminderen. Het wordt aangeraden om te vaccineren in combinatie met test- en ruiming strategieën en een goed management omdat enkel test en ruiming niet voldoende blijkt te zijn (Bastida & Juste, 2011; Windsor, 2015). MAP vaccinatie werkt goed bij het beheersen van klinische symptomen, het uitstellen van productieverlies, het verminderen van uitscheiding via mest, het verlagen van de prevalentie van MAP-infectie en het verlagen van de mortaliteitsgraad, echter kan het infectie niet voorkomen en kan het ook niet voorkomen dat MAP verder wordt uitgescheiden (Bastida & Juste, 2011; Dhand et al., 2016; Koets et al., 2019; Reddacliff et al., 2006). MAP vaccinatie zou zorgen voor een sterke vermindering van intestinale laesies (Saxegaard & Fodstad, 1985). Geitenjongen worden voornamelijk gevaccineerd in hun eerste levensmaanden. Er blijkt echter een groot verschil binnen deze eerste maanden. Zo blijkt het antilichaamrespons veel hoger bij geiten van 5 maanden tegenover geiten van 15 dagen. Dit kan komen door het meer volwassen immuunsysteem (Corpa et al., 2000). Ook werd gezien dat de immuunrespons na het krijgen van het vaccin eerder beperkt was bij geiten in een MAP vrije omgeving in tegenstelling tot geiten in een MAP endemische omgeving. MAP antilichaam positieve geiten werden overigens minder snel MAP-PCR positief getest dan antilichaam negatieve kuddegenoten (Koets et al., 2019). Serologisch onderzoek blijft mogelijk op gevaccineerde bedrijven, aangezien vacciniestoffen niet meer detecteerbaar zijn één jaar na vaccinatie (Tuerlinckx et al., 2018). Er is een grote variatie binnen de beschikbare vaccins. Het Gudair[®] vaccin wordt vooral in Australië gebruikt en is daar al erg succesvol gebleken (Windsor, 2015). Ook in Europa wordt het gebruikt en zijn de resultaten hoopvol. Het resultaat zou 20 keer beter zijn dan enkel de test en ruimingsstrategieën gebaseerd op ELISA testen (Bastida & Juste, 2011). Hoewel uitscheiding van MAP niet kan worden voorkomen, zorgt het Gudair[®] vaccin dat MAP uitscheiding 12 maanden later begint. Bovendien is er ook een verlaging in prevalentie en mortaliteit van 90% (Dhand et al., 2016). Dat is waarom er in preventie en controle programma's naast "test and cull" en een goed management, ook vaccinatie moet worden opgenomen.

2.1.5 Prevalentie

In 2013 waren er wereldwijd 1 005 603 003 geiten volgens de FAO. Azië bezit 59% van alle geiten en Europa slechts 2%. Europa is echter verantwoordelijk voor 18% van de globale geitenmelkproductie (Dubeuf, 2010). Infectie met MAP komt over de hele wereld voor en is dan ook een wereldwijd probleem met economische gevolgen (Over et al., 2011). Deze economische gevolgen komen door een lagere productiviteit en vroegtijdige ruiming van de dieren, wat zorgt voor verlaagde inkomsten (Garcia & Shalloo, 2015; McKenna et al., 2006). In Nederland zouden waarschijnlijk meer dan 75% van de geitenkuddes besmet zijn met MAP en dieren tellen die lijden aan paratuberculose (Koets et al., 2019). De bedrijfsprevalentie van MAP is waarschijnlijk meer dan 50% in de meeste landen die beschikken over een zuivelindustrie (Barkema et al., 2010). In Duitsland ligt de bedrijfsprevalentie op 71%. In Frankrijk op 63% en in Nederland op 86%. Bij dwerggeiten is de prevalentie niet gekend (Tuerlinckx et al., 2018). Dieren die lijden aan paratuberculose en gevallen van MAP-infectie zijn al gemeld op elk continent dat herkauwerspopulaties telt. Over de jaren heen is de prevalentie niet afgenomen (Barkema et al., 2018).

2.1.6 Economische schade

Paratuberculose vormt een groot probleem, niet alleen omwille van de impact op de gezondheid van de dieren en het dierenwelzijn. De aandacht gaat vooral uit naar paratuberculose als probleem vanwege de gigantische economische impact. Deze impact is het gevolg van het vroegtijdig ruimen van dieren, een verminderde melkgift, vermindering in de efficiëntie van de voedingsopname, verminderde fertiliteit van de dieren en gewichtsverlies van het slachtvee. Dit alles resulteert in erge inkomstenvermindering voor de veehouder en bovendien ook extra kosten voor het onder controle houden van deze ziekte (Garcia & Shalloo, 2015; Kostoulas et al., 2006; McKenna et al., 2006; Over et al., 2011; Rawther et al., 2012). Een voorbeeld hiervan is de situatie in de VS, waarbij de kost van deze ziekte bij rundvee 250 miljoen dollar per jaar inhoudt (Ott et al., 1999). Op besmette geitenboerderijen in Nederland bleek -paratuberculose samen met de ziekte Capriene artritis en encefalitis (CAE) de grootste economische impact te hebben (Schuiling & Groenveld, 2005). Daarnaast zou er een verband worden gezien tussen paratuberculose, MAP contaminatie van melkproducten voor menselijke consumptie en de ziekte van Crohn bij mensen. Als de ziekte van Crohn inderdaad kan worden uitgelokt door de opname van MAP via melkproducten, dan zouden de financiële kosten van deze ziekte mee kunnen worden opgeteld bij de economische schade (Sevilla et al., 2008). In Amerika werd aangetoond dat de kost van de ziekte van Crohn, gemiddeld lag op 125 404 Amerikaanse dollar per patiënt per levensduur, en dat de mediaan lag op 39 906 Amerikaanse dollar per patiënt per levensduur (Silverstein et al., 1999). Een andere studie toont aan dat de gemiddelde jaarlijkse kosten 12 417 Amerikaanse dollar bedragen. De gemiddelde jaarlijkse kosten van patiënten met de ergste vorm kwamen uit op 37 135 Amerikaanse dollar (Feagan et al., 2000). Weer een andere studie lopend van 1999 tot 2005 kwam uit op een jaarlijkse kost van 19 000 Amerikaanse dollar per patiënt (Gibson et al., 2008).

2.1.7 Volksgezondheidsprobleem

Zoals eerder vermeld is er dus een verband tussen paratuberculose bij vee en de ziekte van Crohn bij mensen. Steeds meer lijkt er bewijs te zijn voor dit verband (Bastida & Juste, 2011; Honap et al., 2021; Schuiling & Groenveld, 2005). Dit houdt dus in dat paratuberculose naast grote economische schade, ook een volksgezondheidsprobleem zou kunnen zijn. Dit zorgt dat de belangstelling naar deze ziekte enkel toeneemt. Levensvatbare MAP bacteriën zijn al aangetoond in melk die klaar is voor menselijke consumptie en blijken pasteurisatietechnieken te kunnen overleven (Dhand et al., 2016; Saxegaard & Fodstad, 1985; Valheim et al., 2002; Van Hulzen et al., 2012). Bij onderzoek op mensen die lijden aan de ziekte van Crohn, konden MAP bacteriën worden teruggevonden in darmweefsel en bloedstalen (Over et al., 2011). De ziekte van Crohn is een gastro-intestinale inflammatoire ziekte waarbij de ontstekingen overal in het spijsverteringsstelsel kunnen voorkomen. Deze ontstekingen beperken zich echter vaak tot het ileum of kronkeldarm en het colon of dikke darm (Hermon-Taylor & Bull, 2002). De klinische symptomen vertonen gelijkenissen met paratuberculose, namelijk gewichtsverlies, verminderde opname van nutriënten en diarree (Chacon et al., 2004). Daarnaast komen ook andere symptomen voor zoals koorts, braken, constipatie, anorexia, buikpijn en algemeen niet goed voelen (Chacon et al., 2004; Chiodini, 1989). Deze lichamelijke klachten gaan soms ook gepaard met mentale klachten als gevolg van de vermindering in levenskwaliteit, de financiële kosten van de ziekte en de beperking in levensstijl, waaronder het nalaten van sommige sociale gebeurtenissen vanwege lichamelijk ongemak en de nood om ten allen tijden het sanitair te kunnen gebruiken. De ziekte van Crohn kan tot uiting komen door een opstapeling aan verschillende factoren zoals genetische aanleg, infectieuze agentia (waaronder MAP wordt verdacht), abnormale immuunfunctie en externe factoren zoals roken en chemicaliën (Chacon et al., 2004).

Zoals kan worden begrepen uit bovenvermelde informatie, is paratuberculose een groot probleem dat veel verder gaat dan enkel wat zieke geiten. Het is daarom nodig om goed haalbare diagnosemethoden te zoeken die een voorscreening kunnen maken. Het inzetten van detectiedieren is een eventuele

mogelijkheid. In deze literatuurstudie wordt dus vanaf nu dieper ingegaan op het inzetten van zoekdieren (honden en ratten) om een beeld te geven van hun potentiële inzetbaarheid voor de biomedische geurdetectie van MAP bacteriën. Deze bachelorproef zal dan op het inzetten van tamme ratten verdergaan, en aan de hand van trainingen en testen, een eerste beeld schetsen over de eventuele haalbaarheid.

2.2 Zoekdieren

Zoekdieren of speurdieren zijn dieren die getraind worden om bepaalde geuren op te sporen, aan te duiden en te onderscheiden van andere geuren. Veel gebruikte zoekdieren zijn honden en ratten. Omdat er meer literatuur te vinden is over speurhonden, wordt er eerst dieper ingegaan op het inzetten van speurhonden, het trainen en het testen van speurhonden en de voordelen en valkuilen bij het gebruik van speurhonden. Deze informatie kan relevant zijn omdat het mogelijks analoog kan worden doorgetrokken naar het inzetten en trainen van ratten.

2.2.1 De diverse taken van detectiehonden

Sinds het moment dat de wolf gedomesticeerd werd, tienduizenden jaren terug, worden honden al door mensen ingezet. Ze hielpen met de jacht, het beschermen van het gezin, het opsporen van wild en het hoeden van vee. Tegenwoordig worden ze ook ingezet als hulphond, therapiehond, reddingshond, beschermings- en beveiligingshond en als detectiehond (Long et al., 2012). Door hun natuurlijke drang om te speuren, hun sterk ontwikkeld reukorgaan en hun hoge trainbaarheid zijn honden ideaal om in te zetten in speurwerk (Pirrone & Albertini, 2017). Ze worden ingezet voor veel verschillende taken en in veel verschillende vakgebieden. Zo worden ze ingezet om explosieven op te sporen, narcotische middelen aan te duiden, wilde dieren te vinden en ziektes te detecteren (Cristescu et al., 2015; Jezierski et al., 2014; Lazarowski, Krichbaum, et al., 2020). Biomedische geurdetectie is het inzetten van honden speciaal voor het opsporen van ziektes en pathogene micro-organismen (Bijland et al., 2013; Pirrone & Albertini, 2017). Honden hebben al bewezen dat ze diabetes kunnen ruiken (Gadbois & Reeve, 2014; Hardin et al., 2015), micro-organismen kunnen detecteren (Bomers et al., 2014; Bryce et al., 2017; Koivusalo et al., 2017; Koskinen et al., 2017) en verschillende soorten kanker kunnen opsporen (Jezierski et al., 2015; Moser & McCulloch, 2010). Onder deze kankersoorten behoren longkanker (Boedeker et al., 2012; Buszewski et al., 2012; Ehmann et al., 2012), prostaatkanker (Bjartell, 2011; Cornu et al., 2011; Taverna et al., 2015), blaaskanker (Willis et al., 2011), colorectale kanker (dikkedarmkanker) (Sonoda et al., 2011), leverkanker (Kitiyakara et al., 2017) en melanomen (Campbell et al., 2013; Pickel et al., 2004). Ook nu met de wereldwijde Covid-19 pandemie bewijzen honden zich weer. Zo bleken de detectiehonden in staat om SARS-COV-2 positieve stalen te onderscheiden van negatieve stalen (Jendry et al., 2020). Honden kunnen ook parasieten opsporen, zoals nematoden (Richards et al., 2008) en zelfs mensen identificeren met malaria (Guest et al., 2019). Honden kunnen ook worden ingezet bij het opsporen van pestsoorten, zoals bedwantsen (Cooper et al., 2014) en bepaalde knaagdieren (Gsell et al., 2010). Ook blijken ze in staat om schadelijke exoten zoals de Aziatische boktor (*Anoplophora glabripennis*) op te sporen (Hoyer-Tomiczek et al., 2016) en geïmporteerde rode vuurmieren te onderscheiden van inheemse andere miersoorten (Lin et al., 2011).

Honden worden ook gebruikt in conservatieprogramma's en het monitoren van wilde dieren omdat ze in staat zijn uitwerpselen van soorten met een bijna identiek dieet en dezelfde habitat te onderscheiden. Zo konden ze uitwerpselen van goud-jakhalzen (*Canis aureus*) onderscheiden van deze van rode vossen (*Vulpes vulpes*) (Hatlauf et al., 2021; Lanszki et al., 2006; Lanszki et al., 2016; Vlasseva et al., 2017), en konden ze ook de uitwerpselen van Eurazische otters (*Lutra lutra*) onderscheiden van

de uitwerpselen van de Amerikaanse mink (*Neovison vison*) (Grimm-Seyfarth et al., 2019). Daarnaast konden ze een onderscheid maken tussen een manenwolf (*Chrysocyon brachyurus*), poema (*Puma concolor*), jaguar (*Panthera onca*), reuzenmiereneeter (*Myrmecophaga tridactyla*) en reuzengordeldier (*Priodontes maximus*) (Vynne et al., 2011). Ook blijken honden in staat om erg verwante soorten van elkaar te discrimineren zoals de kitvos (*Vulpes macrotis*) van de coyote (*Canis latrans*) en rode vos (*Vulpes vulpes*) (Smith et al., 2003), en ook de grizzly beer (*Ursus arctos*) van de zwarte beer (*Ursus americanus*) (Hurt et al., 2000; Wasser et al., 2004). Nog straffer is het onderscheiden van twee individuele dieren van dezelfde soort, is dit geval namelijk twee Siberische tijgers (*Panthera tigris altaica*) (Kerley & Salkina, 2007). Sommige honden kunnen ook de geur van wolvenuitwerpselen onderscheiden van andere afleidingsgeuren (Vervaecke et al., 2021). Dit is bijzonder aangezien deze dieren moeilijk te detecteren zijn. Detectie en monitoring is echter erg belangrijk, zeker in landen waar de wolf recent is teruggekeerd, zoals in België (Van Den Berge, 2018). Een andere studie laat zien hoe honden de rode lynx (*Lynx rufus*) konden onderscheiden van de rode vos (*Vulpes vulpes*), grijze vos (*Urocyon cinereoargenteus*), kitvos (*Vulpes macrotis*), gedomesticeerde hond (*Canis familiaris*) en de coyote (*Canis latrans*) (Harrison, 2006). Ook is reeds gedemonstreerd dat zelfs dieren die in het water leven, kunnen worden opgespoord door honden. Zo konden er uitwerpselen gevonden worden van de noordkaper, een soort walvis (*Eubalaena glacialis*) (Rolland et al., 2007) en konden gewone doosschildpadden (*Terrapene carolina triunguis*) die voorkomen in overstroomd drasland of moerasgebied worden gelokaliseerd (Schwartz et al., 1974). Daarnaast konden detectiehonden ook gebruikt worden voor het opsporen van bepaalde schimmels en planten (Vesely, 2008). Er is ook potentieel om honden in te zetten in de diergeneeskunde, want zelfs tot het opmerken van een koe in oestrus blijken honden in staat. Dit kan van pas komen bij het juist plannen van kunstmatige inseminatie (Johnen et al., 2015). Ook is er mogelijk potentieel om honden in te zetten bij zwangerschapsdetectie van dierentuindieren zoals ijsberen (Curry et al., 2021). Tenslotte zijn honden ook in staat om lijken of lichaamsdelen, zelfs wanneer deze ondergronds begraven zijn, op te sporen (Alexander et al., 2016).

Dit alles is mogelijk door hun heel erg sterk ontwikkeld reukorgaan. Er zijn namelijk ongeveer 200 miljoen receptor cellen aanwezig in hun olfactorisch systeem, afhankelijk van het ras. Schapendrijvers zoals de Shetland sheepdog hebben meer dan 200 miljoen olfactorische receptor cellen en lopende- en zweethonden zoals Beagles hebben er meer dan 300 miljoen (Horowitz, 2009). Dit terwijl het aantal bij mensen slechts 6 - 12 miljoen is (Browne et al., 2006; Fält et al., 2015). Er zijn ook verschillende soorten olfactorische cellen die mensen niet hebben, maar honden wel. Hierdoor kunnen honden veel meer verschillende soorten geuren waarnemen (Horowitz, 2009). Bovendien kunnen ze daardoor ook specifieke substanties herkennen in concentraties van 500 delen per triljoen (Johnston, 1999). Organismen produceren vluchtige organische verbindingen met unieke karakteristieken. Honden zijn in staat deze vluchtige organische verbindingen te ruiken en van elkaar te onderscheiden (Craven et al., 2007). Organische verbindingen zijn vluchtig vanaf een bepaalde temperatuur, in adem, urine, tranen, speeksel, faeces en zweet, en via die weg dus mogelijk waarneembaar door honden (Amann et al., 2014; Grabowska-Polanowska et al., 2017).

2.2.2 Het verloop van de training van detectiehonden

Detectiehonden worden vooral getraind door middel van operante conditionering. Hierbij leert de hond dat er aan een specifiek gedrag een bepaald gevolg verbonden is. Dit gevolg kan een beloning of een straf zijn, en kan zo het gedrag bekrachtigen of ontmoedigen (Blackman D.E. , 1983; Blackman, 1983). Het is al door veel onderzoekers bewezen dat operante conditionering gebaseerd op beloning, namelijk positieve bekrachtiging, het beste resultaat oplevert (Blackman D.E. , 1983; Blackman, 1983; Geller, 2008; Hiby et al., 2004). Wat de hond als beloning ervaart kan afhankelijk zijn van het individu,

echter worden voerbeloningen, spel, speelgoed en affectieve, positieve aandacht door de meeste honden als erg belonend ervaren. Wanneer de hond gepast gedrag vertoont, kan het handig zijn om een signaal te gebruiken dat de hond direct associeert met een beloning. Dit signaal markeert dan duidelijk, met juiste timing, het gewenste gedrag, en omdat de hond weet dat er een beloning volgt, wordt het gemarkeerde gedrag bekrachtigd. Vaak wordt hiervoor een clicker gebruikt, maar ook bepaalde stemsignalen kunnen hiervoor dienen (Curry et al., 2021).

Het trainen van detectiehonden voor een specifieke taak verschilde licht per studie. In een studie over het inzetten van detectiehonden voor het opsporen van stierkikkers (meer specifiek de detectie van de soort *Pyxicephalus adspersus*), leerden de honden eerst een voerbeloning opsporen en aan te duiden. Naast positieve bekrachtiging samen met clickertraining, werd ook negatieve correctie toegepast en werd de voerbeloning weggenomen wanneer de hond een fout maakte. Pas als de hond de voerbeloningen correct kon aanduiden, werd overgeschakeld naar de geur van stierkikkers. Er werd gebruik gemaakt van een verhoogd platform met 10 gaten, elk gat met een diameter van 6 cm en met evenveel ruimte tussen elk gat. De gaten stonden in een lijn gerangschikt. Onder het platform en onder de gaten konden stalen worden geplaatst. De hond moest het juiste staal aanduiden door te gaan zitten en het met de poot aan te raken (Matthew et al., 2021). Bij de training van honden voor de detectie van zwangerschap bij ijsberen, werd in plaats van een clicker, een verbaal markeerwoord gebruikt als brug tussen het gewenste gedrag en de beloning. De beloning zelf kon zowel voeder als spel zijn. Ook hier werden de stalen in een lijn gezet onder een houten plank met gaten. De hond mocht aan de gaten snuffelen terwijl hij voorbij de lijn stapte. De hond leerde om te zitten bij het staal. Pas nadat de hond had geleerd om bij een staal te zitten, werd overgegaan naar de discriminatie training, waarbij de hond moest leren om het verschil te ruiken tussen een positief en een negatief staal, en enkel bij het positief staal te zitten. Het aantal stalen varieerde tussen 5 en 15 stalen met minstens 1 positief staal. Na juiste aanduiding werden de stalen verwisseld en werden er regelmatig nieuwe stalen geïntroduceerd (Curry et al., 2021). Bij het trainen van honden die moeten worden ingezet voor het opsporen van explosieven, was het erg belangrijk dat de honden die al door hun discriminatietraining waren, in zo veel mogelijk verschillende omgevingen en situaties werden getraind. Enkel op die manier kon men zeker zijn dat het getrainde gedrag niet contextafhankelijk was (Gazit et al., 2005; Hilliard, 2003).

In een onderzoek over het trainen van COVID-19 detectiehonden werden honden gebruikt die reeds actief waren als zoekhond. Het ging namelijk over drie explosieven detectiehonden, twee dikkedarmkanker detectiehonden en één search and rescue dog. Door reeds vertrouwd te zijn met speurwerk ging de training relatief vlot en duurde ze tussen de één en drie weken. Tijdens de training werd een lijn van kegels opgezet waaronder de stalen konden worden geplaatst. De honden moesten leren om voor de kegel te zitten die het positieve COV-19 staal verborg. De training werd in vier stappen verdeeld met als eerste stap het lijnwerk. Hierbij werd de hond voorbij de kegels geleid en moest de hond snuffelen aan elke kegel. Wanneer de hond aan alle kegels had gesnuffeld volgde een beloning. Stap 2 was de fixatietraining, waarbij de hond moest leren om het staal te zoeken en de juiste kegel te markeren door ervoor te gaan zitten. Daarna werden bij stap 3 de lege kegels vervangen door kegels met "blufstalen". Dit zijn stalen met een andere geur. Pas bij stap 4 werden ook negatieve stalen toegevoegd en kon de echte discriminatie training beginnen (Grandjean et al., 2020).

Bij het opsporen van faeces van bepaalde wilde diersoorten, was het belangrijk dat de stalen tijdens de training werden blootgesteld aan factoren die ook in de natuur van toepassing zijn, zoals zonlicht, warmte, regen en verschillende graden van decompositie (Hatlauf et al., 2021). In een studie naar het opsporen van wolvenfaeces verliep de training als volgt: 1) fixatietraining en het fixeren op de wolvenfaeces. De honden moesten met hun neus de wolvenfaeces aanduiden en dit enkele seconden volhouden. Slechts één container werd aangeboden en deze bevatte de wolvenfaeces. 2) drie containers werden in een lijn gezet, waarvan één met wolvenfaeces. De twee anderen waren leeg.

Hier moesten de honden leren enkel te fixeren op de container met wolvenfaeces, en niet op de lege containers. De containers werden elke keer van plaats verwisseld. 3) vervolgens werden er ook afleidingsgeuren gebruikt zodat de hond moest leren om de geur van de wolvenuitwerpselen te onderscheiden van de andere geuren. Deze geuren waren onder andere thee en koffie. Sterke geuren die niks te maken hebben met de doelwitgeur. De geuren werden opgesteld in een lijn van acht containers. De trainingsfrequentie was zes tot tien keer achter elkaar, twee keer per dag. Tijdens de training kon maar gebruik gemaakt worden van drie verschillende wolvenuitwerpselen vanwege de moeilijkheid om hieraan te komen. 4) Doorheen de training werden ook soms “blank trials” gedaan, waarbij geen doelwitgeur aanwezig was. 5) Fixatie werd nu opgedreven naar acht seconden. Pas wanneer de hond de drie stalen met een nauwkeurigheid van 100% kon onderscheiden van de afleidingsgeuren, werd overgegaan naar de echte discriminatietraining met meer en nieuwe wolvenuitwerpselen en nieuwe afleidingsgeuren, waaronder uitwerpselen van honden en kippen. 6) Tijdens het testen mocht de hond maar maximum drie keer langs de lijnopstelling lopen om overal te snuffelen. De test verliep blind. Dus de begeleider van de hond wist de locatie van de wolvenuitwerpselen niet (Vervaecke et al., 2021).

2.2.3 De voordelen bij het inzetten van detectiehonden

Het inzetten van detectiehonden heeft enorm veel voordelen. Het zou veel kostenefficiënter zijn dan sommige andere alternatieven, waardoor het erg waardevol is in situaties waar financiën een probleem vormen, zoals bijvoorbeeld in ontwikkelingslanden (Smith et al., 2001). Een ander voorbeeld van de voordelen zien we terug bij het opsporen van bepaalde diersoorten met het oog op conservatie of juist op pestcontrole. In deze gevallen is het belangrijk dat de faeces van de gezochte dieren niet verward worden met die van andere soorten. DNA onderzoek kan hier zekerheid in brengen. Dit is echter heel kostelijk en bovendien arbeidsintensief. Een voorselectie door detectiehonden vermindert dan de kosten en de tijdsduur (Grimm-Seyfarth et al., 2019). Ook bij het opsporen van pathogenen genieten detectiehonden de voorkeur als manier om een voorselectie te maken (Jendry et al., 2020). Het afnemen van PCR testen is namelijk ook tijdrovend en duur, wat problematisch kan zijn in ontwikkelingslanden. Daar vormt zich bijvoorbeeld het probleem dat RT-PCR testen voor het detecteren van SARS-CoV-2, pas worden toegepast bij patiënten die duidelijk typische COVID-19 symptomen vertonen. Hierdoor glijpt een groot deel besmette individuen door de mazen van het net (Wiersinga et al., 2020). Zoekhonden zijn dan een goede manier om besmette personen op te sporen die geen symptomen vertonen, of die in het vroegste stadium van de besmetting zitten en waarbij de symptomen nog moeten ontwikkelen (Jendry et al., 2020). Naast een relatief kostenefficiënte methode, is het inzetten van zoekhonden ook nauwkeurig. Detectiehonden bleken een nauwkeurigheid te hebben van 100% in een onderzoek naar het detecteren van larven van de doffe dubbeloogbokker (*Tetropium fuscum*) (Hoffman, 2014), en tijdens een studie over het opsporen van de San-Joaquinkitvos (*Vulpes macrotis mutica*) (Smith et al., 2001; Smith et al., 2003). In een studie naar het detecteren van de grote stierkikker (*Pyxicephalus adspersus*), konden honden de geur herkennen met een sensitiviteit van 87% en een efficiëntie van 84%, zelfs wanneer deze geur 100.000 keer verdund was. De honden konden de geur ook onderscheiden van de geuren van andere kikkerachtigen met een specificiteit van 98,6% (Matthew et al., 2021). Detectiehonden hadden een sensitiviteit van 100% en een specificiteit van 95% bij het detecteren van Europese otters (*Lutra lutra*) (Oldenburg Jr et al., 2016), en een specificiteit van 93% bij het zoeken van de vismarter (*Martes pennanti*) (Long et al., 2007b). Nog een voorbeeld is een detectiehond in China die een nauwkeurigheid behaalde van 92% bij het onderscheiden van uitwerpselen van drie verschillende primatensoorten (Orkin et al., 2016). Bij het detecteren van SARS-CoV-2 uit speeksel en secreties van de trachea (luchtpijp) en bronchiën (luchtpijpvertakkingen), behaalden detectiehonden een sensitiviteit van 82,63% en een specificiteit van 96,35% (Jendry et al., 2020).

Wanneer detectiehonden vergeleken werden met de alternatieven, scoorden de honden vaak beter. Bij het monitoren van de rode lynx (*Lynx rufus*), bleken detectiehonden maar twee dagen nodig te hebben om de lynxen te detecteren met een waarschijnlijkheid van 90%. In het geval van het gebruik van camera's duurde dat zeven tot acht weken (Clare et al., 2015). Een ander alternatief is het beroep doen op experts om uitwerpselen van nauwverwante of gelijkaardige dieren te onderscheiden op basis van morfologie. Bij het onderscheiden van de uitwerpselen van de Europese otter (*Lutra lutra*) en de Amerikaanse mink (*Neovison vison*) bleken niet-experts die willekeurig te werk gingen een nauwkeurigheid te halen van maximum 72%, terwijl experts een nauwkeurigheid hadden van 89%. De vier geteste detectiehonden daarentegen hadden een nauwkeurigheid van 95%. Daarnaast waren de honden twee keer zo snel dan de experts in het vinden van uitwerpselen tijdens veldwerk, en vonden er vier keer zoveel. Bovendien duurt het jaren voor iemand een expert is terwijl het trainen van de honden een paar maanden duurde (Grimm-Seyfarth et al., 2019). Een andere studie laat zien dat detectiehonden een succesratio hebben die 30% hoger ligt dan die van experts tijdens veldwerk (Böcker, 2016). Detectiehonden bespaarden ook veel tijd, tot wel 99,6% tegenover experts (Roda et al., 2021). Ook zijn er voorbeelden van detectiehonden die beter scoorden en minder tijd nodig hadden bij het monitoren van wilde dieren dan hair snares (prikkeldraad of andere draad waar het wild dier kan tegenlopen waardoor wat haar aan de draad achterblijft), scent stations (het klaarleggen van een geur dat aantrekkelijk is voor het wilde dier in kwestie, middenin een cirkel van bloem waar pootafdrukken in worden achtergelaten) en camera vallen (camera's die reageren op warmte of beweging) (Clare et al., 2015; Harrison, 2006; Long et al., 2007a, 2007b; Tom, 2012). In het algemeen presteerden detectiehonden ingezet in conservatie- en monitorprogramma's 90% beter dan alternatieve monitormethoden (Grimm-Seyfarth et al., 2021).

2.2.4 De valkuilen bij het inzetten van detectiehonden

2.2.4.1 Problemen tijdens de training

Het probleem bij de training van detectiehonden, is dat er geen gestandaardiseerde manier is om te werk te gaan. Er is een verschil in de ervaring van honden en trainers, er is een verschil in aantal stalen dat per training gebruikt wordt, er is verschil in het aangeleerde markeersignaal om positieve stalen aan te duiden, er is een verschil in het rangschikken van de stalen, er zijn verschillen in de manier van fixatietraining en discriminatietraining, er zijn verschillen in het gebruik van afleidingsgeuren, blufstalen, negatieve stalen, etc. Ook zijn er verschillen in het hanteren van stalen met betrekking tot hygiëne, ontdooiing, bewaring, aanbidding en hergebruik. Dit maakt dat er ook verschillen zijn in resultaten van studies waar training van detectiehonden een grote rol speelt (Elliker et al., 2014; Gadbois & Reeve, 2016; Jezierski et al., 2015). Het is vanzelfsprekend dat de manier van werken wat verschilt als het gaat over verschillende typen speurwerk. Zo vragen verschillende soorten stalen bijvoorbeeld andere bewaarmethoden en zal een hond die in het veld moet werken meer getraind worden op verschillende locaties dan honden die in een kamer stalen met pathogenen moeten onderscheiden van negatieve stalen. Toch is het aan te raden om een algemene standaard te volgen (Reeve & Koivusalo, 2018). Wat wel bij veel studies overeenkomt is het toepassen van een lijn- of cirkelopstelling met één doelwitgeur en meerdere niet-doelwit geuren. Hoewel dit voordelen heeft, zijn er ook nadelen. In echte speursituaties zijn de doelwit en niet-doelwit geuren niet vooraf bepaald. Honden die altijd werden getraind met één doelwit geur en meerdere niet-doelwit geuren, hadden een significante daling in sensitiviteit en specificiteit wanneer ze getest werden met een willekeurig aantal doelwitgeuren en niet-doelwit geuren. Door dieren te trainen met steeds meer positieve stalen en deze doelwitgeuren later in de training met willekeurige aantallen aan te bieden, zou dit probleem verholpen kunnen worden (Amundsen et al., 2014; Hackner et al., 2016). Een andere manier om dit

probleem aan te pakken is om te trainen en te testen met één geur per keer, en de hond te leren een “ja” of “neen” signaal te geven afhankelijk of de geur van het aangeboden staal overeenkomt met de geur van het doelwit. Het grote voordeel hiervan is dat het juist opmerken van een negatief staal ook beloond kan worden, waardoor de motivatie hoog blijft. Ook zou het vals positieve signalen kunnen verminderen. Wanneer er bijvoorbeeld met meerdere stalen gewerkt wordt en de hond enkel bekrachtigd wordt op het vinden van een positief staal, kan het problematisch worden wanneer er tijdens het echte speurwerk geen doelwitgeur aanwezig is. De hond kan dan vals positieve signalen geven, hopen op bekrachtiging. Dit wordt voorkomen door met één staal per keer te werken en zowel het juiste “Ja” als “neen” antwoord te belonen. Deze manier verhoogt dus de nauwkeurigheid. Daarbij voorkomt het ook het probleem van geheugenafhankelijke resultaten. Honden scoren namelijk minder goed op nauwkeurigheidstesten wanneer de doelwitgeur verder in de lijn staat (Gadbois & Reeve, 2014, 2016).

Een ander belangrijk probleem dat kan optreden tijdens het trainen, is het memoriseren van de stalen zelf, in plaats van de doelwitgeur te generaliseren en te detecteren in nieuwe stalen. Honden kunnen namelijk meer dan tien stalen onthouden (Williams & Johnston, 2002). Dit probleem komt vooral voor wanneer er niet genoeg stalen zijn om mee te trainen. Een voorbeeld hiervan is het trainen van honden om zwangerschap te detecteren bij bepaalde dierentuindieren. Hiervoor is urine nodig van zwangere dieren. Het probleem is echter dat bepaalde dierentuindieren moeilijk zwanger geraken waardoor het moeilijk is om aan stalen te komen. Of er zijn gewoon te weinig verschillende dieren, en dus te weinig verschillende stalen om te gebruiken tijdens de training. Wanneer dit het geval is, is de kans groot dat de hond de geur van het zwangere dier in kwestie onthoudt, en niet de geur die specifiek is aan de zwangerschap doortrekt naar nieuwe, onbekende stalen (Curry et al., 2021; Moser et al., 2019). Nog een probleem is dat van contextafhankelijk leren. Wanneer een dier leert dat het na het waarnemen van een bepaalde stimulus (bv. geur) een bepaald gedrag moet uitvoeren (het begrijpen van de relatie tussen stimulus-reactie-beloning), linken ze dit bijna altijd aan de context waarin ze deze relatie geleerd hebben. Wanneer de context dan verandert, zal de hond na het waarnemen van dezelfde stimulus als voorheen, niet altijd de getrainde reactie vertonen. Dit is het “context shift effect” en het belemmert het trainen van detectiehonden. Zo zal een hond die in een gecontroleerde binnenomgeving is getraind, veel minder goed presteren wanneer hij uiteindelijk in het veld moet werken. Een ander voorbeeld van problemen door contextafhankelijk leren, is wanneer de hond leert dat er op een bepaalde plek nooit een doelwitgeur te vinden is. Wanneer er dan wel een doelwit wordt verstoopt, zal de hond deze vaak geen aandacht schenken uit de overtuiging dat er in deze context nooit een doelwit ligt op die plek. Wanneer de context echter verandert, zal de hond weer enthousiast overall zoeken en treedt er vernieuwing van het gedrag op. Het frequent veranderen van de context is dus belangrijk om extinctie van gewenst gedrag door contextafhankelijk leren, tegen te gaan (Bouton & Ricker, 1994; Gazit et al., 2005; Martin & Pear, 2019). De aard van de stalen kan ook problemen geven. Zo bleek dat honden die getraind werden voor het detecteren van wolvenfaeces, en al eerder getraind waren voor ander speurwerk, een aversie leken te hebben voor de geur van de wolvenuitwerpselen (Vervaecke et al., 2021). Het is mogelijk dat dit aangeboren adaptief gedrag is om een roofdier en concurrent te ontwijken (Lescureux & Linnell, 2014) of om parasieten en pathogenen uit uitwerpselen te vermijden (Hart, 2012; Hart et al., 2018). Tijdens de studie naar het opsporen van wolvenuitwerpselen, leek de hond minder goed in het herkennen van erg droge wolvenuitwerpselen, en fixeerde zich snel op hondenuitwerpselen van een hond die gevoederd was met het volledig karkas van een konijn (Vervaecke et al., 2021).

2.2.4.2 Problemen bij het testen en het inzetten van de hond in de praktijk

Wanneer de hond zijn training heeft doorstaan, moet er worden getest of de hond wel degelijk weet waar hij naar opzoek moet. Ook hierbij kunnen problemen optreden. Het belangrijkste is dat er geen bevooroordeelning en verwachting is bij de persoon die de hond begeleidt. Wanneer die persoon ervan uitgaat dat er een doelwitgeur is op een plaats waar geen doelwitgeur is, is de hond sneller geneigd tot het geven van vals alarm (vals positief). Honden zijn namelijk meesters in het opnemen van subtiele signalen die hun eigenaar of begeleider uitzendt, en zullen die eerder volgen dan te vertrouwen op hun eigen vaardigheid (Cristescu et al., 2015; Lit et al., 2011). Dit komt bijvoorbeeld voor bij het aflopen van een gebied op zoek naar sporen van een bepaald dier. Wanneer de begeleider van de hond weet waar hij ongeveer moet zoeken, zal de hond hem volgen en bestaat de kans dat hij geuren negeert die niet in die richting liggen (Birks et al., 2005). Een ander probleem dat bij de eigenaar of begeleider ligt, is het fout interpreteren van de signalen die de hond geeft tijdens het werken met stalen. Het komt voor dat de eigenaar niet doorheeft wanneer de hond een positief staal markeert, wat leidt tot vals negatieve resultaten. Ook komt het voor dat de eigenaar denkt dat de hond een staal signaleert, maar deze gedragingen toeval zijn, gelijkaardig zijn aan het markeersignaal of te wijten zijn aan twijfel bij de hond en dus resulteert in een vals positief resultaat (Concha et al., 2014; Lasseter et al., 2003; Lit et al., 2011; Wasser et al., 2004). Hetzelfde geldt voor het al dan niet opmerken van de aan- of afwezigheid van het doelwit tijdens veldwerk, door het fout interpreteren van de hond zijn signalen. Bijvoorbeeld tijdens veldwerk opzoek naar explosieven kan de hond tekenen geven om een bepaalde richting uit te gaan, en worden deze niet opgemerkt. Of de hond kan ergens lang snuffelen omdat de geur daar lijkt op de doelwitgeur, zonder echt te signaleren, maar kan de begeleider dit toch interpreteren als een vondst (Bach & McLean, 2003).

Tijdens het testen kan er ook plots een grote daling zijn in prestaties tegenover de training. Dit kan zich voordoen wanneer de hond toch niet in staat is om de doelwitgeur te generaliseren naar nieuwe stalen of in een nieuwe context. Ook is het mogelijk dat de hond tijdens de training afging op de subtiele signalen van de begeleider, terwijl deze tijdens een blinde test wegvallen (Curry et al., 2021). Wat nog belangrijk is, is het gebruik van juiste stalen die niet dubbelzinnig zijn en waar geen twijfel over is. Tijdens een studie naar zwangerschapsdetectie bij ijsberen, bleek de hond tijdens de test vals positief te signaleren. Nu bleek dat dit negatief staal van een vrouwelijke ijsbeer kwam die gepaard had, maar geen jongen had gekregen. De kans zit er dus in dat de ijsbeer wel degelijk zwanger was, maar een miskraam heeft gehad en dat dit de reden is dat de hond het als positief markeerde. Bovendien is er ook het probleem van pseudozwangerschappen, waarbij niet zwangere, vrouwelijke ijsberen metaboliëten van progesteron uitscheiden in hun urine of faeces, wat haast niet te onderscheiden is van een echte zwangerschap. Er waren ook vals negatieve signalen tijdens het testen, wat kan komen omdat sommige positieve trainingsstalen uit een andere fase van de zwangerschap kwamen dan de positieve teststalen (Curry et al., 2021). Nog een voorbeeld bij problemen met betrekking tot stalen is een vals negatieve RT-PCR test, iets dat soms wel voorkomt (Li et al., 2020; Tahamtan & Ardebili, 2020; Xiao et al., 2020). Wanneer dit het geval is tijdens het testen, kan het lijken of de hond een vals positief signaal geeft, terwijl de hond eigenlijk correct is (Grandjean et al., 2020). Het spreekt voor zich dat wanneer dit voorvalt bij trainingsstalen, dit de training ook belemmert.

Een andere mogelijkheid die leidt tot slechter presteren tijdens de test dan tijdens de training, is de invloed van tijd op de geur van het staal. Testen vindt logischer wijs later plaats dan het trainen. Wanneer de stalen op hetzelfde moment zijn afgenomen, zijn de teststalen dus de oudste stalen wanneer ze voor het eerst voor de hond worden gepresenteerd. Dit is een probleem aangezien er een negatieve correlatie is tussen ouderdom van het staal en waarneembaarheid van de geur. Hoe ouder het staal, hoe moeilijker het dus is voor de hond om het te ruiken (Matthew et al., 2021). Tijdens het testen kunnen er ook externe factoren zijn die de prestaties verstoren. Enkele honden die werden getest werden ook gefilmd, en daaruit kon men mogelijks uitmaken waarom sommige prestaties minder goed waren dan anders. Een voorbeeld was het lawaai van spelende kinderen of het geluid van hoefstappen van een voorbijkomend paard op straat, dicht bij de testkamer. Het is mogelijk dat deze

geluiden de hond hebben afgeleid of van de kaart brachten (Grandjean et al., 2020). Een andere factor die de testprestaties kan beïnvloeden is de familiariteit tussen de hond en de persoon die de hond begeleidt. Honden scoren het best wanneer ze een vaste begeleider hebben waarmee ze een band hebben opgebouwd. Ze scoren dan ook minder goed wanneer de begeleider een onbekende is (Hemsworth et al., 2009; Jamieson et al., 2018; Rohlf et al., 2010; Rohlf et al., 2012; Zubedat et al., 2014).

Net zoals dat er zich problemen kunnen voordoen bij het trainen en het testen, kunnen er zich ook problemen voordoen tijdens het echte werk zelf, wanneer de hond in de praktijk wordt ingezet. Wanneer het veldwerk betreft zijn er veel factoren die de zoekprestaties van de hond kunnen belemmeren. Het weer heeft bijvoorbeeld een grote invloed. Er moet rekening gehouden worden met windrichting en windsnelheid. Ook factoren als luchtvochtigheid en temperatuur kunnen de geur van het doelwit beïnvloeden (Long et al., 2012; MacKay et al., 2008). Er is ook erg weinig bekend over de afstand waarin de hond een geur kan waarnemen (Reed et al., 2011). Wanneer het gaat over het werken met stalen, moet er rekening mee worden gehouden dat wanneer honden in een gesloten ruimte stalen moeten discrimineren, dit na een tijd erg repetitief werk is en dat de motivatie mogelijk kan afnemen naarmate de tijd verstrijkt. Bij honden die veldwerk doen zoals het detecteren van explosieven, het zoeken van drugs of het opsporen van wilde dieren, zou dit minder een rol spelen (Reeve & Koivusalo, 2018). Het is vanzelfsprekend dat de valkuilen tijdens het testen van de hond, ook een rol kunnen spelen tijdens het effectieve werk.

2.2.4.3 Twijfels over kostenefficiëntie

Het inzetten van zoekhonden wordt door velen als een waardevolle methode gezien, mede dankzij zijn kostenefficiëntie. Er zijn echter ook studies die dit voordeel in twijfel trekken. Zo zijn er projecten waar het nodig was om detectiehonden en hun begeleiders te huren, wat de prijs enorm deed toenemen (Orkin et al., 2016). Wanneer de honden afkomstig zijn van de locatie zelf en getraind kunnen worden door lokale mensen, drukt dit de kosten (Böcker, 2016; Orkin et al., 2016). Het blijkt dat camera's en vallen goedkoper zijn dan het inzetten van detectiehonden voor het monitoren van bepaalde wilde dieren (Clare et al., 2015; Duggan et al., 2011). Deze methoden zijn echter minder nauwkeurig en efficiënt dan het inzetten van zoekhonden (Clare et al., 2015).

2.3 Inzetten van ratten als zoekdier

Naast honden kunnen ook ratten worden getraind en ingezet als zoekdier. Zo worden ze ingezet voor het opsporen van explosieven (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011) en het detecteren van de tuberculose bacterie (*Mycobacterium tuberculosis*) om te helpen bij het diagnosticeren van (pulmonale) tuberculose bij mensen (Mgode et al., 2012; Poling et al., 2017; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011).

2.3.1 Inzetten van ratten bij het opsporen van landmijnen

Landmijnen vormen een groot probleem voor de veiligheid van de bevolking. Nog altijd zijn er veel slachtoffers die ernstig lichamelijk en psychologisch leed ondervinden ten gevolge van ontploffende mijnen. Ook sterven er nog steeds mensen door deze explosieven. Het Landmine Monitor Report uit 2009, wijst erop dat er meer dan 70 landen zijn die deze problemen ondervinden door mijnvelden. Het

rapport toont ook aan dat ongeveer 500.000 mensen moeten leven met verwondingen veroorzaakt door de explosieven ("Landmine Monitor Report," 2009). Het is dus erg belangrijk dat de mijnen worden gevonden en ontmanteld. Dit is helaas geen evidentie. Het is gevaarlijk, tijdrovend en duur om velden te ontminen. Naast de traditionele methoden zoals metaaldetectors of andere mechanische apparaten, wordt nu ook beroep gedaan op zoekdieren, zoals explosieven detectiehonden ("Geneva International Centre for Humanitarian Demining," 2007), en nog meer recent op het inzetten van grote Afrikaanse buidelratten (*Cricetomys gambianus*) (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011). APOPO (Anti-Persoonsmijn Ontmijnende Product Ontwikkeling) is een organisatie in Morogoro, Tanzania die sinds 1997 onderzoek doet naar het inzetten van grote Afrikaanse buidelratten als detectiedier voor explosieven. Ratten die tijdens de training en het testen goed scoren worden in het veld ingezet om mijnen op te sporen (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011; Webb et al., 2020). Zo konden de ratten al meer dan 107.600 nog niet geëxplodeerde landmijnen vinden over een oppervlakte van meer dan 23 miljoen m² in post-conflict zones waaronder Cambodja, Mozambique en Angola (Webb et al., 2020).

2.3.2 Inzetten van ratten bij het opsporen van *Mycobacterium tuberculosis*

Naast het opsporen van landmijnen blijken de grote Afrikaanse buidelratten (*Cricetomys gambianus*) ook potentieel te hebben voor het diagnosticeren van pulmonale tuberculose (TBC) bij mensen. Dit doen ze door de geur van vluchtige componenten die eigen zijn aan de tuberculose bacterie Mtb (*Mycobacterium tuberculosis*) te herkennen, discrimineren en aan te duiden in sputumstalen van personen die met Mtb besmet zijn (Mgode et al., 2012; Weetjens et al., 2009). Tuberculose is een groot probleem en is verantwoordelijk voor het overlijden van 1.770.000 mensen in het jaar 2007, een getal dat ook in latere jaren hoog blijft, namelijk een sterfte rond de 1,5 miljoen mensen per jaar volgens rapporten van de WHO ("World Health Organization (WHO)," 2007; "World Health Organization (WHO)," 2015). Ook was het in 2011 verantwoordelijk voor de besmetting van ongeveer 2.000.000.000 personen waarvan 1/10 waarschijnlijk ernstig ziek werd (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011). Het is de meest dodelijke infectieuze ziekte ter wereld (Lienhardt et al., 2018). De organisatie APOPO speelt ook hier een grote rol in het trainen van ratten voor het opsporen van TBC en het verrichten van onderzoek naar de inzetbaarheid en kosteneffectiviteit van deze methode (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011; Webb et al., 2020). De ratten worden al ingezet in ontwikkelingslanden waaronder Mozambique, Ethiopië en Tanzania. Er zijn al meer dan 531.000 sputumstalen onderzocht door de ratten, en dankzij de ratten konden 14.700 extra besmettingen worden gedetecteerd (Webb et al., 2020). Wanneer ratten werden ingezet als middel om sputumstalen te screenen, nadat deze stalen eerst geanalyseerd werden door een microscoop, bleek dat er toch een detectiestijging was van 44% dankzij het inzetten van de ratten (Mahoney et al., 2011).

2.3.3 Voordelen bij het inzetten van ratten

Het inzetten van ratten heeft veel voordelen. Ze hebben een uitstekende reukzin en zijn makkelijk te trainen met operante conditionering. Ratten kunnen dus prima getraind worden door operante discriminatie training (Verhagen et al., 2003; Verhagen et al., 2006). Ze zijn gemakkelijk te huisvesten en bovendien goedkoop te onderhouden. Dit in tegenstelling tot bijvoorbeeld detectiehonden. Ook hebben ze bijzondere voordelen die hen extra geschikt maakt voor bepaalde taken. Zo zijn ratten erg klein en wegen weinig. Hierdoor zijn ze ideaal om in te zetten als mijndetectiedier. Ze zijn namelijk te licht om de mijnen te activeren. Dit geldt ook voor de grote Afrikaanse buidelrat (*Cricetomys*

gambianus) (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011). Als biomedisch detectiedier hebben ratten het voordeel dat ze erg resistent zijn tegen veel ziektes. Het is ook waarschijnlijk dat ratten niet ziek kunnen worden door MAP. Uit stalen afkomstig van de milt en de lever van Lewis ratten konden geen MAP bacteriën worden gekweekt en er zijn geen laesies gevonden die typerend zijn voor MAP-infectie (Koets et al., 2000). Ook wanneer ratten wel besmet bleken (in 3 van de 35 gevallen), was er geen weefselschade gevonden (Beard et al., 2001). Dit tegenover honden, die wel sneller besmet kunnen geraken met MAP en klinisch ziek kunnen worden (Miller et al., 2017). Dit is dan ook één van de redenen dat ratten verkozen werden boven honden in deze studie als potentieel detectiedier voor de opsporing van *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in geitenbiest. De grote Afrikaanse buidelrat (*Cricetomys gambianus*) heeft als extra voordeel tegenover de tamme bruine rat (*Rattus norvegicus*) dat hij inheems is waar de nood aan mijn- en tuberculosedetectie het hoogst is; namelijk Zuid-Afrikaanse landen. Dit maakt hem beter bestendig tegen de warmte en endemische ziektes. Bovendien leven deze ratten ook langer dan bruine- en tamme ratten (*Rattus norvegicus* en *Rattus norvegicus domestica*), namelijk zes tot acht jaar, terwijl de gemiddelde leeftijd van de bruine rat in gevangenschap slechts drie jaar is (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011; Poling et al., 2010). De Afrikaanse buidelratten bleken ook in staat te kunnen discrimineren tussen *Mycobacterium tuberculosis* en andere pathogenen van het ademhalingsstelsel, zoals bacteriën uit het geslacht *Rhodococcus* en *Nocardia*. Dit is een groot voordeel tegenover microscopisch onderzoek, omdat er via microscopisch onderzoek fout gediagnostiseerd kan worden door de gelijkenissen tussen de verschillende soorten bacteriën (Mgode et al., 2012).

2.3.4 Bedenkingen bij het inzetten van ratten

Naast voordelen zijn er ook nadelen of bedenkingen bij het inzetten van ratten als zoekdier. Een voorbeeld hiervan is de tijd die nodig is om ratten te trainen. Vooraleer ze kunnen worden ingezet in de praktijk hebben ze zeker negen maand intensieve training nodig (Ellis et al., 2017; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011; Weetjens et al., 2009). Een andere bedenking is dat de detectie van Mtb (*Mycobacterium tuberculosis*) afhankelijk was van de leeftijd van de cultuur. De bacteriën werden vooral herkend in de exponentiële log fase en de vroege stationaire log fase met een sensitiviteit (kans dat een de rat een positief staal als positief aanduidt) van 83.33%, een specificiteit (kans dat rat de negatieve stalen negeert) van 94,4% en een nauwkeurigheid (verhouding tussen correct negatieve (TN) en correct positieve resultaten (TP). Het wordt berekend als volgt: $\frac{TP+TN}{TP+TN+FP+FN}$) van 94%. Wanneer de vroege en late log fase werden geïncorporeerd in de analyse, was de sensitiviteit slechts 50% terwijl de specificiteit hetzelfde bleef. Dit wil zeggen dat tijdens het inzetten van ratten als hulpmiddel om tot een diagnose te komen, niet alle culturen kunnen worden gebruikt en rekening moet gehouden worden met de groeifases (Mgode et al., 2012). Het trainen van ratten is erg tijdrovend en intensief, daarbij komt ook dat na de training de rat geconditioneerd is om slechts op één geur af te gaan (vluchtige verbindingen van Mtb voor het diagnosticeren van tuberculose of de explosieve stof TNT voor het opsporen van landmijnen). Het zou veel tijd besparen en kosten-effectiever zijn moesten ratten ook getraind kunnen worden om meerdere geuren te herkennen (Webb et al., 2020).

2.3.5 Training van detectieratten

Voorafgaand aan de training werden de jonge ratten gesocialiseerd. Vanaf een leeftijd van 3 of 4 weken werden ze gewoon gemaakt aan menselijk contact, zoals aanrakingen en oppakken. Vervolgens werden de ratten ook blootgesteld aan andere omgevingen, smaken, geuren en geluiden (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011). Na de socialisatie werd clickertraining opgestart. Tijdens deze training leerden de ratten de associatie leggen

tussen het geluid van een clicker en het krijgen van een voerbeloning. De clicker wordt dan in de verdere training gebruikt als brug tussen gewenst gedrag en positieve bekrachtiging. Het vormt het markeersignaal voor het krijgen van een beloning. Hierdoor kan het gewenste gedrag met een goede timing “gecaptured” worden en vervolgens bekrachtigd (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011). De volgende stap in de training was de fixatietraining. Tijdens deze training werd de rat in een kooi gezet met een vloer waarin één of meerdere gaatjes zaten, net groot genoeg om de neus in te steken. De rat moest dan leren om zijn neus in het gaatje te houden waaronder het staal zat. De andere gaatjes blijven in deze fase leeg. Het gewenste gedrag werd beloond en het ongewenste gedrag genegeerd. Wanneer de rat dit begreep, werd de tijd dat de rat zijn neus in het gaatje moest houden, opgedreven. Uiteindelijk is het doel dat de rat dit vijf seconden kan volhouden (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011). Voor het trainen van explosieven detectieratten werden stalen met twee gram zand en vijf druppels waterige TNT (2,4,6-trinitrotoluene) onder een gaatje gezet (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011). Voor het trainen van tuberculose detectieratten werden sputumstalen gebruikt die de bacterie *M. tuberculosis* bevatten (Poling et al., 2017; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011).

Na de fixatietraining werd de discriminatie training gestart. Hier moet de rat het verschil ruiken tussen het positieve staal en negatieve stalen (Mgode et al., 2012; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011; Webb et al., 2020). Op het begin kunnen dit totaal andere, niet gerelateerde geuren zijn zoals parfum, koffie of verf. Hierdoor is het voor de rat gemakkelijker om het onderscheid te kennen. Later worden dan in plaats van afleidingsgeuren, negatieve stalen gebruikt die gelijkaardig zijn aan de positieve stalen. In het geval van tuberculose detectieratten kunnen dit stalen zijn met sputum zonder pathogene respiratoire bacteriën (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011). Wanneer ratten dit goed kunnen kan het niveau indien nodig eventueel worden opgedreven en gebruik gemaakt worden van andere soorten pathogene bacteriën uit hetzelfde geslacht, de zogenoemde NTM (nontuberculous mycobacteria). Ratten hebben al bewezen dat ze het verschil kunnen ruiken tussen NTM en Mtb (*Mycobacterium tuberculosis*) en ook tussen Mtb en bacteriën uit een ander geslacht, zoals uit het geslacht *Nocardia* en *Rhodococcus*. Dit kan handig zijn in het voorkomen van een foute tuberculose diagnose bij patiënten die symptomen van tuberculose vertonen, echter besmet zijn door een andere bacterie (Mgode et al., 2012). In het geval van explosieven detectieratten, kan de inhoud van de negatieve stalen gewoon puur zand zijn zonder toevoeging van TNT maar met een beetje water (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011). Tijdens de discriminatietraining werden de ratten beloond wanneer ze hun neus in het gaatje staken waar het positieve staal onder zat. Bij negatieve stalen werd hun gedrag genegeerd (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011; Webb et al., 2020). De frequentie van trainen verschilde per studie. Bijvoorbeeld 10 achtereenvolgende oefeningen, meerdere malen per dag (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011) of per dag 60 tot 90 stalen (inclusief negatief) besnuffelen en beoordelen (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Durgin, et al., 2011).

3 Materiaal en methoden

3.1 Subjecten

Om te onderzoeken of tamme ratten (*Rattus norvegicus domestica*) bieststalen besmet met de MAP bacterie kunnen onderscheiden van negatieve bieststalen, werden vier tamme ratten aangeschaft. De vier ratten kwamen van hetzelfde nest en waren dus genetisch erg aan elkaar gelijk en even oud. Bovendien waren het alle vier mannetjes. Ze kregen alle vier dezelfde voeding, namelijk rattenbrokken van het merk Metazoa®. Af en toe kregen ze een stuk fruit of noten. De beloning tijdens het trainen bestond uit zonnebloempitten en soms een kattenbrokje of een hazelnootje voor extra motivatie. Ze hadden samen dezelfde huisvesting, namelijk een kooi van 120 cm lengte, 60 cm diepte en 77 cm hoogte. Deze kooi was verrijkt met hangmatjes, fleecedekens, knaagtakken en buizen. Regelmatig werd de inrichting veranderd en werden er nieuwe voorwerpen geïntroduceerd. De ratten hadden een leeftijd van 12 weken bij aanschaf. Ze waren zelden tot nooit gehanteerd geweest en dus erg schichtig en bang bij aankomst. Ze waren afkomstig van een hobbykweker van tamme ratten. Drie van de ratten leken erg op elkaar en hadden dezelfde kleur en aftekening namelijk "zwart-wit Japanner". Dit zijn witte ratten met een zwart kopje en een zwarte lijn van het kopje, over de rug, tot aan de staart. Bij één rat was deze lijn onderbroken en bestond de "lijn" uit een vlek. Deze rat heette dan ook Vlekje. Bij een andere rat stopte de lijn boven de staart en eindigde in een stipje. De rat in kwestie heette Stipje. Bij de derde rat liep de streep wel door tot aan de staart in één lijn. Dit was Streepje. Één rat was volledig zwart met witte poten, en heette dan ook Zwartje. De erg simpele maar zeer toepasselijke namen waren er om extra duidelijk te maken welke rat wie was, want hen uit elkaar houden was op het begin geen evidentie. Ze zullen verder in deze bachelorproef dan ook met deze namen benoemd worden en niet met een nummer. Een naam die een visuele voorstelling geeft is beter te onthouden dan een nietszeggend getal en bovendien ook veel persoonlijker.



Figuur 1: 3 van de 4 ratten.

3.2 Objecten

3.2.1 De stalen

De stalen waarmee gewerkt werd zijn Eppendorf© buisjes gevuld met circa één tot twee ml geitenbiest. De biest was afkomstig van 25 verschillende geiten verspreid over vier verschillende bedrijven. 11 van de dieren testten positief. De testen gebeurden in het kader van een Odisee-PWO project op melkgeiten onder leiding van Jo Vicca. De biest per dier werd verdeeld over meerdere Eppendorf© buisjes. Elke geit had een nummer, en de stalen werden gesorteerd in diepvrieszakjes per nummer. Op 22 december 2020 kwamen de stalen in ons bezit en werden meteen weer opgeborgen en bewaard in een diepvriezer. De stalen werden altijd gehanteerd met vinyl wegwerphandschoenen. De positieve stalen werden gehanteerd met een ander paar handschoenen dan de negatieve stalen. De stalen die nodig waren voor de volgende training werden 's avonds rond 21u ontdood en bewaard op een koele en donkere plaats. Tussen 9u en 10u in de ochtend die daarop volgde werd er dan met de ratten getraind. Er zijn hier wel uitzonderingen op geweest. Na de training werden de stalen weer ingevroren en voorzien van een stipje met een alcoholstift zodat duidelijk was welke stalen reeds gebruikt waren. Het kon namelijk interessant zijn om te weten of de rat anders reageerde op stalen die eerder al ontdood waren geweest. Dit wordt echter niet diepgaand onderzocht in deze bachelorproef. De eventuele bevindingen hieromtrent kunnen echter wel interessant zijn om mee te nemen naar volgend onderzoek. Zowel negatieve als positieve stalen werden gemarkeerd met dezelfde alcoholstift en de markering had ongeveer dezelfde grootte en vorm (heel klein stipje). Dit kon dus geen invloed hebben gehad op het vermogen van de rat om te discrimineren.

3.2.2 De trainingskooi

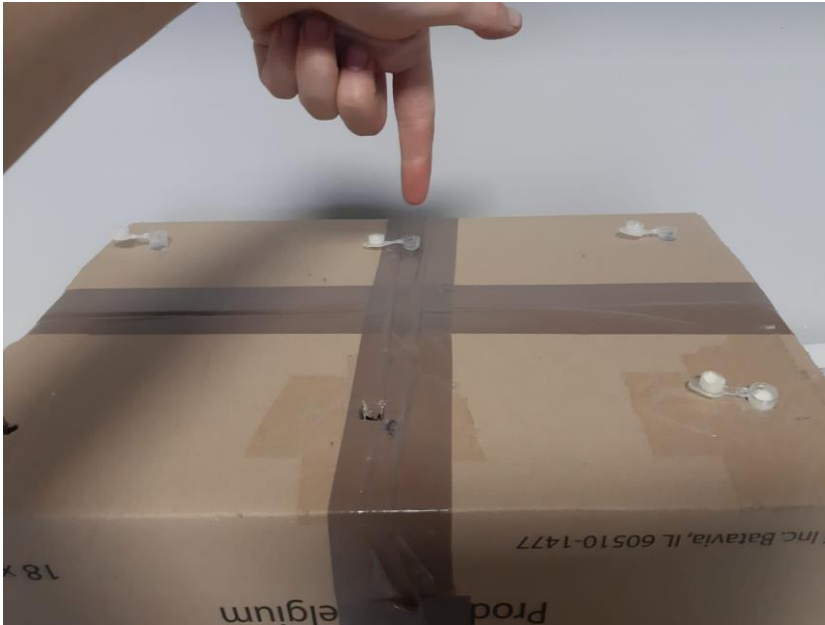
De kooi waar de training van de ratten in verliep was eigenlijk een hamsterkooi waarin een plexiplaat met zes gaten werd bevestigd. De afstand tussen de gaten was 15 cm, en de gaten stonden in een "rechthoekopstelling", namelijk een rij van drie gaten met daarvoor nog een rij van drie gaten. Onder de plexiplaat stond een omgedraaide doos met dezelfde oppervlakte waar ook zes gaten in zaten. De gaten in de doos en in de plexiplaat kwamen overeen. De ratten konden via een deurtje boven in de hamsterkooi op de plexiplaat worden gezet. Ze konden hun neus in de gaatjes steken van de plexiplaat. Ze konden echter geen fysiek contact maken met de stalen die zich daaronder bevonden. Deze stalen werden geplaatst in de gaatjes van de doos. Naast de trainingskooi was er ook de "bank" waarin de ontdooide stalen zaten die nog niet in de trainingskooi werden geplaatst. Dit zijn dus de stalen waarmee gewisseld werd. De "bank" was ook een kartonnen opstelling met gaten. Elk gat had een nummer gelijk aan de nummer van de geitenbiest. De ontdooide stalen werden dus meteen in het juiste gaatje bij de juiste nummer gezet zodat verwarring en vergissingen m.b.t. nummer konden worden voorkomen.



Figuur 2: De trainingskooi, clicker, zonnebloempitten en ontsmettingsmiddel.



Figuur 3: Het deurtje kan open om de ratten in de trainingskooi te zetten.



Figuur 4: De doos die onder de plexiplaat staat en waar de stalen worden opgesteld. De "Bank" is gelijkaardig, maar met gaatjes voor alle stalen met nummer.

3.2.3 Hygiëne

De stalen werden altijd gehanteerd met vinyl wegwerphandschoenen. De positieve stalen werden met een ander paar handschoenen vastgenomen dan de negatieve stalen. Na het hanteren van positieve stalen werden de handen ontsmet, ook al werden daarvoor handschoenen gedragen. Na elke trainingssessie werd ook de plexiplaat in de trainingskooi ontsmet. De kartonnen doos waar de stalen werden ingezet was moeilijker om te ontsmetten doordat karton geen glad oppervlakte heeft en vocht absorbeert. Er kan dus niet met zekerheid worden uitgesloten dat het karton gecontamineerd was, of dat kruiscontaminatie tussen de stalen of tussen de stalen en andere geuren plaatsvond.

3.2.4 Notitieboek

In het notitieboekje werd altijd de plaats van de stalen in de trainingskooi vermeld. Dit werd weergegeven door zes bolletjes, overeenkomend met de zes gaatjes. Een bolletje werd ingekleurd als er op die plek een staal aanwezig was. Dit bolletje kreeg dan ook een bijschrift, namelijk de nummer van het staal, een + of – naargelang of het staal positief of negatief was, en een symbool dat liet weten of het staal hergebruikt werd. Daarnaast werd ook de consistentie van de biest vermeld. Dit kon ook interessant zijn om te zien of een rat bijvoorbeeld een vals positief signaal geeft omdat hij is aangetrokken door een extra romig bieststaal. De datum werd ook vermeld, alsook de tijd per volledige trainingssessie (exclusief wisselen van stalen) en de tijd tot het correcte gedrag per opstelling. Ook werden de gedragingen van de ratten genoteerd. Zeker op het begin werden veel stressgedragingen vertoond zoals conflictgedrag waaronder overspronggedrag zoals wassen en krabben, maar ook klappertanden, bevriezen, urineren en defeceren. Stress heeft mogelijks een invloed op prestaties, en dus was het belangrijk om deze gedragingen te vermelden om eventueel slechte prestaties in de juiste context te zien. Om die reden werden ook eventuele verstoringinvloeden (vooral omgevingsfactoren) vermeld. Het trainen ging door in huis, met al de huishoudelijke geluiden die erbij kwamen kijken. Het toeslaan van deuren, het aanspringen van de verwarmingsketel, blaffen van honden, etc. Dit had allemaal invloed op het gedrag en bijgevolg waarschijnlijk ook op de prestaties van de ratten.

3.3 De training

3.3.1 Socialisatietraining

Tijdens de socialisatietraining werden de ratten gewoon gemaakt aan het aannemen van voedsel uit de hand. Dit op zich ging al erg moeizaam. De ratten waren bij aankomst erg bang en durfden haast niet in de buurt van handen te komen, ook al werd hen voedsel aangeboden. Het voeder werd dan op de grond in hun hok gelegd met het hand nog altijd in de buurt. Dit ging wel wat beter. Na een tijd durfden ze soms voedsel uit de hand aan te nemen. Later werd het aannemen van eten gecombineerd met korte, zachte aanrakingen. Hier raakten ze ook moeilijk aan gewoon. Na veel oefening lukte het echter beter. Ze lieten zich dan erg kort aanraken en sprongen dan weer weg. Ze bleven dan wel in de buurt van het hand, anticiperend op meer voeder. Daarna moesten ze leren wennen aan opgepakt te worden. Door ze eerst eten aan te bieden, dan te aaien en daarna zachtjes en heel kort op te tillen slechts een centimeter omhoog, werden ze ook dat erg langzaam gewoon. De ratten zijn aangeschaft in het begin van november 2020. Tot eind januari 2021 is er niks anders met de ratten gedaan dan deze socialisatietraining. Na deze periode vonden ze het nog altijd erg eng om opgepakt te worden en uit hun hok te worden gehaald. Deze stress had invloed op de prestaties en daarom werden de ratten aangeleerd om zelf uit hun eigen hok in een vervoersmandje te springen. Zo moest er al geen hand in hun “veilige omgeving” binnendringen om hen vast te nemen. Dit werd aangeleerd door consequent voeder aan te bieden in het mandje, en de ratten dus tijdens etenstijd hier hun voederbrokken moesten gaan halen. De ratten moesten dan wel nog vastgepakt worden om uit het mandje, in het trainingshokje te worden gezet (de trainingskooi staat in een andere kamer). Dit leek echter minder stresserend voor hen dan het weggepakt worden uit hun eigen verblijf. Ook werd hen geleerd om zelf uit de trainingskooi terug in het mandje te springen.

3.3.2 Clickertraining

Tijdens de clickertraining werden de ratten om beurten in een trainingskooitje gezet dat in een andere kamer stond dan hun eigen verblijf. Het trainingskooitje moest in een andere kamer staan zodat de ratten die nog in hun verblijf waren, geen waarde zouden hechten aan het clickgeluid in de andere kamer. De click mag pas iets betekenen als ze in het trainingskooitje zitten. Moest het trainingskooitje in dezelfde kamer staan als het rattenverblijf, zou de kans bestaan dat de ratten die niet getraind werden, het clickgeluid niet zouden associëren met beloning en er voortaan geen aandacht meer aan zouden geven. Aan het begin bestond het trainingskooitje gewoon uit een hamsterkooi met twee kleine platformen. De ratten konden dus naar boven en naar beneden. Dit in tegenstelling tot het heden, nu er een plexiplaat de kooi verdeeld in twee delen. In de linkerbovenhoek van de kooi, vlak boven het bovenste verdiep, werd telkens een beloning aangeboden. Eerst zonder klikgeluid, gewoon om de rat te leren dat er op die plek eten te halen viel. Dit was op het begin al een uitdaging op zich. De ratten waren snel van slag doordat ze in een nieuwe omgeving zaten en waren vooral bezig met het zoeken van een uitweg. Hierdoor hadden ze geen aandacht voor het voeder dat getoond werd. Na een tijd (bij de ene rat al sneller dan bij de andere), kwamen ze het eten halen. Wanneer ze hier vertrouwd mee waren, werd een klikgeluid gemaakt vlak na het aannemen van de beloning. De reden dat de klik pas na het aannemen werd gegeven, is omdat de ratten in het begin erg verschoten van het klikgeluid en hierdoor het zien van het voeder zouden kunnen associëren met verschieten. Het laatste dat we konden gebruiken was een rat die een aversie kreeg van de beloning. Het leek dus verstandiger om de rat eerst de kans te geven de beloning aan te nemen en te beseffen dat het voeder, en dus iets leuks is, en pas daarna het klikgeluid te geven. Ook dan verschoten ze soms nog, en lieten hun beloning

vallen, ze kwamen echter meestal wel terug om het weer op te rapen. Soms weigerden ze een poosje om een beloning te komen halen, waarschijnlijk toch vanwege de associatie met het “enge” klikgeluid. Naast het verschieten van het klikgeluid en het weigeren van voeder, zorgde stress ook voor nog andere gedragingen die de training in de weg stonden. Verstrooidheid, afgeleid zijn, een uitweg zoeken, overspronggedrag zoals voortdurend krabben of wassen, urineren en defeceren en klappertanden waren gedragingen die de ratten in meer en mindere mate vertoonden. Vooral het volledig bevriezen was erg nadelig voor de training. De rat stopte met elke vorm van beweging en bleef dan verstijfd staan. Dit kon duren van enkele seconden tot soms meer dan een kwartier. Er werd in dat geval gewoon geduldig gewacht, en wanneer de rat terug in beweging kwam werd hij beloond en weer in zijn eigen verblijf gezet. Wanneer de ratten eindelijk wat meer vertrouwen kregen in de situatie werd het timen van het kliksignaal langzaam opgeschoven, zodat er geklikt werd vlak voor de rat de beloning aannam. Pas wanneer de ratten na het horen van het kliksignaal hun beloning kwamen vragen in het hoekje waar ze die altijd kregen, kon er van worden uitgegaan dat ze de associatie hadden gelegd tussen het kliksignaal en voeder.

Wanneer dit goed ging, werd geprobeerd om de ratten een simpele opdracht te leren met behulp van de clicker. Een klein blauw potje werd op de plaats gezet waar de ratten hun voerbeloning kregen. De bedoeling was om de ratten te leren hun neus in het potje te steken. Door dit aan te leren werd er gewacht tot de rat interesse in het potje toonde en eraan snuffelde. Hierop volgde het kliksignaal waarna de rat meteen anticepeerde op een beloning en deze in het hoekje kwam vragen en kreeg. Wanneer dit goed ging werd pas geklikt nadat de rat zijn neusje in het potje stak. De volgende opdracht was om hun volledige kopje in het potje te steken wanneer het potje ergens anders in het trainingskooitje lag. Ook hier werd weer opgebouwd van toenadering zoeken bij het potje, snuffelen aan het potje, neus in het potje, tot het volledige kopje in het potje te steken. De tijdsduur om dit te leren verschilde tussen de vier ratten, alsook het aantal gedragingen en stresssignalen die de training hinderden. Dit wordt bij de resultaten visueel weergegeven aan de hand van een diagram.

3.3.3 Fixatietraining

De fixatietraining werd opgedeeld in twee fases. In fase 1 waren er maar twee gaatjes, waarvan één leeg en één met een positief staal. Het positief staal bleef heel lang op dezelfde plaats, ook al hadden de ratten het meerdere keren juist aangeduid. Tijdens fase 2 waren er zes gaatjes waarvan één met een positief staal en vijf leeg. Het positief staal veranderde van plaats na het één keer juist aan te duiden. Hieronder wordt dieper ingegaan op het verloop van de 2 fases.

3.3.3.1 Fase 1

Voor de fixatietraining fase 1 werd het trainingskooitje aangepast. De twee kleine platformen werden eruit gehaald, en er werd een plexiplaat met twee gaatjes die 15cm uit elkaar stonden, in het hok geplaatst. Onder deze plexiplaat werd een omgedraaide doos gezet met dezelfde oppervlakte als de plexiplaat, waar ook twee gaten in werden gemaakt die overeenkwamen met de gaatjes in de plexiplaat. In deze gaatjes kon dan een staal (Eppendorf© buisje met biest) worden geplaatst. Voor de fixatietraining werd maar één staal per keer gebruikt, en dit staal was altijd een positief staal zodat de ratten meteen leerden fixeren op de juiste geur. Een rat werd in het hok gezet, en er werd gewacht tot de rat interesse toonde in het gaatje waar het positieve staal zich bevond. Op het moment dat de rat zijn neus boven het gaatje hield of nog maar in de buurt van het gaatje kwam, werd er met het kliksignaal duidelijk gemaakt dat hij goed bezig was. Meestal zochten de ratten dan opnieuw dat gaatje op, en werd er weer geklikt en daarna uiteraard beloond met een voederbeloning op dezelfde plaats als altijd, in het linkerbovenhoekje van de kooi. Het kliksignaal werd dan langzaam uitgesteld, zodat de

rat steeds dichterbij met zijn neus bij het gaatje moest komen, en later zijn neus ook dieper in het gaatje moest steken. Wanneer dit goed ging, werd de tijd dat de rat zijn neus in het gaatje moest houden, opgetrokken tot twee seconden. Later in de training wordt dit verder opgetrokken tot vier à vijf seconden. Wanneer de rat interesse toonde in het gaatje zonder staal, werd dit genegeerd.

Op het begin toonden de ratten in geen enkel gaatje interesse. In dat geval was het een kwestie van erg lang wachten tot de rat op onderzoek ging. Wanneer de rat erg gestresseerd was en in "freezemode" ging (apathisch stilzitten), werd hij gelokt met eten om hem over zijn blokkerende angst heen te zetten. Wanneer de rat het eten aannam en weer relaxter was, werd hij gelokt naar het juiste gaatje en werd de voederbeloning (zonnebloempit) bij het gaatje gelegd. Wanneer deze op was, snuffelde de rat even ter plekke of hij geen kruimeltje vergeten was (dit dus in de buurt van het positieve staal, aangezien hij hier eerder al naartoe was gelokt). Op dat moment werd dan nog eens geklikt, om te belonen dat de rat "zoekt" in de buurt van het staal. Deze beloning ging de rat dan ophalen op de gewoonlijke plek in het linkerhoekje. Daarna ging hij dan meestal weer naar de plek waar hij was wanneer er geklikt werd, in dit geval dus bij het gaatje met het positieve staal. Dit werd zo even volgehouden tot de rat er weer alle vertrouwen in had om te onderzoeken, en op termijn zijn neusje ook echt in het gaatje te steken.

Op het begin was de keuze van de ratten redelijk willekeurig. Op één trainingssessie mochten de ratten meerdere keren gaatjes aanduiden, ook het positieve staal, terwijl het positieve staal op dezelfde plaats bleef. Dit wegens praktische redenen. Voor de training zou het wellicht beter zijn om het staaltje telkens te verplaatsten. De opbouw van de trainingskooi liet dat echter niet toe, tenzij de rat telkens in en uit het hok werd genomen. Aangezien de ratten uit zichzelf al snel gestresseerd waren, en stress een zeer belemmerende factor is in de training, werd er dus voor gekozen dit niet te doen. Er werd dan ongeveer vijf minuten uitgerekend per rat. In die tijd konden ze dan kiezen hoe vaak ze het staal aanduiden. Deze tijd was in de praktijk soms veel langer omdat sommige ratten blokkeerden van de stress of heel afgeleid waren. Bij sommige ratten was het juist korter wanneer ze het heel goed deden. Dan was het beter om de oefening te stoppen op een goed moment, en niet te wachten tot ze verveeld of afgeleid geraakten. Na de min of meer vijf minuten werd het staal wel verplaatst. De meest gemotiveerde ratten hadden dus de minste tijd en de meeste pogingen (zowel juist als fout, beide werden als pogingen gerekend om de motivatie te peilen). Wie een hoger percentage juiste pogingen had werd verondersteld de oefening beter te begrijpen. Echter was het hoge percentage juiste pogingen allicht vooral te wijten aan het feit dat het positieve staal lang op dezelfde plek bleef staan, en de ratten dit onthouden hebben. Zelfs moest het staal elke keer verplaatst worden zou er nog altijd een 50% kans zijn dat de rat het juist (of fout) heeft omdat er maar twee gaatjes zijn in deze fase. Dit was ook niet erg, aangezien het vooral de bedoeling was om de ratten te motiveren hun neusje in de gaatjes te steken, en nog niet om echt al op de biestgeur af te gaan. Dat komt in fase 2.

3.3.3.2 Fase 2

Fase 2 is gelijkaardig aan fase 1, maar met meer gaatjes en meer wissels. Dit is eigenlijk de echte fixatietraining. Er werden in het trainingskooitje vier gaten extra bijgemaakt zodat er in totaal zes gaten zijn. De ratten moesten leren om het volledige platform te gebruiken om het staal te zoeken. Vaak bleven ze op het begin in de buurt van het hoekje waar ze een beloning kregen, of in de buurt waar het staal de vorige keer stond. Wanneer de ratten het staal toch vonden, waren ze meestal erg van slag als die daarna niet meer op dezelfde plaats stond. Dan vertoonden sommigen erg veel stressgedrag. Deze stijging in stress kan ook komen door het telkens oppakken van de ratten wanneer de wissels gebeurde. Ze waren immers nog niet volledig vertrouwd aan mensenhanden. Over het algemeen echter waren de ratten meer op hun gemak dan tijdens de vorige fases. Ze namen het eten altijd aan, verschoten niet meer van het geluid van de clicker en kwamen meteen als ze het clicksignaal

hoorden. Om die reden is er tijdens fase 2 van de fixatietraining meer gekeken naar andere stressgedragingen zoals conflictgedragingen met name krabben en wassen, maar ook bevriezen, klappertanden, urineren, defeceren en het verschieten van andere geluiden.

3.3.4 Discriminatietraining

Ook de discriminatietraining werd in meerdere fases en delen opgedeeld.

3.3.4.1 Fase 1

Fase 1 van de discriminatietraining is vergelijkbaar met fase 1 van de fixatietraining. Fase 1 is een fase van tien trainingen verdeeld over tien dagen. Er is een positief staal en een negatief staal opgesteld. Deze worden niet meteen van plaats veranderd als de rat het juist heeft. Deze fase gaat er vooral over om de rat te tonen dat het aanwijzen van een staal niet altijd resulteert in een beloning, en hij dus gemotiveerd moet worden om verder te zoeken. Het positief staal blijft dus ook een tijdje op dezelfde plaats om de rat extra te motiveren en het niet te moeilijk te maken. Na het een aantal keer juist aan te duiden verandert het wel van plaats. Bij de meest stressgevoelige of minst gemotiveerde ratten beef het langer op dezelfde plaats. Per training werd geteld hoe vaak een rat een staal aanduidde. De ratten werden enkel beloond bij het positieve staal. Zowel foute als juiste pogingen werden bijgehouden om weer te geven welke rat het meest gemotiveerd was om het staal te zoeken. Aangezien de stalen vaak op dezelfde plaats bleven staan, en de ratten dus vaak konden terugkeren naar dezelfde plaats als ze het juist hadden, waren “juiste pogingen” vaak het resultaat van een goed ruimtelijk geheugen, en niet van de vaardigheid om de geuren te discrimineren. Het percentage juiste pogingen wordt dus om die reden niet weergegeven in deze fase omdat dit een fout beeld geeft. De stressgedragingen werden bijgehouden en genoteerd.

3.3.4.2 Fase 2

Fase 2 is een fase van 16 trainingssessies verdeeld over 16 dagen. De trainingen bestaan uit verschillende opstellingen en beurten. Tijdens fase 2 werden er in de opstelling één tot twee (dezelfde) negatieve stalen geplaatst en één positief staal. Tijdens dezelfde trainingssessie bleven de stalen hetzelfde. Dus bij een volgende opstelling in dezelfde trainingssessie werden geen nieuwe stalen geïntroduceerd, enkel van plaats veranderd. De volgende trainingssessie werden het wel andere stalen. De ratten mochten tot max. drie keer naar het positieve staal gaan om het aan te duiden terwijl het op dezelfde plek bleef. Na de derde keer veranderde het van plaats. De reden dat het pas na de derde keer werd gewisseld, is omdat de ratten de eerste keer vaak erg onzeker waren in het aanduiden van het staal. Zo staken ze hun neusje niet diep genoeg in het gaatje, snuffelden maar heel kort of raakten meteen in “bevriesmodus”. Door ze extra slaagkansen te geven, leken ze zekerder en gemotiveerder te worden. Wanneer een rat erin slaagde het positieve staal drie keer aan te duiden wanneer het op dezelfde plek bleef, werd het staal van plaats verwisseld. Het aantal van deze wissels werd per rat bijgehouden. Hoe meer wissels, hoe beter de rat presteerde. Weinig wissels had vaak te maken met stress zoals lang in “bevriesmodus” zitten, afgeleid zijn, of vooral ruiken aan de lege gaatjes en negatieve stalen.



Figuur 5: Onduidelijke foto van Vlekje. Hier duidt hij een positief staal aan door zijn neus in het gaatje te steken.

3.3.4.3 Fase 3

Tijdens fase 3 nam enkel Vlekje nog deel aan de trainingen. Vlekje was duidelijk de meest gemotiveerde rat met het meeste kans om de discriminatietraining onder de knie te krijgen. Al de aandacht en tijd werd vanaf nu dus enkel in hem geïnvesteerd. Deze fase telt 53 trainingssessies die bestaan uit meerdere opstellingen en beurten. Er werden in deze fase 2 stalen per keer opgesteld en werden er per trainingssessie acht verschillende stalen gebruikt (vier positieve en vier negatieve). Er waren dus vier verschillende combinaties per trainingssessie mogelijk. Aangezien de stalen van plaats veranderde, en er zes mogelijke plaatsen zijn, dreef dit de variatie wel op. De rat mocht maar max. twee keer hetzelfde positieve staal aanduiden. Dus wanneer hij het positieve staal vond, juist aanduidde en werd beloond, mocht hij nog één keer naar diezelfde plek terugkeren om dan weer beloond te worden. Daarna werden alle stalen verwisseld en van plaats veranderd. Het aantal wissels per trainingssessie verschilde en hing erg af van de rat zijn gemoedstoestand (stressniveau, niveau van motivatie, afgeleid zijn, etc.)

Het was moeilijk om te zeggen wanneer de rat zelf leek te weten dat hij het juiste gaatje gevonden had. Er zijn verschillende gedragingen die erop kunnen wijzen dat de rat het staal interessant (“hierop volgt normaal een beloning”) of oninteressant (“hierop volgt geen beloning”) vond. Zo liet onderzoek zien dat honden korter ruiken aan stalen wanneer het om een correct negatieve aanduiding gaat (true negatives) en niet terugkeren naar dat staal. Dit terwijl ze wel eerder geneigd zijn om terug te keren in gevallen van vals- of correct positieve aanduidingen en ook bij vals negatieve aanduidingen (Concha et al., 2014). Vlekje vertoonde de volgende gedragingen en deze werden ook telkens genoteerd; 1) Beloning vragen na aan een gaatje te ruiken. Dus meteen na het ruiken naar het hoekje komen waar hij normaal een beloning krijgt zonder eerst een kliksignaal te horen. 2) blijven staan bij het gaatje waar hij zojuist aan geroken heeft. 3) minstens drie seconden ruiken. 4) neus erg diep in het gaatje steken (dit kan samengaan met andere gedragingen). 5) terugkeren naar het gaatje waar hij al eerder aan geroken heeft. En 6) veel keer kort achter elkaar aan het gaatje ruiken. Omdat de rat nog in een vroeg stadium van de discriminatietraining zat, en dus nog niet zeker was wat hij nu juist moest aanduiden, werden deze gedragingen zowel bij positieve als bij negatieve stalen wat door elkaar vertoond. Er werd getracht om deze gedragingen om te vormen naar een meer duidelijk beeld, namelijk minstens 3 seconden lang het neusje diep in het gaatje steken bij het positieve staal, en bij

negatieve stalen altijd door te lopen na eventjes kort te ruiken. Fase 3 van de discriminatietraining wordt nog eens in drie delen opgedeeld. Deel 1 omvat de eerste 17 trainingssessies. Deel 2 omvat de 18 middelste trainingssessies en deel 3 omvat de 18 laatste trainingssessies. Voor elk van deze delen worden de verschillende gedragingen en hoe vaak ze binnen dat deel werden vertoond, weergegeven.

3.3.4.4 Fase 4

Tijdens fase 4 werd er dieper ingegaan op hoe lang Vlekje zijn neus in de verschillende gaatjes houdt inclusief de lege gaatjes. Er werd nu getracht om de tijd dat Vlekje zijn neus in het gaatje van het positieve staal hield, op te drijven van drie seconden naar vier à vijf seconden of soms zelfs meer, en om de tijd bij de andere gaatjes te minderen. Omdat het ruiken aan de gaatjes vaak erg snel achter elkaar gebeurt, en de timing van het belonen heel belangrijk is, was het moeilijk om voor elk gaatje de correcte tijd te noteren en te timen. Daarom werd vanaf fase 4 elke trainingssessie gefilmd en werd achteraf bekeken hoe lang er nu juist aan elk gaatje werd gesnuffeld. Ook deze fase werd in verschillende delen opgesplitst om de vordering in beeld te brengen. Voor elke tien trainingssessies werd een grafiek gemaakt. Er zijn 30 trainingssessies in totaal, dus zijn er drie delen. Tijdens deze fase werd vlekje niet meer zomaar beloond als hij aan het positieve staal snuffelde. Hij moest zijn neusje diep genoeg steken en dit minstens drie seconden volhouden voor deel 1, en vier sec voor deel 2 en 3. Dan pas werd hij beloond. Tijdens deel 1 mocht hij na het juist aanduiden van het positieve staal, nog één keer terugkeren om het juist aan te duiden. Daarna werden de stalen verwisseld. Tijdens deel 2 mocht dit slechts af en toe, en tijdens deel 3 en 4 niet meer, dan werden de stalen meteen verwisseld. Het zijn dan ook deze 2 laatste delen waarop de sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid getest wordt.

3.3.5 Werken met blank trials (enkel negatief)

Vanaf deel 2 van fase 4 van de discriminatietraining werd tijdens sommige trainingssessies een opstelling geïntroduceerd met enkel negatieve stalen. Tijdens deze “blank trials” moest de rat leren om, wanneer hij geen positief staal vond, naar het hoekje te gaan waar hij normaal beloond wordt. Wanneer hij dus toevallig in het hoekje kwam tijdens het zoeken naar het positief staal, maar deze niet vond, werd hij beloond. De bedoeling is dan om de tijd dat Vlekje in het hoekje staat op te drijven tot vier seconden. Vlekje werd nooit beloond tijdens een blank trial als hij eerst in het hoekje kwam zitten zonder eerst de stalen af te gaan. Pas als hij overal aan had geroken en hij dan niks vond, mocht hij naar het hoekje komen om daar te wachten. Na enkele seconden kreeg hij dan zijn beloning. In totaal vonden er 11 blank trials plaats verdeeld over verschillende trainingssessies. Ze volgden nooit achter elkaar.

3.3.6 Werken met meerdere positieve stalen

Vanaf deel 3 van fase 4 werden ook opstellingen geïntroduceerd met twee positieve stalen. Hier moest Vlekje na het aanduiden van het positieve staal, en zijn beloning te ontvangen, zoeken naar een ander positief staal. Dit was moeilijk, omdat hij na het krijgen van zijn beloning bij positief staal nummer 1, ook direct terug ging naar positief staal nummer 1 en niet op zoek ging naar positief staal nummer 2. Ook wanneer hij niet meer voor de tweede keer beloond werd bij positief staal nummer 1, bleef hij het aanduiden of raakte hij zo in de war dat hij in bevriesmodus ging. De positieve stalen werden dus altijd naast elkaar geplaatst, in de hoop dat hij dan rapper tot het volgende staal zou overgaan. Wanneer hij in bevriesmodus ging, werd hij met eten gelokt naar het volgende staal. Wanneer hij er dan aan snuffelde, zelfs al was het maar kort, werd hij beloond. Natuurlijk ging hij na dit te oefenen

telkens naar positief staal nummer 2 en werd dezelfde methode toegepast om hem weer naar positief staal nummer 1 te krijgen. Dit werd volgehouden tot Vlekje eindelijk doorkreeg wat de bedoeling was. Het bleef moeilijk, en hij kent het nog niet volledig, maar het is duidelijk dat er verbetering was en het lijkt dus dat mits veel oefening, het mogelijk is om hem dit te leren. Omdat er slechts enkele van deze opstellingen voorkwamen als test, worden hier geen resultaten van weergegeven.

3.4 De blinde test

Het was normaal gezien de bedoeling dat er een test zou plaatsvinden waarbij een tweede persoon de opstelling maakte zodat de persoon die de test afnam niet wist waar de positieve en waar de negatieve stalen waren. Deze tweede persoon zou dan wel in de kamer moeten blijven om het vermoeden van de tester al dan niet te bevestigen als die denkt dat de rat het staal gevonden heeft. Zo kon de rat juist beloond worden, wat belangrijk was om hem niet in de war te brengen. Helaas was Vlekje niet gewoon om te trainen met een tweede persoon in de kamer, en ging volledig in bevroersmodus. Om te voorkomen dat stress invloed zou hebben op de gewone trainingen, is er niet verder op doorgewerkt. Dat Vlekje zo van slag zou zijn was iets onvoorziens. Het is echter wel interessant om te weten, zodat hier bij toekomstige trainingen van andere ratten rekening mee kan worden gehouden, en de ratten dit van jongs af aan gewoon kan worden gemaakt.

3.5 Sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid

Om een goed beeld te krijgen van de mogelijke inzetbaarheid van de ratten in de praktijk wordt op het einde de sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid berekend. De resultaten van de laatste 20 sessies van de discriminatietraining worden genomen om dit in kaart te brengen. Er wordt dan gekeken hoeveel correct positieve aanduidingen (true positives = TP), correct negatieve aanduidingen (true negatives = TN), vals positieve aanduidingen (false positives = FP) en vals negatieve aanduidingen (false negatives = FN) er zijn geweest. Vanaf een rat op het einde van de discriminatietraining (dus tijdens de 20 laatste sessies) vier seconden of langer aan een gaatje rook, werd dit gezien als een positieve aanduiding. Afhankelijk van het staal gaat het dan over een correct positieve aanduiding als de rat het bij een positief staal doet (TP), of een vals positieve aanduiding als de rat het bij een negatief staal doet (FP). Wanneer de rat minder dan vier seconden aan een staal ruikt geldt de volgende regel: Wanneer hij minder dan vier seconden ruikt aan een negatief staal gaat het om een correct negatieve aanduiding (TN). Als hij minder dan vier seconden ruikt aan een positief staal gaat het om een vals negatieve aanduiding (FN). Wanneer het aantal TP, TN, FP en FN is bepaald, wordt de sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid berekend. Sensitiviteit is de vaardigheid of het vermogen om positieve stalen aan te duiden en te onderscheiden van de groep. Dit wordt bepaald door de correct positieve aanduidingen te delen door de correct positieve aanduidingen opgeteld met de vals negatieve aanduidingen. Concreet is dat de volgende bewerking: $TP/TP+FN$. Deze uitkomst wordt dan vermenigvuldigd met 100 om op een percentage uit te komen. De specificiteit is de vaardigheid of het vermogen om negatieve stalen te herkennen en te kunnen onderscheiden. Dit wordt berekend door de correct negatieve aanduidingen te delen door de correct negatieve aanduidingen opgeteld met de vals positieve aanduidingen. Simpel uitbeeld is dat dus zo: $TN/TN+FP$. Ook deze uitkomst wordt dan vermenigvuldigd met 100 om een percentage te verkrijgen. Naast de sensitiviteit en de specificiteit wordt ook de nauwkeurigheid ofwel accuraatheid berekend. De nauwkeurigheid laat zien hoe dicht de metingen van een diagnosemethode liggen tegen de effectieve waarde van wat er gemeten wordt. In dit geval bepaald het dus in hoeverre de "antwoorden" van de ratten op de vraag wat de positieve en wat de negatieve stalen zijn, overeenkomen met de effectieve besmettingswaarde van deze stalen.

Nauwkeurigheid wordt berekend door de som van de correct positieve aanduidingen en correct negatieve aanduidingen te delen door de som van de correct positieve aanduidingen, correct negatieve aanduidingen, vals positieve aanduidingen en vals negatieve aanduidingen. Dus $TP+TN/TP+TN+FP+FN$.

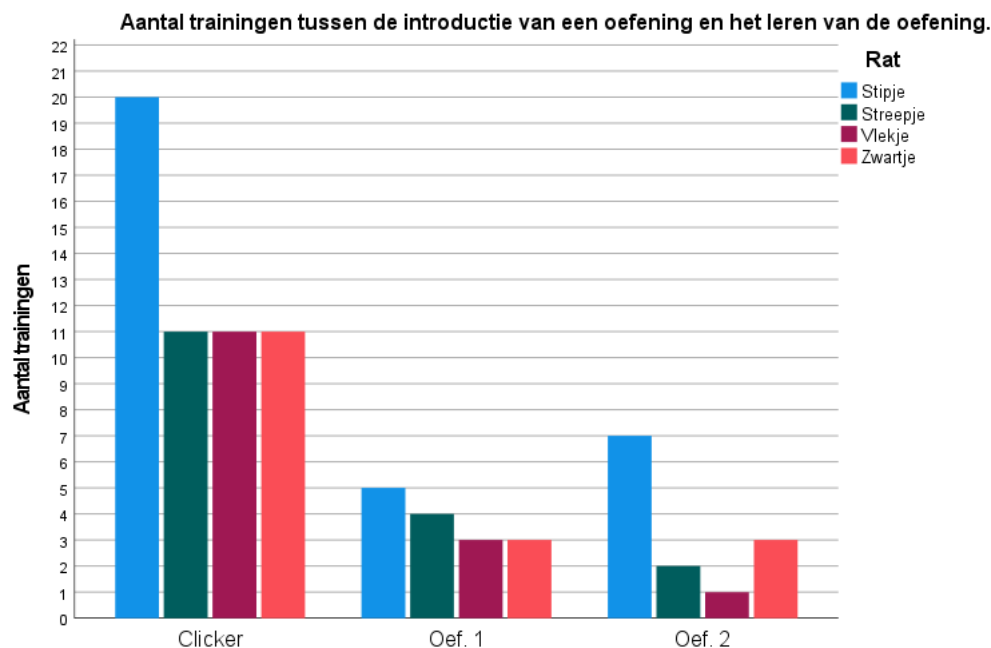
4 Resultaten

4.1 Clickertraining

Hieronder wordt het verschil in leersnelheid aangetoond tussen de verschillende ratten tijdens de fase van clickertraining. Onder deze fase valt de clickertraining zelf, met andere woorden het leggen van een associatie tussen het geluid van de clicker en een voederbeloning. Onder deze fase vallen echter ook de voorbereidingsoefeningen van de clickertraining, namelijk oefening 1 (Oef. 1): het leren aan de ratten met behulp van de clicker om hun neus in een klein potje te steken dat op dezelfde plaats blijft staan, en oefening 2 (Oef. 2): het leren aan de ratten met behulp van de clicker om hun kopje in een klein potje te steken dat van plaats veranderd. In tabel 1 zien we de totale tijd die nodig was en figuur 6 laat visueel zien hoeveel trainingen nodig waren per onderdeel van de clickertraining per rat. In zowel de tabel als de figuur zien we dat Vlekje het minste tijd nodig had en Stipje veruit het meest.

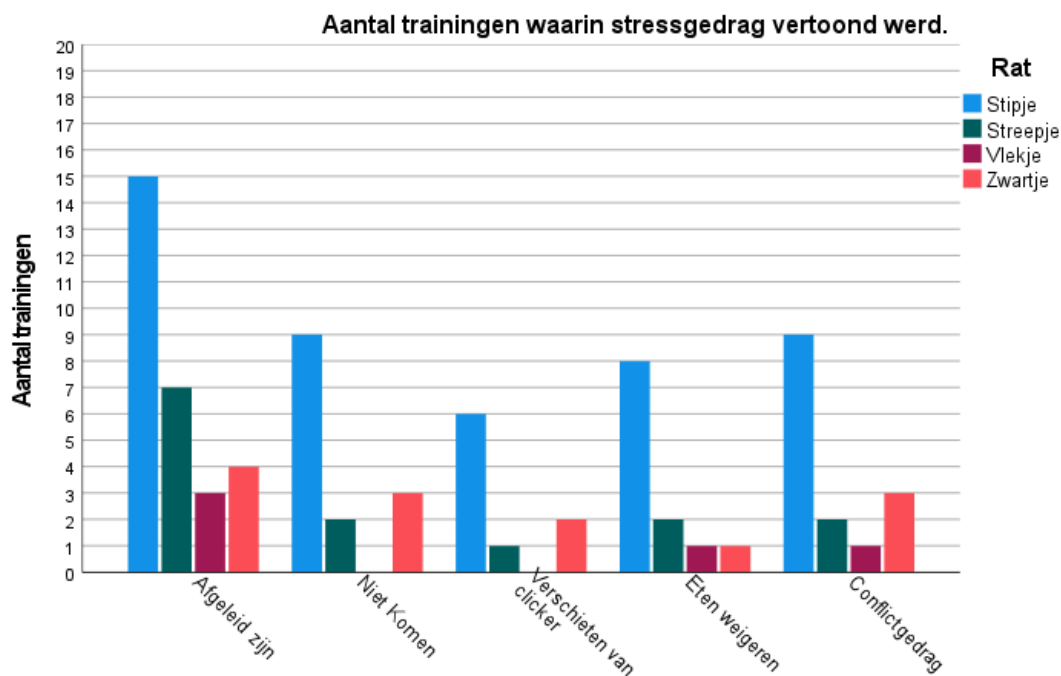
Table 1: Aantal trainingssessies en de totale tijdsduur per rat voor de clickertraining.

Rat:	Totaal aantal trainingssessies:	Totale tijdsduur:
Streepje	17	1 uur en 26 minuten
Vlekje	15	1 uur en 12 minuten
Zwartje	17	1 uur en 29 minuten
Stipje	32	2 uur en 40 minuten



Figuur 6: Resultaten van de clickertraining.

Op de volgende grafiek (Figuur 7) wordt het verschil in het uiten van stressgedrag tussen de verschillende ratten getoond. Onder conflictgedrag horen overspronggedragingen zoals krabben en wassen, maar ook klappertanden en bevroren zitten onder deze categorie. We zien dat Stipje veruit het meeste stressgedrag vertoonde en dat Vlekje opvallend minder stressgedrag liet zien dan de andere ratten.



Figuur 7: Stressgedrag tijdens de clickertraining.

4.2 Fixatietraining

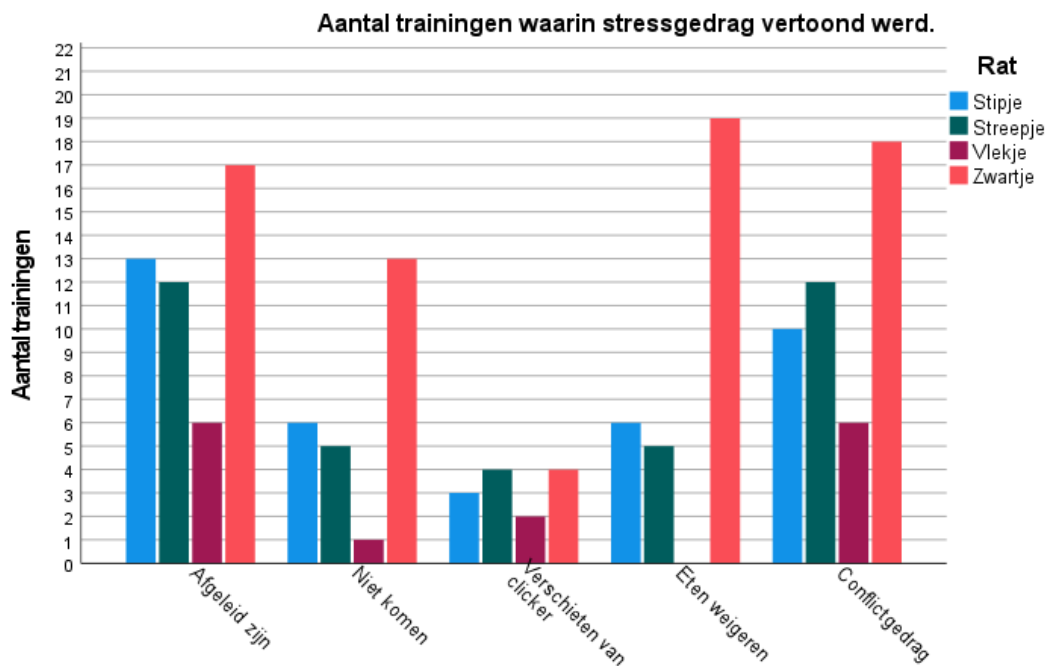
4.2.1 Fase 1

Tijdens het eerste deel van de fixatietraining moesten de ratten het juiste gaatje aanduiden, namelijk het gaatje waaronder een positief staal lag. Er waren in deze fase maar twee gaatjes. In de tabel hieronder (Table 1) wordt de tijd weergegeven die nodig was om de eerste fase van de fixatietraining onder de knie te krijgen per rat. We zien weer dat Vlekje het minste tijd nodig had en Stipje het meest.

Table 2: Het aantal trainingssessies en de totale trainingsduur per rat voor fixatietraining fase 1.

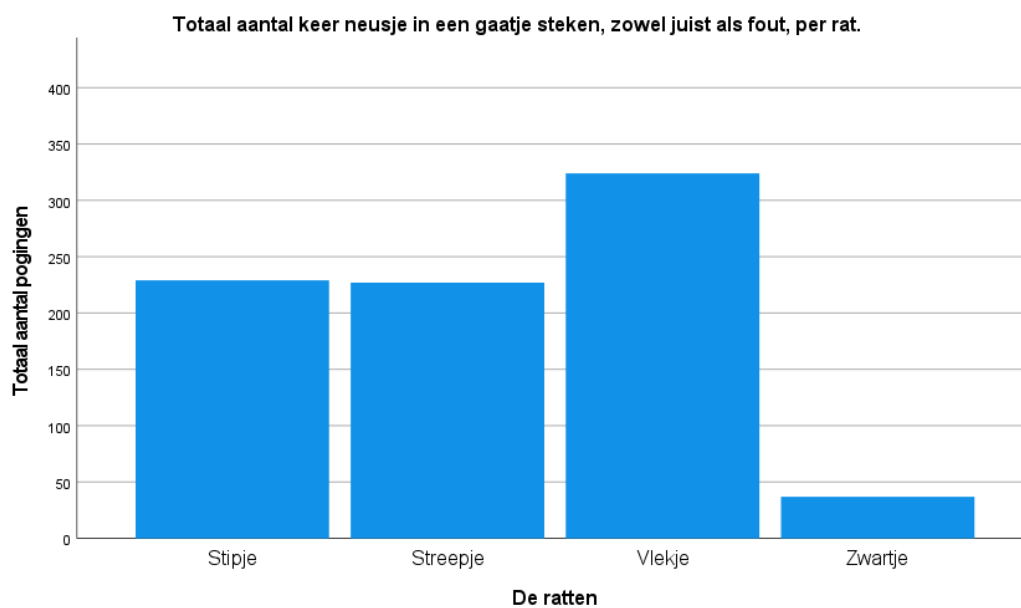
Rat:	Aantal trainingssessies:	Totale tijd voor fixatietraining deel 1:
Stipje	22	2uur, 36min en 0sec.
Streepje	22	2uur, 25min en 12sec.
Vlekje	22	1uur, 28min en 12 sec.
Zwartje	22	2uur, 15min en 36sec.

In de grafiek hieronder (Figuur 8) wordt het verschil in stressgedrag tussen de ratten weergegeven tijdens de eerste fase van de fixatietraining. Deze keer toont Zwartje het meeste stressgedrag, maar Vlekje weer duidelijk het minst.



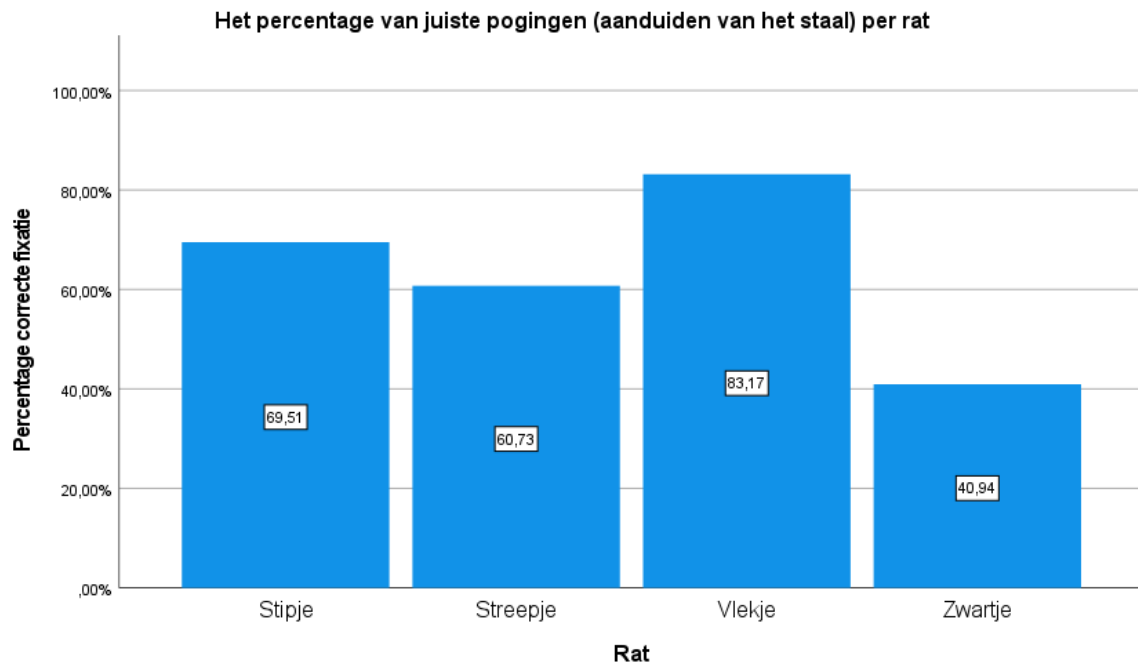
Figuur 8: Stressgedrag tijdens fixatietraining fase 1.

Tijdens de fixatietrainingen van fase 1 werd het totaal aantal pogingen genoteerd, zowel juist (aanduiden van het positief staal) als fout (aanduiden van het leeg gaatje) (Figuur 9). Vlekje was de rat die het meest aantal keer zijn neus in een gaatje stak, terwijl Zwartje duidelijk de minste pogingen ondernam.



Figuur 9: Resultaten 1 fixatietraining fase 1.

Van al deze pogingen werd vervolgens het percentage juiste pogingen genomen. Dit wordt weergegeven in de grafiek hieronder (Figuur 10). Merk op, het positieve staal bleef vaak staan en er zijn maar twee gaatjes. Ook hier zien we dat Vlekje het beste scoorde en dat van de weinige pogingen van Zwartje, maar een klein percentage juist was.



Figuur 10: Resultaten 2 fixatietraining fase 1.

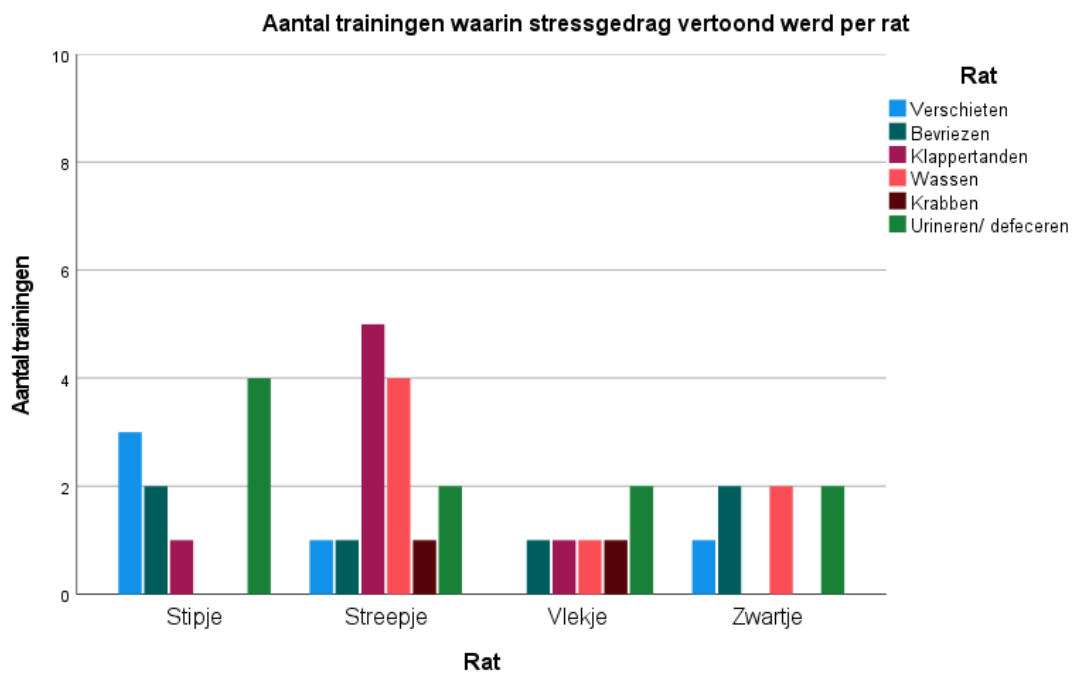
4.2.2 Fase 2

Tijdens het tweede deel van de fixatietraining waren er zes gaatjes, en werd het staal na enkele keren juist aanduiden van plaats veranderd. In Tabel 2 wordt de leertijd weergegeven.

Table 3: Aantal trainingssessies en totale trainingsduur per rat voor fixatietraining fase 2.

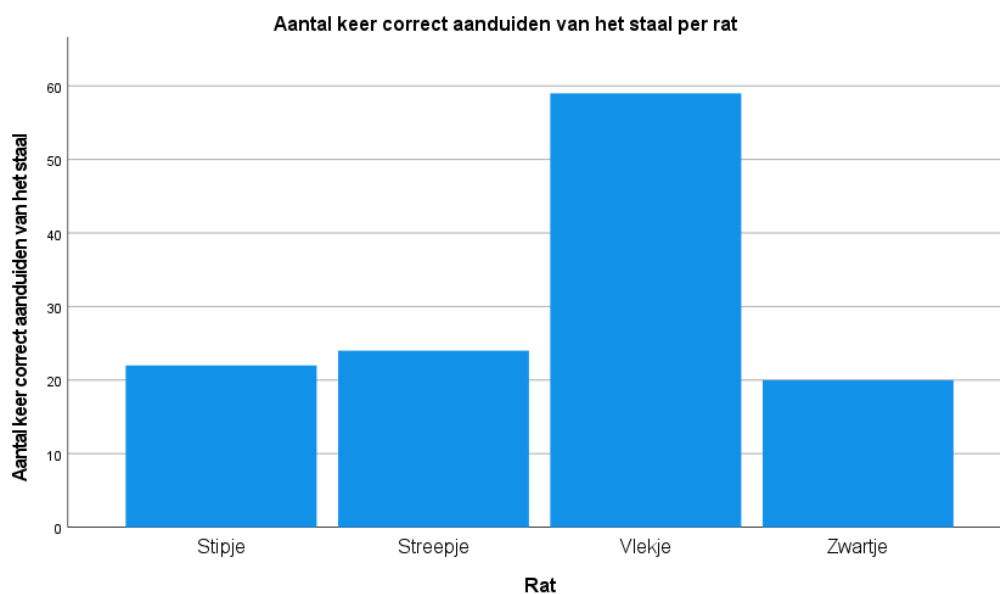
Rat:	Aantal trainingssessies:	Totaal tijd voor fixatietraining deel 2:
Stipje	10	1 uur, 16 min en 12 sec
Streepje	9	56 min en 24 sec
Vlekje	5	46 min en 48 sec
Zwartje	9	1 uur, 6 minuten en 36 sec

Hieronder (Figuur 11) wordt het stressgedrag tijdens fase 2 van de fixatietraining getoond.



Figuur 11: Stressgedrag tijdens fixatietraining fase 2.

Tijdens fase 2 werd het staal al na één keer juist aanduiden van plaats verwisseld, en kon de rat dus niet meer rekenen op zijn geheugen. Hieronder (Figuur 12) wordt het aantal juiste pogingen, en dus het aantal keer dat een staal gewisseld werd, weergegeven. Er is geen percentage om weer te geven omdat het totaal aantal keer ruiken aan de gaatjes (inclusief de lege) tijdens deze fase niet is bijgehouden. We zien dat Vlekje beduidend meer correcte pogingen deed en dat de andere ratten redelijk gelijkaardig scoorden.



Figuur 12: Resultaten fixatietraining fase 2

4.3 Discriminatie training

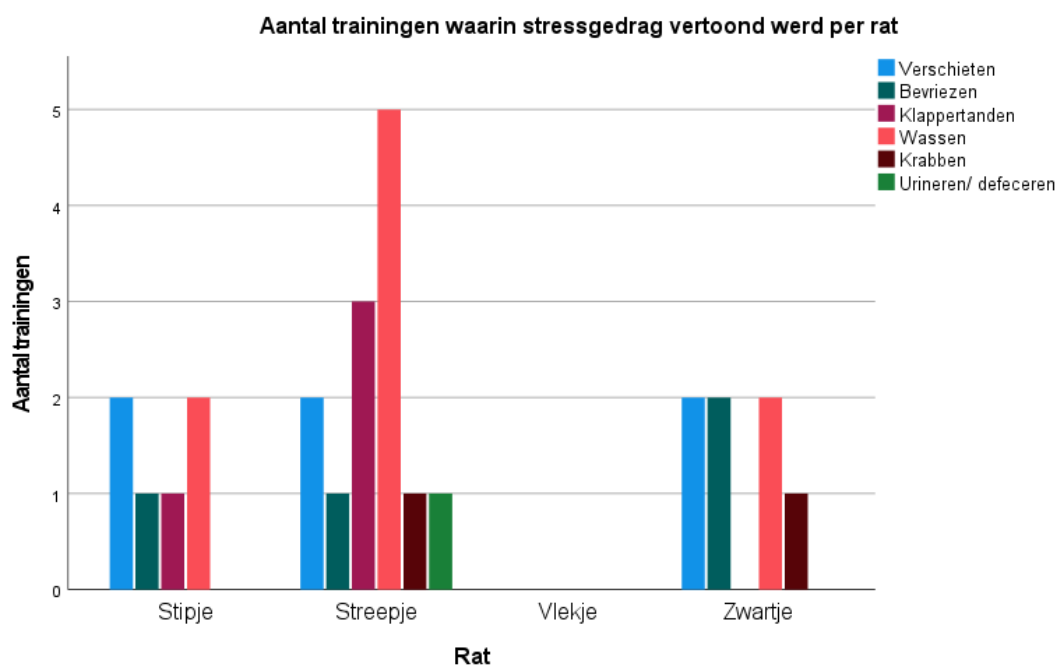
4.3.1 Fase 1

Fase 1 is een fase van tien trainingen. Er is een positief staal en een negatief staal opgesteld. Deze worden niet meteen van plaats veranderd als de rat het juist heeft. In Tabel 3 zien we de leertijd per rat. Zoals de keren hiervoor had Vlekje weer de minste tijd nodig.

Table 4: Aantal trainingssessies en totale trainingsduur per rat voor discriminatietraining fase 1.

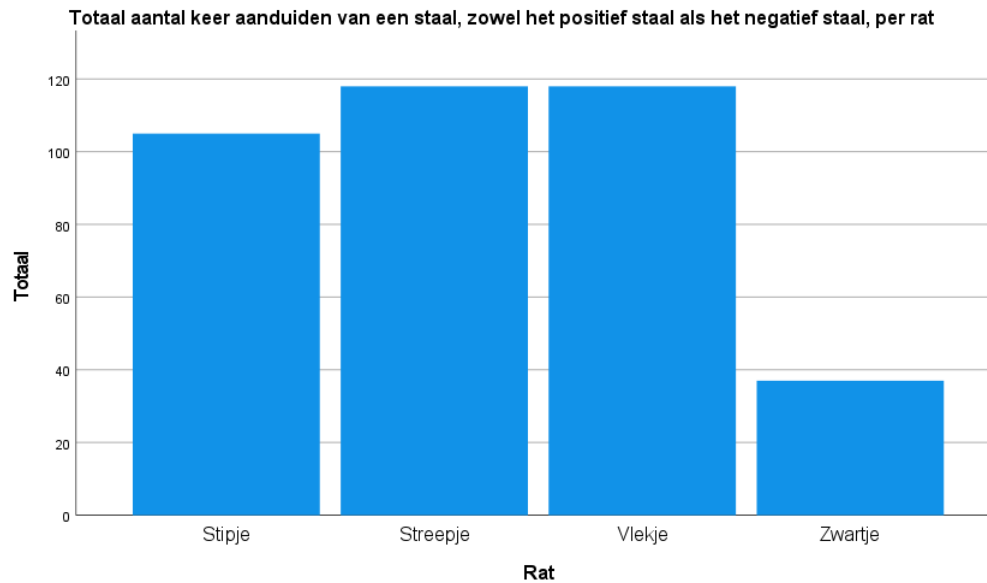
Rat:	Aantal trainingssessies:	Totaal:
Streepje	10	57 min en 38sec
Vlekje	10	21min en 17sec
Zwartje	10	50min en 13sec
Stipje	10	33min en 5sec

Ook tijdens fase 1 van de discriminatietraining werd genoteerd welke stressgedragingen werden vertoond tijdens de trainingen per rat. Deze worden hieronder weergegeven (Figuur 13). Erg opvallend is dat Vlekje geen enkel stressgedrag vertoonde in deze tien trainingssessies.



Figuur 13: Stressgedrag tijdens discriminatietraining fase 1.

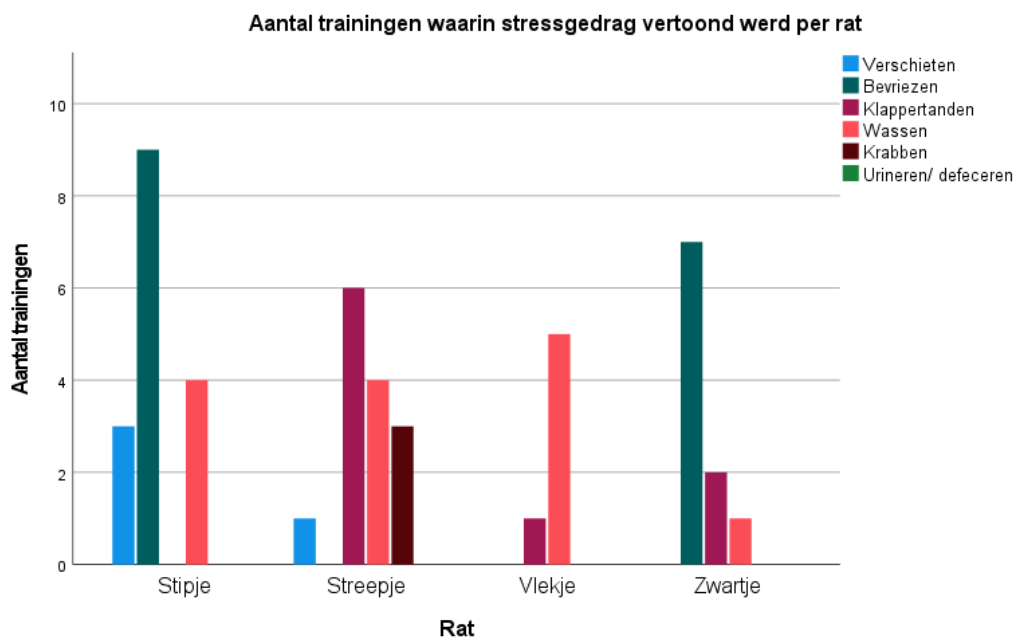
Per training werd geteld hoe vaak een rat een staal aanduidde. De stalen bleven lang op dezelfde plaats staan. In Figuur 14 zien we de resultaten. Streepje en Vlekje ondernamen evenveel pogingen terwijl Zwartje veel minder keer aan een staal rook.



Figuur 14: Resultaten discriminatietraining fase 1.

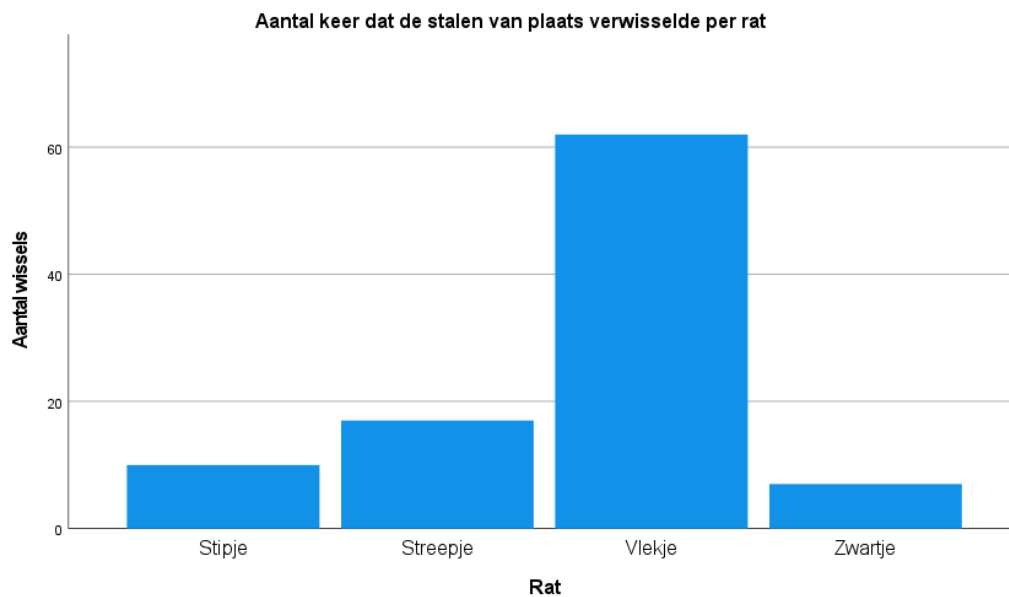
4.3.2 Fase 2

Fase 2 is een fase van 16 trainingssessies. Tijdens fase 2 werd er in de opstelling één tot twee (dezelfde) negatieve stalen geplaatst en één positief staal. De ratten mochten tot max. drie keer naar het positieve staal gaan om het aan te duiden terwijl het op dezelfde plek bleef. Na de derde keer wisselde het. In deze fase werd het verschil in tijd tussen de ratten steeds groter. De minste tijd voor het oplossen van een opstelling is voor Vlekje met maar twee minuten, terwijl Zwartje de langste tijd had met 24 minuten. De trainingsduur van een sessie zat tussen de 18 en 56 minuten. In Figuur 15 wordt het stressgedrag per rat weergegeven. Zwartje en Stipje waren de enige ratten die in bevroersmodus gingen en dit gedrag vaak vertoonden en lang aanhielden.



Figuur 15: Stressgedrag tijdens discriminatietraining fase 2.

Wanneer een rat erin slaagde het positieve staal drie keer aan te duiden wanneer het op dezelfde plek bleef, werd het staal van plaats verwisseld. Het aantal van deze wissels werd per rat bijgehouden en weergegeven in Figuur 16. Weer is duidelijk dat Vlekje veel beter scoorde dan zijn broers.

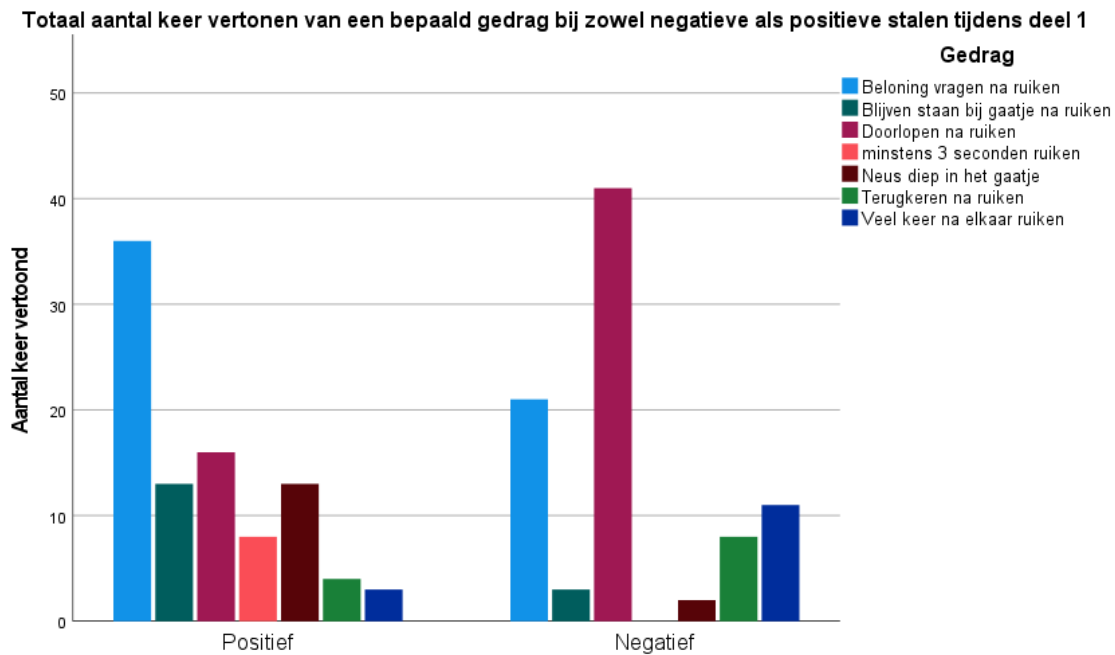


Figuur 16: Resultaten discriminatietraining fase 2.

4.3.3 Fase 3

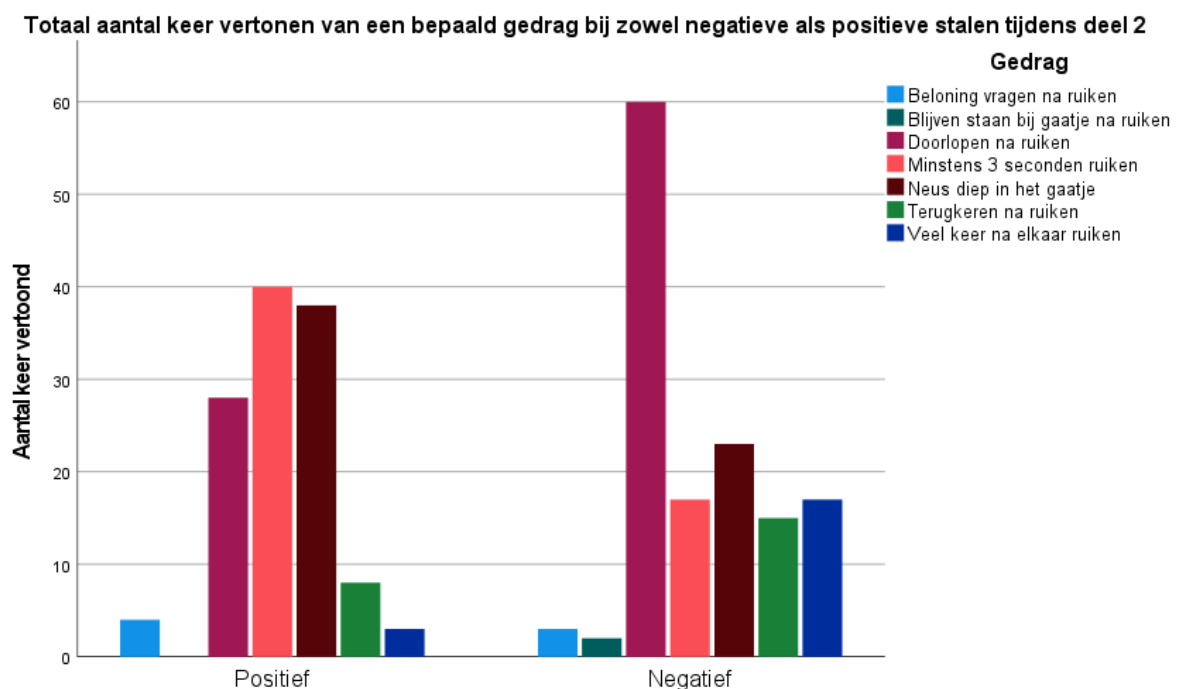
Tijdens fase 3 nam enkel Vlekje nog deel aan de trainingen. Deze fase telt 53 trainingssessies. Er werden in deze fase twee stalen per keer opgesteld en werden per trainingssessie acht verschillende stalen gebruikt (vier positieve en vier negatieve). Er waren dus vier verschillende combinaties per trainingssessie mogelijk. De rat mocht maar maximum twee keer hetzelfde positieve staal aanduiden. Daarna werden alle stalen verwisseld en van plaats veranderd. Trainingsduur per sessie varieerde tussen de vijf en 20 minuten. Soms waren er momenten dat Vlekje een opstelling kon oplossen in 11 seconden tijd.

Hieronder wordt fase 3 van de discriminatietraining nog eens in drie delen opgedeeld. Deel 1 (Figuur 17) omvat de eerste 17 trainingssessies. Deel 2 (Figuur 18) omvat de 18 middelste trainingssessies en deel 3 (Figuur 19) omvat de 18 laatste trainingssessies. Voor elk van deze delen worden de verschillende gedragingen en hoe vaak ze binnen dat deel werden vertoond, weergegeven.



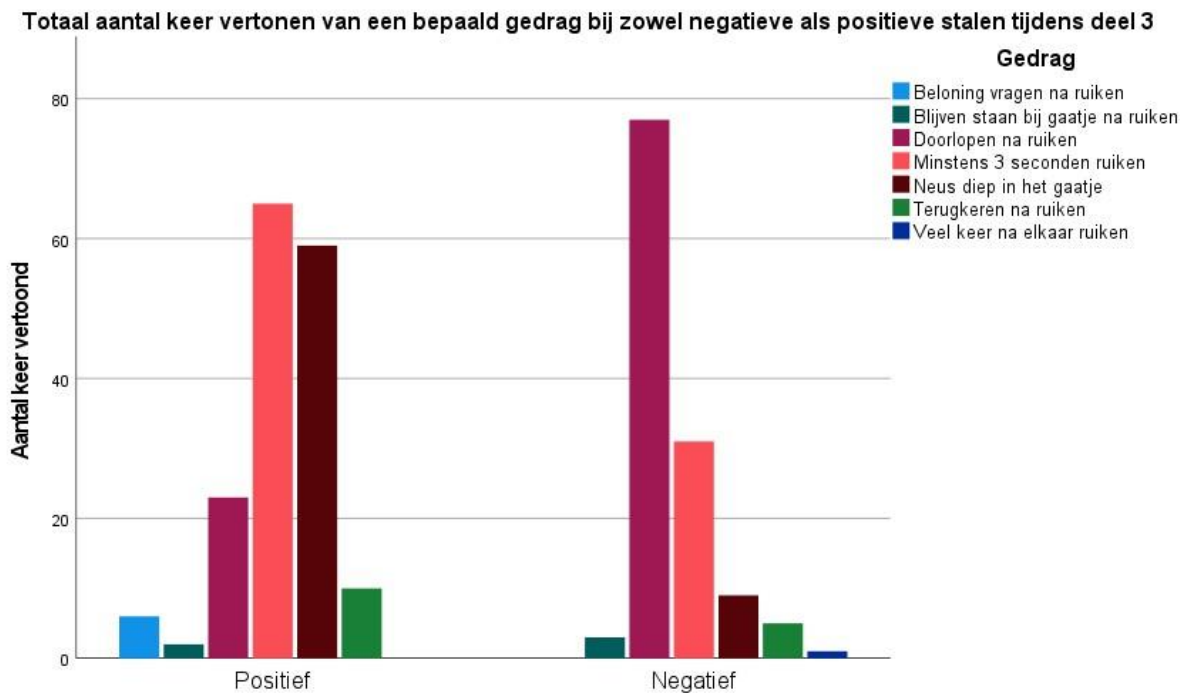
Figuur 17: Gedrag discriminatietraining fase 3 deel 2.

We zien in Figuur 17 dat Vlekje na het ruiken van een negatief staal vooral geneigd is om door te lopen, en na het ruiken van een positief staal in het hoekje komt staan om een beloning te vragen. We probeerden Vlekje te leren om minstens drie seconden aan het positief staal te ruiken.



Figuur 18: Gedrag discriminatietraining fase 3 deel 2.

We zien in Figuur 18 al een duidelijk verschil in gedrag na het ruiken aan het positief staal. Vlekje steekt zijn neus diep in het gaatje en ruikt vaak minstens drie seconden aan het staal. Het gedrag “doorlopen na ruiken aan een negatief staal” is ook toegenomen, wat positief is.



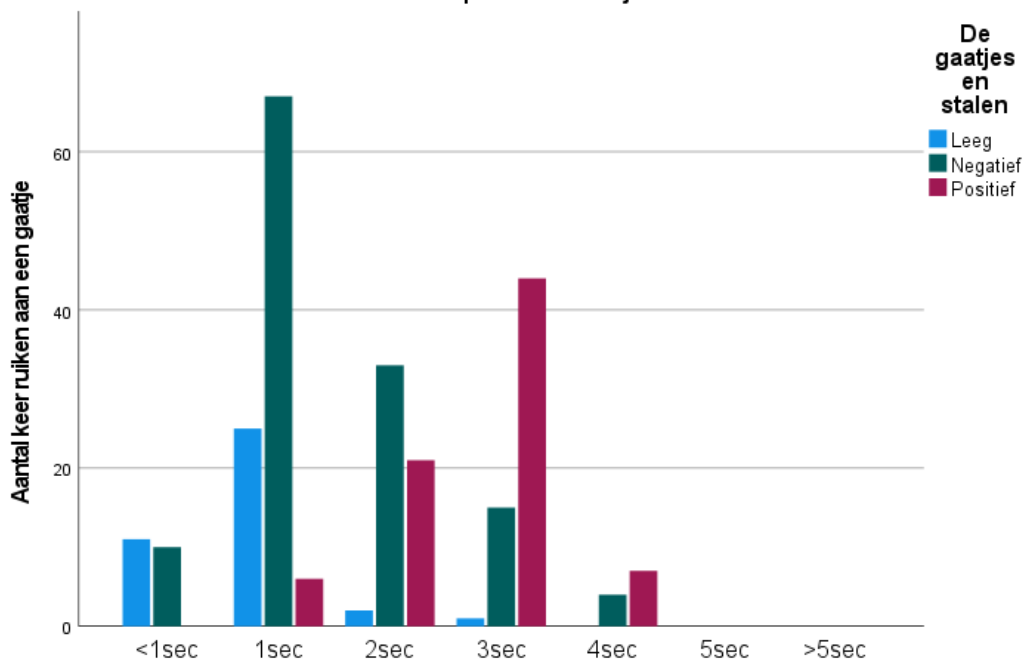
Figuur 19: Gedrag discriminatietraining fase 3 deel 3.

Ook in Figuur 19 zien we weer verbetering. De correcte gedragingen bij het positief staal (neus diep in het gaatje steken en minstens drie seconden ruiken) zijn toegenomen en ook het correcte gedrag bij het negatief staal (doorlopen na ruiken) is vermeerderd.

4.3.4 Fase 4

Tijdens fase 4 werd er dieper ingegaan op hoe lang Vlekje zijn neus in de verschillende gaatjes houdt inclusief de lege gaatjes. Voor elke tien trainingssessies werd een grafiek gemaakt. In totaal zijn er dus drie delen. Tijdens deel 1 (Figuur 20) werd Vlekje pas beloond na drie seconden te ruiken. Tijdens deel 2, 3 en 4 (Figuur 21, 22, en 23) werd hij beloond op vier seconden, en naarmate de training vorderde werd tot vijf seconden gewacht. Vanaf vier seconden ruiken wordt dus gesproken van “aanduiden van het staal”. Afhankelijk van bij welk gaatje dit gebeurt is het een vals positief of correct positief signaal.

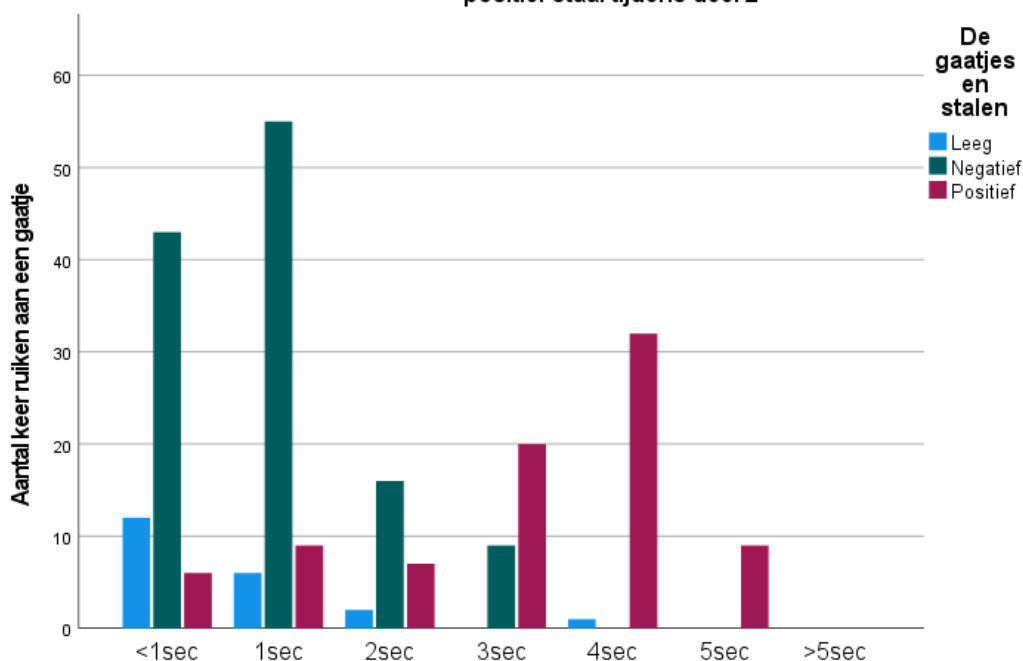
De tijd en het aantal keer dat de rat aan de gaatjes ruikt, zowel voor de lege gaatjes, het negatief staal als het positief staal tijdens deel 1



Figuur 20: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 1.

Vlekje laat zien in Figuur 20 dat hij vaak slechts één seconde aan een negatief staal en leeg gaatje ruikt, en vaak drie seconden aan een positief staal.

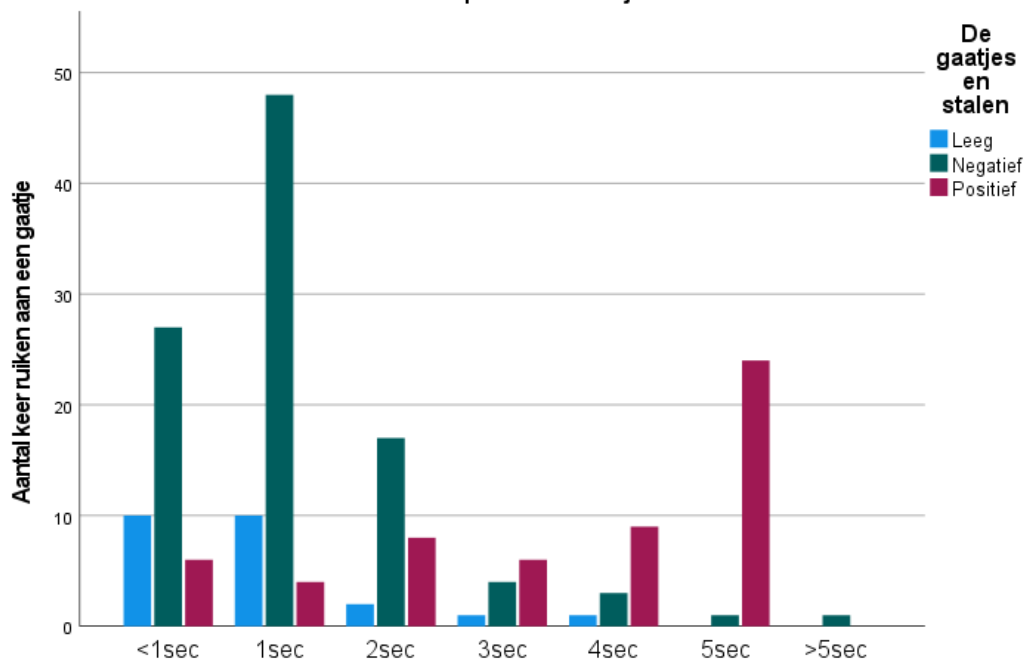
De tijd en het aantal keer dat de rat aan de gaatjes ruikt, zowel de lege gaatjes, de negatieve stalen, als het positief staal tijdens deel 2



Figuur 21: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 2.

We zien in Figuur 21 dat Vlekje leert om maar kort een negatief staal en leeg gaatje aan te duiden. Vaak doet hij dit maar één seconde en minder dan één seconde. Hij leert ook om steeds langer het positief staal aan te duiden.

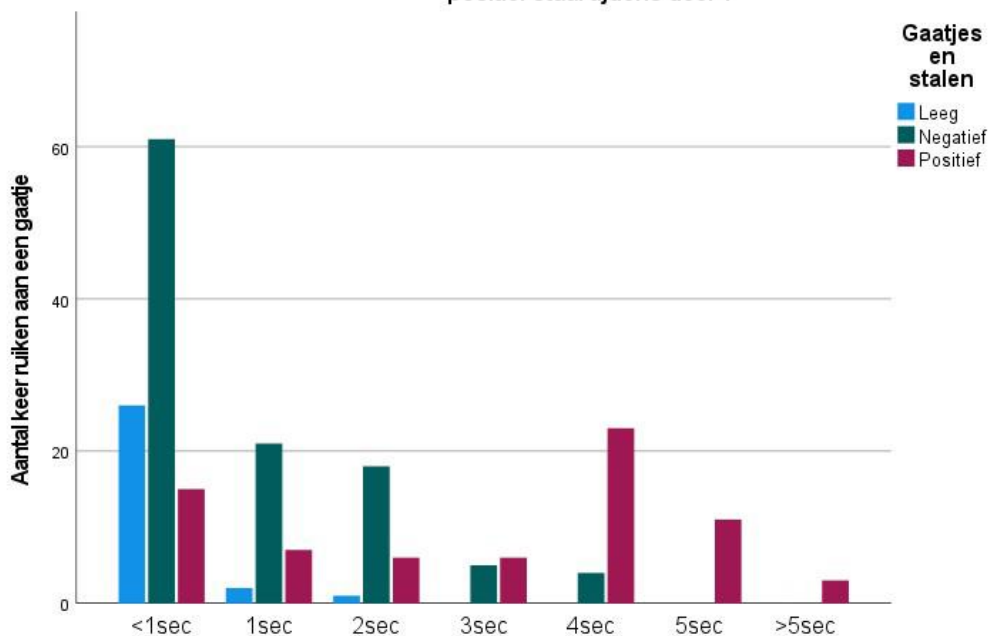
De tijd en het aantal keer dat de rat aan de gaatjes ruikt, zowel de lege gaatjes, de negatieve stalen als het positief staal tijdens deel 3



Figuur 22: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 3.

In Figuur 22 zien we dat Vlekje vaak in staat is om vijf seconden aan het positief staal te ruiken. Soms treden er vergissingen op.

De tijd en het aantal keer dat de rat aan de gaatjes ruikt, zowel de lege gaatjes, de negatieve stalen als het positief staal tijdens deel 4



Figuur 23: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 4.

In Figuur 23 zien we dat vlekje zijn pogingen om vijf seconden te ruiken weer zijn afgenomen en zijn vier seconden pogingen zijn toegenomen. Af en toe duidt hij een positief staal meer dan vijf seconden aan. Opvallend is dat hoe verder in de training, hoe vaker Vlekje minder dan één seconde aan het

positieve staal ruikt. De categorie “vijf seconden” bij het positieve staal zou hoger kunnen zijn. Aangezien er echter meestal al beloond werd op vier seconden, stopte het aanduiden ook dan. Soms werd het kliksignaal uitgesteld en dan bleek hij het vijf seconden, en soms zelfs langer, te kunnen volhouden. Wanneer duidelijk was dat Vlekje gefrustreerd of zenuwachtig was, werd niet tot vijf seconden gewacht.

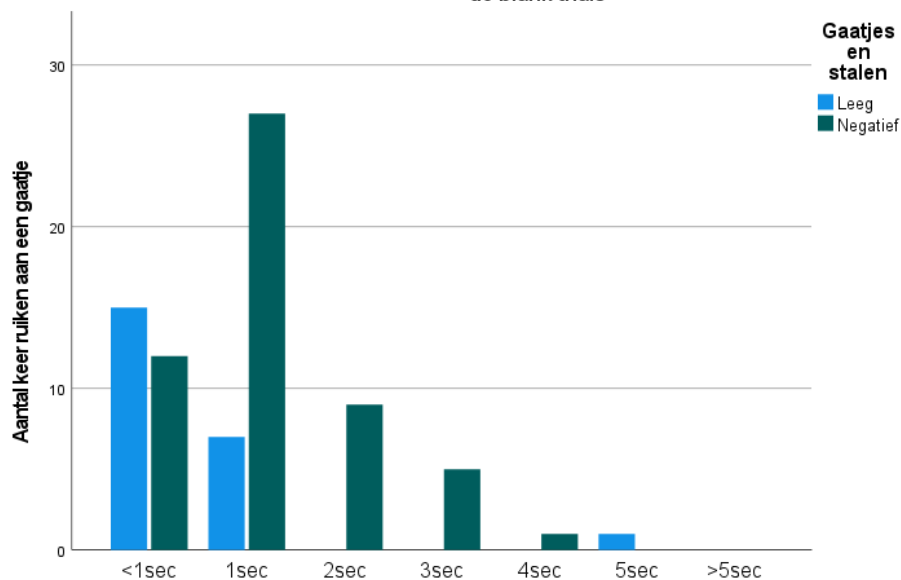
Vanaf deel 3 werden ook blank trials geïntroduceerd, en vanaf deel 4 kwamen er ook opstellingen voor met twee positieve stalen. Deze “speciale opstellingen” werden niet bijgerekend bij bovenvermelde resultaten, echter hebben ze wel invloed gehad op de resultaten bij de normale opstellingen.

4.4 Bijzondere opstellingen

4.4.1 Blank trials

Vanaf deel 3 van fase 4 van de discriminatietraining werd tijdens sommige trainingssessies een opstelling geïntroduceerd met enkel negatieve stalen. Dit zijn de blank trials. Tijdens de blank trials is het de bedoeling dat Vlekje aan alle gaatjes kort ruikt, en daarna naar het hoekje komt om aan te tonen dat de target er niet is. Wanneer Vlekje vier seconden of langer aan een gaatje ruikt, wordt dit gezien als vals positief signaal. Het is dus de bedoeling dat hij onder de vier seconden blijft als hij aan de gaatjes ruikt. In Figuur 24 zien we de resultaten.

De tijd en het aantal keer dat de rat aan de gaatjes ruikt, zowel de lege gaatjes als de negatieve stalen, tijdens de blank trials



Figuur 24: Resultaten blank trials.

De keer dat Vlekje vier seconden een negatief staal aanduidde en vijf seconden een leeg gaatje, waren dit de plaatsen waar de keer daarvoor een positief staal opgesteld stond. Wat verder opvalt is dat Vlekje vooral minder dan één seconde of één seconde aan de gaatjes rook, wat wil zeggen dat hij duidelijk geen positief staal vond. Wanneer hij geen positief staal vond ging hij ook niet random een gaatje vier seconden aanduiden (de twee uitzonderingen zijn mogelijk niet willekeurig).

4.5 Sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid

Voor de resultaten van de 20 laatste sessies werd voor Vlekje de TP (true positives), TN (true negatives), FP (false positives) en FN (false negatives) bepaald. Hiermee werd dan de sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid berekend. De 20 sessies werden in twee gedeeld om te zien of er consistentie is in de resultaten tussen de twee delen. We beginnen met de sensitiviteit en dus het vermogen van Vlekje om positieve stalen aan te duiden. Hierop scoorde Vlekje 84% en 83,3%. Voor de specificiteit scoorde hij 93,9% en 94,4%. De specificiteit is het vermogen van Vlekje om negatieve stalen of lege gaatjes als non-target te herkennen en dus niet aan te duiden. De nauwkeurigheid oftewel accuraatheid was 91,7% en 92,4%.

5 Discussie

5.1 Mogelijke oorzaken voor vals positieve en vals negatieve signalen

Vlekje behaalde een sensitiviteit van 84% en 83,3%, een specificiteit van 93,9% en 94,4%, en een nauwkeurigheid van 91,7% en 92,4%. Deze resultaten zijn gelijkaardig aan de resultaten van de ratten in een onderzoek naar het detecteren van *Mycobacterium tuberculosis*, waarbij er een sensitiviteit was van 83,33%, een specificiteit van 94,4% en een nauwkeurigheid van 94% was (Mgode et al., 2012). Bij detectiehonden die werden getraind om SARS-CoV-2 te detecteren werd een sensitiviteit behaald van 82,63% en een specificiteit van 96,35% (Jendry et al., 2020). Het verschilt per studie en onderzoeksdomein wat een acceptabele nauwkeurigheid is om in de praktijk te worden ingezet. Voor detectiedieren waarbij hun aanduiding het verschil tussen leven en dood kan betekenen zal deze veel hoger liggen dan voor andere doeleinden. Er wordt ook wel gezegd dat enkel 100% nauwkeurigheid volstaat. Dit is echter in de praktijk vaak niet haalbaar vanwege de vele randfactoren die het resultaat kunnen beïnvloeden (Lazarowski, Krichbaum, et al., 2020). Vlekje heeft dus best een goede prestatie neergezet. Wel moet hierbij vermeld worden dat Vlekje zijn vaardigheid tot discrimineren niet voldoende is om een goede diagnose methode te zijn. De vaardigheid van de tester en trainer om Vlekje zijn gedrag juist te interpreteren is minstens even belangrijk. We zagen bij de training van Vlekje dat hij zichzelf had aangeleerd om eerst overal erg kort aan te ruiken zodat hij de stalen kon vergelijken. Daarna ging hij de stalen waarover hij leek te twijfelen nog eens besnuffelen (waaronder het positieve staal in de meeste gevallen), en pas dan maakte hij zijn keuze. Wanneer er tijdens het testen meteen zou worden gedacht op het begin van de ronde dat hij een vals negatief signaal gaf, zou zijn sensitiviteit natuurlijk veel lager liggen. Dit is echter niet juist. Vlekje weet wel het verschil tussen de positieve en negatieve stalen, hij moet echter eerst de tijd en de kans krijgen om dat verschil te kunnen waarnemen door te vergelijken. Er werd dus een regel opgesteld dat Vlekje drie keer naar de gaatjes mocht gaan. Als hij na de derde keer rond te gaan nog altijd geen keuze had gemaakt werd die ronde als vals negatief beschouwd. Wanneer hij in de eerste ronde één seconde aan het positieve staal rook, maar in de tweede ronde vier en een halve seconde aan dat staal rook, was het een correct positief signaal (TP) en telde de eerste keer snuffelen niet mee. Soms sloeg hij een gaatje over, zeker wanneer er vlak voor de ronde een blank trial plaatsvond. Wanneer er in dat overgeslagen gaatje het positief staal stond, was hij sneller geneigd om een vals positief signaal te geven bij een ander staal. Wat wel opviel is dat hij dat vaak al klappertandend deed, een gedrag dat als offensief agressief gezien wordt in sociale situaties (Feltes & Boer, 2021). In een onderzoek naar agressie werd gezien dat bij het elektrisch stimuleren van de hypothalamus bij ratten er een toename was in stresshormonen waarna de ratten meer bewogen en begonnen te klappertanden (Van Der Poel et al., 1979; Van der Poel et al., 1982). Klappertanden kan dus naast een agnostisch gedrag, ook als stressgedrag gezien worden. Het kan er dus op wijzen dat Vlekje gefrustreerd of onzeker raakt als hij zijn target niet vindt, of dat hij onzeker is over zijn keuze. Bij een blank trial vlak na een normale opstelling klappertandde hij ook vaak wanneer hij de gaatjes besnuffeld had, waarschijnlijk door de afwezigheid van zijn target. In het geval van de blank trials was hij wel minder geneigd om dan een vals positief signaal te geven, en ging hij naar het hoekje om aan te tonen dat hij niks vond (wat voor de blank trial het correcte gedrag is).

Waarom maakte hij dan wel meer vals positieve aanduidingen bij een gewone opstelling waarbij hij het positieve staal per ongeluk oversloeg? Het kan zijn dat hij hier wel de MAP-geur rook, maar het niet goed kon lokaliseren omdat hij de plek waar de geur zich bevond nog niet besnuffeld had. Om te voorkomen dat Vlekje gaatjes overslaat is het beter om een lijnopstelling te gebruiken in plaats van

een rechthoekopstelling en om meer afstand te laten tussen de gaatjes zodat er minder overlapping is van de geuren. Deze lijnopstellingen worden ook gebruikt bij detectiehonden en bij de detectieratten van APOPO (Curry et al., 2021; Matthew et al., 2021; Weetjens et al., 2009). Andere keren dat Vlekje een vals positief signaal gaf was vooral wanneer hij een negatief staal aanduidde dat op de plaats stond waar de keer daarvoor een positief staal stond. Het is dus belangrijk om veel te wisselen zodat ratten leren dat ze niet op hun geheugen mogen afgaan. Het kan ook zijn dat deze fouten kwamen door contaminatie van die plek, wat nooit volledig kan worden uitgesloten ondanks hygiënische voorzorgsmaatregelen. Over het algemeen werd waargenomen dat Vlekje meer fouten maakte na een speciale opstelling (blank trial of dubbele positieve).

Wat nog een probleem kan zijn is de erg passieve manier van aanduiden wat het soms moeilijk maakt om zeker te zijn dat Vlekje effectief aanduidt, en niet gewoon wat langer ruikt. Een duidelijker aanwijzingsgedrag leren aan de rat dat niet in zijn “meest gebruikte gedragsrepertoire” staat, zou de boel minder dubbelzinnig kunnen maken. Een rat is echter geen hond. Ze zijn goed te trainen, maar leren om te gaan zitten of liggen wanneer ze hun target gevonden hebben is misschien wat veel gehoopt. Anderzijds zou het vervormen van het aanwijzingsgedrag tot een duidelijker gedrag mogelijk kunnen zijn. Het gedrag van Vlekje is namelijk ook doorheen de trainingen veranderd. Op het begin kwam hij een beloning vragen wanneer hij het positief staal vond, pas later werd hem geleerd om zijn neus lang genoeg in het gaatje te houden bij het positief staal. Deze tijd is ook steeds meer opgedreven. Als een rat kan leren om zijn aanwijzingsgedrag te veranderen van “beloning vragen” naar “minstens vier seconden de neus in het gaatje houden”, zou het dan ook niet lukken om van die 4 seconden over te gaan tot bijvoorbeeld op de achterpoten staan? Dit is iets wat ratten uit zichzelf regelmatig doen, maar niet regelmatig genoeg om tijdens een training te verwarren.

5.2 Tijdsduur

In totaal zijn er 265 dagen geweest waarop er met de ratten is gewerkt. Hieronder valt ook de socialisatiefase die drie maanden in beslag nam. In die drie maanden was er dan elke dag 15 minuten in de voormiddag en 15 minuten in de avond met de ratten bezig geweest. Deze 265 dagen volgden elkaar niet op. Er waren periodes van weken waarin er niet getraind werd vanwege revalidatie na ongeval van de trainer en tijdsgebrek. Ondanks de grote intervallen leken de ratten hier geen probleem mee te hebben en pikte hun training zo op waar ze gebleven waren. Moesten de dagen elkaar wel hebben opgevolgd zou het om een tijdsspanne van 8,7 maanden gaan. De socialisatie- en trainingsduur in deze studie is dus overeenkomstig met de bevindingen van andere onderzoeken waarbij een tijdsspanne van ongeveer 9 maand wordt beschreven (Ellis et al., 2017; Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011; Weetjens et al., 2009). De tijd per trainingssessie voor de vier ratten samen varieerde grofweg tussen een kwartier en een uur en was sterk afhankelijk van het stressgedrag met name de bevriesmodus. De angstigste ratten konden dit volhouden tot 20 minuten, en als er dus een dag was waarop ze alle vier veel stress hadden, duurden de trainingssessies ook erg lang. Om trainingsduur in te korten is het dus verstandig om ratten te nemen die minder stressgevoelig zijn of hun stress uiten op een andere manier dan te bevriezen. Anderzijds waren er ook erg korte trainingssessies. Vlekje had vaak met twee minuten al voldoende opstellingen opgelost omdat hij een opstelling soms na 11 seconden al klaar had. Dit kan komen door zijn erg actief karakter, hogere weerstand tegen stress en hoge motivatie, eigenschappen die dus erg voordelig zijn. Naast de trainingsduur is er ook nog de tijd die nodig was om stalen uit de diepvriezer te halen, te ontdooien, juist te nummeren, de opstelling te maken, de ratten in hun vervoersbakje te laten komen (ze lieten soms erg op zich wachten), de ratten in en uit het trainingshokje te halen, de opstellingen te veranderen en stalen tussendoor te wisselen, te belonen, de filmpjes te herbekijken en analyseren, notities te maken, de handen en het trainingsplatform te ontsmetten en de stalen weer in de juiste

zakjes met de juiste nummer in de diepvriezer te steken. Daarnaast is er ook nog de verzorging van de ratten die tijd in beslag nam zoals het voeren, het water verversen, om de drie dagen de hangmatten wassen, eens per week het volledige hok uit te kuisen en voeder te kopen. Er mag dus niet alleen met de trainingstijd rekening worden gehouden wanneer een kost- en batenanalyse wordt opgesteld van speurratten als biomedische detectiemethode.

5.3 Effect van individuele factoren op resultaten

Wat tijdens het trainen van de ratten opviel, is dat er een groot verschil was tussen de vier ratten, ondanks dat het allemaal broers zijn, dezelfde leeftijd hebben, en dezelfde huisvesting en voeder delen. Het was al vanaf het begin duidelijk dat Vlekje het minste stressgedrag vertoonde, de beste resultaten haalde en er het minste tijd voor nodig had. Hij leerde niet alleen sneller dan de anderen, maar toonde ook de meeste motivatie. Stipje had het op het begin, tijdens de clickertraining erg moeilijk, hoewel hij tijdens de volgende trainingen toch vorderingen maakte. Vanaf de fixatietraining was duidelijk dat Zwartje moeite had met het ondervinden wat de bedoeling was. Hij kreeg veel stress, mogelijks door het gebrek aan controle op de situatie juist omdat hij het niet begreep, en dus geen verandering in de situatie kon brengen. Zijn prestaties zijn er verder nooit meer echt op vooruit gegaan. Streepje klappertandde heel vaak, en ook wassen - wat een overspronggedrag kan zijn dat voortkomt uit stress (Spruijt et al., 1992) - was iets dat hij regelmatig deed. Ondanks dat boekte hij vordering en haalde redelijke resultaten. Het verschil tussen Vlekje, die alles erg snel door had, en de andere ratten, waarbij de prestaties na een tijd wat stagneerde, groeide steeds meer. Hierdoor werd besloten om enkel met Vlekje verder te gaan. Het blijft dus de vraag of de andere drie ratten het op een gegeven moment even goed zouden hebben gedaan als Vlekje. Misschien hadden ze hem zelfs voorbij kunnen steken. Een andere vraag is echter of de tijd en intensiviteit van de trainingen deze gok waard zijn. Zeker in professionele setting, waarbij economische kosten en baten tegen elkaar moeten worden opgewogen, lijkt het verstandiger om in vroege selectie al met de beste ratten verder te gaan. Op voorhand dieren testen en selecteren op karaktereigenschappen zoals stressbestendigheid en motivatie, wordt ook aangeraden bij detectiehonden (Lazarowski, Waggoner, et al., 2020).

Wat maakte dat er zo een verschil is in de prestaties van Vlekje en de rest? Daar zijn verschillende hypothesen voor. Vlekje is bijvoorbeeld laagst in rang. Mogelijks heeft hij het moeilijker om aan eten te komen, waardoor hij extra gemotiveerd is om zijn beloning te bemachtigen. Honger en verzadigdheid hebben namelijk invloed op de motivatie. De waarde van voeder als beloning daalt naarmate een dier meer verzadigd is (Lazarowski, Waggoner, et al., 2020). Anderzijds zorgt onderdanigheid en een lage positie in de rangorde vaak voor meer stress- en angstgedrag zoals al eerder gezien is bij muizen (Horii et al., 2017). Dit zou juist nadelig zijn voor de training. Vlekje was ook de actiefste rat die het meest rond liep in zijn verblijf, het meest op ontdekking ging, het vaakst wakker werd gezien en ook tijdens de trainingen in de trainingskooi erg snel en veel bewoog. Daarnaast was Vlekje ook de minst angstigste rat. Hij vertoonde het minste stressgedrag, verschoot het minste en bevroor minder vaak en minder lang dan de andere ratten. Activiteit en stressgevoeligheid zijn eigenschappen die invloed kunnen hebben op de prestaties, maar ook gelinkt zijn aan elkaar. Locomotorische activiteit tijdens stress is namelijk een voorspellende factor voor type stressgedrag en gevoeligheid voor angst en chronische stress. Er zijn tijdens een onderzoek twee rattenlijnen gekweekt die geselecteerd zijn op die locomotorische activiteit tijdens stress. Ratten die geselecteerd waren op hoge activiteit tijdens stress (high responder ratten) bewogen zich over een grotere oppervlakte, waren snel hyperactief en impulsief, waren erg onderzoekend en goed weerbaar tegen chronische stress. Ratten uit de lijn die geselecteerd was op een lage activiteit tijdens stress (low responder ratten) bewogen zich over een kleine oppervlakte, toonden veel vermijdingsgedrag, waren sneller geneigd om te bevriezen, vertoonden remming in het uiten van gedrag en waren vatbaarder voor chronische stress

(Clinton et al., 2022). Het actieve gedrag van Vlekje kan dus ook een actief stresscopingmechanisme zijn terwijl de andere ratten eerder een passief stresscopingmechanisme hebben. Stress belemmert het leervermogen (Jin et al., 2013; Xu et al., 2017), en stressgedrag verstoort de training. Het spreekt dus voor zich dat ratten die beter om kunnen gaan met stress, beter geschikt zijn. Gezien de consequenties van passieve stresscoping op gedrag en stressgevoeligheid, zou er getest kunnen worden of ratten geselecteerd op een actievere manier van met stress om te gaan, zoals de high responder ratten, ook betere detectieprestaties leveren. We zien ook tijdens de fixatietraining en discriminatietraining waarbij het staal lang op één plek bleef staan en elke poging (neus in een gaatje steken) genoteerd werd, dat Vlekje altijd de meeste pogingen ondernam. Het nemen van veel pogingen, ook al zijn die fout, is mogelijks het gevolg van motivatie om beloond te worden en nieuwsgierigheid voor de omgeving. Eigenschappen dus die belangrijk zijn voor een detectierat. Vervolgens kan individuele intelligentie natuurlijk ook een rol spelen. Misschien heeft Vlekje gewoon een beter leervermogen dan de rest.

5.4 Effect van omgevingsfactoren op resultaten

Naast individuele factoren hebben ook omgevingsfactoren invloed op de training van de ratten. De grootste storende factor waren geluiden. Alles verliep in een huishoudelijke setting. De training van de ratten ging bijvoorbeeld door in een kamertje waar ook een wasmachine en droogkast stond. Het lukte haast niet om te trainen wanneer deze aanstonden. De ratten waren dan te bang. Er werd dus gepland om ze te trainen wanneer ze niet draaiden. Ook andere apparatuur werkte storend. De verwarmingsketel die aanschoot bijvoorbeeld. Daarnaast hield de huishoudelijke setting ook in dat er meerdere personen in het huis leefden, en niet iedereen evenveel rekening hield (of het vergat) met de stressgevoeligheid van de ratjes. Luid praten of telefoneren, dichtklappende deuren, luide voetstappen (zeker als er hakken werden gedragen), aanbellen aan de voordeur, muziek die gespeeld werd, geanimeerde discussies, klusjes in huis met het nodige hamergeklop, onaangekondigd binnenkomen in de trainingskamer tijdens het trainen om iets te vragen, etc. Allemaal geluiden die eigen zijn aan een gezinsleven, en allemaal geluiden die de training in de weg stonden. Naast broers, een zus, ouders, vrienden, burens en familie, waren ook de dierlijke familieleden en huisgenoten een probleem voor de ratten. Hondengeblaf in het bijzonder maakte trainen moeilijk, maar ook de fretten die hun verblijf buiten, net naast de trainingskamer hebben, maakten soms veel lawaai tijdens het spelen (dingen verschuiven en omgooien bijvoorbeeld). Ook de trainer zelf maakte soms storend geluid, zoals niezen of hoesten, waardoor de ratten volledig de kluts kwijtwaren. Om het volledige potentieel uit de ratten en de trainingen te halen, is het dus nodig om dit te kunnen doen in een meer geïsoleerde setting. Zonder al deze storende factoren zal de training veel sneller en vlotter verlopen.

Ook andere geuren hadden waarschijnlijk invloed op de training. Aangezien de training doorging in een kamertje waar ook was in een wasmachine werd gestoken, rook het soms naar wasproduct. Deze doordringende geur zou storend kunnen zijn voor de ratten. Ook het ontsmetten van het trainingsplatform tussen trainingssessies door kan invloed hebben door de sterke alcoholgeur. Ook kruiscontaminatie en dus de overdracht van andere geuren op de stalen, of van de MAP-bacteriën op ander oppervlak, kan niet met 100% worden uitgesloten. De stalen werden uit voorzorg wel altijd gehanteerd met vinyl wegwerphandschoenen en er was een apart paar handschoenen voor negatieve en positieve stalen. Dit om te voorkomen dat wanneer de handschoenen gecontamineerd geraakten met MAP, deze contaminatie van de handschoenen verder werd doorgegeven naar de negatieve stalen, een probleem waar veel onderzoekers voor waarschuwen (Lazarowski, Krichbaum, et al., 2020; Papet, 2016). Tussen het wisselen van handschoenen werden dan ook de handen nogmaals ontsmet. De geur van vinyl en van alcohol kunnen dus wel mogelijks aan de stalen hangen en storend zijn voor de ratten. Het tijdstip waarop de ratten voor het laatst hadden gegeten had ook invloed. De ratten

presteerde beter wanneer ze niet onbeperkt konden eten. Voor het welzijn van de ratten werd er wel voor gezorgd dat ze instaat waren om een voorraadje aan te leggen. Zo konden ze heel de nacht eten en tegen dat de training begon was hun eten op en waren ze eens zo gemotiveerd om een beloning te krijgen. De bieststalen zelf hadden ook invloed op de trainingen. De ratten leken over het algemeen meer aangetrokken tot biest met een dikkere consistentie. Mogelijks is deze meer geconcentreerd en ruikt het straffer. Dit was wel nadelig wanneer het een negatief staal was met deze consistentie. Er werd dan langer aan dit staal geroken dan aan andere negatieve stalen waardoor het een verwarrend beeld gaf. Daarnaast werd gedacht dat het hergebruiken van stalen invloed zou kunnen hebben op de detecteerbaarheid van de bacteriën. Er werd echter niet echt een verschil opgemerkt.

5.5 Suggesties voor beter trainingsprotocol

Om te beginnen zou het interessant zijn om lijnen te kweken met eigenschappen die een positieve invloed kunnen hebben op de detectieprestaties. Stressgevoeligheid en angstigheid zijn erfelijke eigenschappen (Goddard & Beilharz, 1984). Hierdoor is het mogelijk om ratten te selecteren op lagere stressgevoeligheid en een actiever stresscopingsmechanisme zoals de high responder ratten (Clinton et al., 2022). Daarnaast zou ook kunnen worden geselecteerd op basis van cognitie. Ook intelligentie is erfelijk (Deary, 2000; Galsworthy et al., 2005; Plomin, 2001). Verder kweken met de ratten die het snelst door hebben wat de bedoeling is, en zo verder selecteren, is misschien een manier om lijnen te krijgen waarbij de trainingsduur kan worden ingekort. Naast het opstellen van geschikte rattenlijnen of het gebruiken van reeds bestaande rattenlijnen die aan de eisen voldoen, kan ook het selecteren van rittens (jonge ratjes) die later als trainingsdieren worden gebruikt mogelijks de trainingsduur verkorten. Er kan dan geselecteerd worden op basis van reukvermogen, sociabiliteit, nieuwsgierigheid, activiteit, exploratie gedrag en motivatie om voeder te verkrijgen. Ook kan op jonge leeftijd worden geprobeerd om de cognitie van de jonge ratten te testen. Testen op cognitieve vaardigheden bleek bij honden veelbelovend te zijn tijdens het selectieproces van detectiehonden (MacLean & Hare, 2018).

Bij de huisvesting van de ratten moet er rekening mee gehouden worden dat ratten sociale dieren zijn en nood hebben aan sociale interactie. Dit komt niet alleen het welzijn ten goede, maar ook de prestaties. Onderzoek toont aan bij muizen dat sociale isolatie een negatieve invloed heeft op de cognitie en sneller zorgt voor agressief gedrag (An et al., 2017). Ook is het belangrijk om aan kooiverrijking te doen door objecten te introduceren die natuurlijk gedrag uitlokken zoals tunnels om door te kruipen, knaagmateriaal om aan te knagen, huisjes, dozen en hangmatten om in te verstoppert en ladders of touwen om op te klimmen. Kooiverrijking verhoogt het welzijn en bevordert bovendien ook het geheugen en het leervermogen, wat ook de training ten goede komt (Hutchinson et al., 2005; Nithianantharajah & Hannan, 2006). De ratten in onze studie werden aangeschaft op een leeftijd van 12 weken. Bij de fokkers zijn ze haast niet gehanteerd geweest. Om de socialisatie optimaal te laten verlopen, en zo de stresstolerantie bij de ratten te verhogen, is het verstandiger om de ratten veel sneller aan menselijk contact te laten wennen. In een onderzoek werd uitgezocht of positief contact met mensen ervoor kon zorgen dat ratten een vriendelijker en rustiger gedrag vertoonden naar mensen die handelingen met hen uitvoerden zoals standaard procedures in een laboratorium. De ratten werden in de vierde en vijfde levensweek elke dag tien minuten op een rustige manier aangeraakt en met de hand gevoederd terwijl er tegen hen gesproken werd. Dit bleek voordelige lange termijn effecten te hebben op het gedrag van de ratten tegenover mensen en het verminderde angst voor menselijk contact (Maurer et al., 2008). Ook de Afrikaanse buidelratten van APOPO worden al vanaf 4 weken drie keer per dag gehanteerd en met de hand gevoederd en werden blootgesteld aan verschillende geuren, geluiden en vreemde objecten. Ook werden ze vroeg gewoon gemaakt om een harnas te dragen, aan een lijn te volgen en in een vervoersmand te kruipen (Poling et al., 2010). De ratten die voor onze studie werden ingezet waren heel bang bij aankomst, en dat is erg lang zo

gebleven. Om ze niet nog banger te maken is de socialisatie heel rustig opgebouwd, misschien zelfs te rustig. Het kan beter zijn om de ratten veel frequenter vast te nemen en te aaien, zodat ze hier sneller aan habitueren. Belangrijk is wel dat alles op een rustige en vriendelijke manier verloopt. Herhaaldelijke blootstelling hoeft namelijk niet altijd te resulteren in het gewoon worden van de prikkel. Het kan ook zorgen voor sensitivatie van de prikkel waardoor angst alleen gevoeld wordt. Zorg dus dat het een leuke ervaring blijft. Hoewel de trainer van de ratten ervaring heeft met het socialiseren en trainen – echter niet voor detectiewerk – van veel verschillende diersoorten (hond, kat, paard, fret, varken) was er geen ervaring in het trainen van ratten. Dit heeft natuurlijk ook invloed gehad op de socialisatie en training. Er werd advies gegeven door een ex-medewerker van APOPO, en er werd op voorhand goed ingelezen over het gedrag van ratten. Toch was het zoeken en aftasten hoe je best met deze gevoelige diertjes omgaat. Het spreekt dus voor zich dat de training en socialisatie vlotter zou zijn verlopen bij iemand met meer ervaring met ratten. Voor dat er tijdens de fixatietraining met bieststalen zou worden gewerkt, werd er aangeraden om met een totaal niet gerelateerde geur te werken, en de ratten te leren daar op te fixeren. Zo kunnen de ratten al leren wat de bedoeling is en hoe de fixatie juist in zijn werk gaat voor er met de stalen moet worden gewerkt. In deze studie werd dit niet toegepast omdat de trainingskooi was afgesteld op de buisjes waar de biest in zat, en er geen lege buisjes voor handen waren om met een andere vloeistof te vullen. Daarnaast zou het ook veel beter zijn moest er vanaf het begin al een tweede persoon in de kamer zijn zodat de ratten dit gewoon worden. Deze persoon zou dan de notities kunnen maken wat alles veel efficiënter zou kunnen doen laten verlopen. Multitasken tussen op tijd klikken met de clicker, belonen, filmen en noteren was niet altijd even praktisch, zeker niet bij erg snelle en gemotiveerde ratten zoals Vlekje.

Wat nog een verbetering zou zijn in de aanpak van de training, is om tijdens de fixatietraining al veel vaker de stalen te wisselen en van plaats te veranderen om het generalisatievermogen van de ratten te verhogen. Nu bleef het positief staal erg lang op dezelfde plek, waardoor de rat gewoon kon onthouden waar het staal was. Dit werd gedaan omdat de rat uit de trainingskooi moest worden gehaald om de stalen te wisselen, en dit erg veel stress aan de rat gaf. Wanneer er nu op teruggekeken wordt was het misschien juist beter om de handeling veel te doen zodat de rat er gewoon aan kon worden en sneller leerde om actief naar het staal te zoeken en het aan te duiden. Hetzelfde geldt voor de discriminatie training. Pas redelijk laat in de training werden de stalen na 1x aanduiden verwisseld. Dit zou veel vroeger in de training moeten gebeuren om zeker te zijn dat de rat de individuele stalen niet onthouden heeft. Nog een oplossing hiervoor is natuurlijk om een trainingskooi te fabriceren zoals het APOPO model, die het toelaat de stalen te wisselen zonder dat de rat er telkens uit moet worden gehaald. Een ander verbeterpunt is de frequentie van trainen. Het totaal aantal trainingssessies is in verhouding met de tijdsspanne waarin het onderzoek werd uitgevoerd niet zo veel. Dit kwam door tijdsgebrek en herstel na ongeval, maar ook door het inplannen van de training in de huishoudelijke setting. Het was moeilijk om rekening te houden met al de omgevingsfactoren. Zo werd er getracht te trainen wanneer er geen andere personen in huis waren, en wanneer er geen storende apparatuur draaide. Er werd geprobeerd elke dag één trainingssessie per rat te doen. In de praktijk echter waren er periodes waarin er niet getraind werd. Moest er consequent elke dag twee tot drie keer kort getraind kunnen worden zou dat hoogstwaarschijnlijk de vordering erg versnellen en de prestaties doen toenemen. Nog een aandachtspunt is het volgende; nooit alle stalen gebruiken tijdens de training. Dit is een fout die hier helaas gemaakt werd waardoor er op het einde geen “onbekende” stalen meer overschoten om te testen of Vlekje echt uitgaat op de geur van de MAP bacteriën, of alle individuele stalen gewoon onthouden heeft van tijdens de trainingen. Het is dus onduidelijk of Vlekje effectief MAP bacteriën opspoort. Daarnaast moet ook meer ontsmet worden. Nu werd alles ontsmet na elke trainingssessie, terwijl best ook tussen elke nieuwe opstelling ontsmet wordt om kruiscontaminatie nog beter te voorkomen.

5.6 Bedenkingen bij inzetbaarheid in de praktijk

Ondanks Vlekje zijn goede prestaties waren er toch soms fouten. Deze fouten zijn aan het begin van de discussie reeds overlopen, echter zijn er ook “fouten” die volgens Vlekje misschien helemaal niet fout zijn. Er waren soms rondes waarbij Vlekje aan alle negatieve stalen maximum één seconde rook, en 3 seconden aan het positieve staal. Dit werd gerekend als vals negatief, omdat de maatstaaf minimum 4 seconden was voor een positieve aanduiding, maar in Vlekje zijn beleving is dat waarschijnlijk helemaal niet zo. Hij duidt het immers een stuk langer aan dan de andere gaatjes. Het is dus erg belangrijk dat de rat weet hoe lang hij het staal moet aanduiden. Om dit probleem te verhelpen is een alternatief aanduidings-gedrag aanleren de duidelijkste oplossing, maar ook de moeilijkste die nog veel meer training vraagt. De beste oplossing is waarschijnlijk gewoon meer trainen op het opdrijven van de tijd dat de rat zijn neus in het gaatje moet houden en hier consequent in zijn. Meer training echter vraagt meer tijd, en tijd is een ander groot probleem wanneer het gaat over tamme ratten. De gebruikte soort – *Rattus norvegicus* - wordt immers maar twee tot drie jaar oud terwijl de soort die APOPO gebruikt, namelijk de Afrikaanse buidelrat (*Cricetomys gambianus*) zes tot acht jaar oud kan worden (Poling, Weetjens, Cox, Beyene, Bach, et al., 2011; Poling et al., 2010). Deze soort staat echter niet op positieve lijst van zoogdieren die in België mogen worden gehouden ("KBS 16 juli 2009 Bijlage 1 (positief lijst)"). De duur en intensiviteit van het trainen van de ratten moet worden afgewogen tegen de tijd dat de rat in de praktijk zijn werk doet, en de voordelen die daar uit voortkomen. Het is ook mogelijk dat de rat zijn prestaties achteruit gaan naarmate hij ouder wordt aangezien reukzin mindert naarmate leeftijd vordert (Rawson, 2006). Een ander probleem voor het inzetten van ratten in de praktijk is hun gevoeligheid voor stress. Het beste is om alles in een voor de rat herkenbare en veilige, geïsoleerde omgeving te laten verlopen, zonder teveel input en prikkels van buitenaf. Een rat aan een tuigje meenemen naar een geitenbedrijf om er even de positieve geiten uit te halen, is waarschijnlijk onrealistisch. De ratten in deze studie waren dan ook heel angstig bij aankomst, en de manier van socialiseren had beter gekund. Ratten selecteren uit niet zo'n angstige lijnen, vroeg beginnen aan socialisatie en intensief socialiseren, zou nog kunnen zorgen voor verrassingen.

Een volgend probleem is het probleem rond de stalen. Het is uitzonderlijk moeilijk om aan goede stalen te geraken voor de training. De stalen moeten getest worden op de aanwezigheid van MAP bacteriën, en niet gewoon op DNA, iets wat dieren waarschijnlijk niet kunnen ruiken (Courts et al., 2019). Dit is erg kostelijk en tijds- en arbeidsintensief, waardoor het laten testen van de stalen erg duur is. Er zijn ook veel verschillende stalen van verschillende geiten nodig om te kunnen trainen. Hoe meer verschillende positieve en negatieve stalen, hoe kleiner de kans is dat de rat individuele stalen onthoudt in plaats van de geur van MAP te generaliseren. Het is echter bij het nemen van de stalen op voorhand niet duidelijk welke geiten positief of negatief zijn. De kans bestaat dat de stalen allemaal negatief zijn, waardoor de training niet kan worden verdergezet, iets dat in deze studie is voorgevallen. Geiten maken ook enkel biest aan tijdens het lammerenseizoen wanneer ze net lammetjes hebben. Het is dus niet zo dat je elke maand van het jaar een biest-staalname bij geiten kan doen. Wanneer er dan toch aan stalen is geraakt, is het ook niet duidelijk in hoeverre de bacteriën na herhaaldelijk ontdooien en invriezen van de stalen, nog detecteerbaar blijven voor de ratten. Het kan ook zijn dat na herhaaldelijk manipuleren van de stalen, kruiscontaminatie heeft plaatsgevonden. Hierdoor raakt de rat tijdens de training in de war. Het kan zijn dat hij de geur detecteert op een negatief staal en die aanduidt maar niet wordt beloond. Dit kan de motivatie doen dalen en prestaties doen afnemen. Het kan dus nodig zijn om nieuwe, nog niet frequent gemanipuleerde stalen te introduceren, maar dit niet lukt omdat er geen beschikbaar zijn of het budget op is. Communicatie tussen verschillende onderzoeksinstellingen is nodig. Zo kan worden gecommuniceerd wanneer er dieren positief zijn getest op MAP. Dan kunnen andere onderzoekers hier ook gebruik van maken en stalen gaan afnemen.

Wanneer een onderzoek voor een grote verzameling aan positieve en negatief geteste stalen heeft gezorgd, zouden deze stalen ook na het onderzoek moeten kunnen worden bewaard voor een volgend onderzoek zodat er als het ware een “biestbank voor MAP onderzoek” kan worden aangelegd. Zo kan er vlot worden verder getraind zonder de vrees om maanden zonder stalen te zitten. Maanden wachten op een positieve test is namelijk vreselijk lang gezien de duur van een rattenleventje. Enerzijds maakt dit alles het trainen van ratten als paratuberculose detectiedier erg omslachtig. Anderzijds is dit net een reden om het potentieel van ratten als detectiedier verder te onderzoeken en gebruiken. De nood aan goedkope, snelle, toch betrouwbare diagnosemethoden is namelijk hoog.

Besluit

Vanwege de mooie nauwkeurigheidsscore van 91,7% en 92,4% die Vlekje haalde, kan dus besloten worden dat tamme ratten kunnen worden getraind om positieve bieststalen besmet met de MAP-bacterie van negatieve bieststalen te onderscheiden en aan te duiden. Slechts 25% van de subjecten kon de discriminatietraining afronden. Wanneer met alle storingsfactoren en werkpunten die in de studie zijn overlopen rekening wordt gehouden, is het goed mogelijk dat veel meer ratten dit kunnen leren en dat de sensitiviteit, specificiteit en nauwkeurigheid nog kan worden opgedreven. De conclusie is dus dat detectieratten als diagnosemethode voor een vroege screening van mogelijks met MAP besmette bieststalen, veel potentieel tonen als goedkope, betrouwbare, efficiënte en effectieve oplossing voor het paratuberculose probleem in melkgeitenbedrijven.

Lijst van tabellen en figuren

Lijst van tabellen

Table 1: Aantal trainingssessies en de totale tijdsduur per rat voor de clickertraining.....	37
Table 2: Het aantal trainingssessies en de totale trainingsduur per rat voor fixatietraining fase 1.....	38
Table 3: Aantal trainingssessies en totale trainingsduur per rat voor fixatietraining fase 2.	40
Table 4: Aantal trainingssessies en totale trainingsduur per rat voor discriminatietraining fase 1.	42

Lijst van figuren

Figuur 1: 3 van de 4 ratten.	25
Figuur 2: De trainingskooi, clicker, zonnebloempitten en ontsmettingsmiddel.....	27
Figuur 3: Het deurtje kan open om de ratten in de trainingskooi te zetten.....	27
Figuur 4: De doos die onder de plexiplaat staat en waar de stalen worden opgesteld. De "Bank" is gelijkaardig, maar met gaatjes voor alle stalen met nummer.	28
Figuur 5: Onduidelijke foto van Vlekje. Hier duidt hij een positief staal aan door zijn neus in het gaatje te steken.....	33
Figuur 6: Resultaten van de clickertraining.....	37
Figuur 7: Stressgedrag tijdens de clickertraining.	38
Figuur 8: Stressgedrag tijdens fixatietraining fase 1.	39
Figuur 9: Resultaten 1 fixatietraining fase 1.	39
Figuur 10: Resultaten 2 fixatietraining fase 1.	40
Figuur 11: Stressgedrag tijdens fixatietraining fase 2.	41
Figuur 12: Resultaten fixatietraining fase 2	41
Figuur 13: Stressgedrag tijdens discriminatietraining fase 1.	42
Figuur 14: Resultaten discriminatietraining fase 1.	43
Figuur 15: Stressgedrag tijdens discriminatietraining fase 2.	43
Figuur 16: Resultaten discriminatietraining fase 2.	44
Figuur 17: Gedrag discriminatietraining fase 3 deel 2.	45
Figuur 18: Gedrag discriminatietraining fase 3 deel 2.	45
Figuur 19: Gedrag discriminatietraining fase 3 deel 3.	46
Figuur 20: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 1.....	47
Figuur 21: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 2.....	47
Figuur 22: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 3.....	48
Figuur 23: Resultaten discriminatietraining fase 4 deel 4.....	48
Figuur 24: Resultaten blank trials.....	49

Bronnenlijst

- Alexander, M. B., Hodges, T. K., Wescott, D. J., & Aitkenhead-Peterson, J. A. (2016). The effects of soil texture on the ability of human remains detection dogs to detect buried human remains. *Journal of forensic sciences, 61*(3), 649-655.
- Amann, A., de Lacy Costello, B., Miekisch, W., Schubert, J., Buszewski, B., Pleil, J., . . . Risby, T. (2014). The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *Journal of breath research, 8*(3), 034001.
- Amundsen, T., Sundstrøm, S., Buvik, T., Gederaas, O. A., & Haaverstad, R. (2014). Can dogs smell lung cancer? First study using exhaled breath and urine screening in unselected patients with suspected lung cancer. *Acta oncologica, 53*(3), 307-315.
- An, D., Chen, W., Yu, D. Q., Wang, S. W., Yu, W. Z., Xu, H., . . . Wu, J. C. (2017). Effects of social isolation, re-socialization and age on cognitive and aggressive behaviors of Kunming mice and BALB/c mice. *Animal Science Journal, 88*(5), 798-806.
- Anderson, J. L., Meece, J. K., Koziczkowski, J. J., Clark Jr, D. L., Radcliff, R. P., Nolden, C. A., . . . Ellingson, J. L. E. (2007). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in scavenging mammals in Wisconsin. *Journal of Wildlife Diseases, 43*(2), 302-308.
- Ayele, W. Y., Bartos, M., Svastova, P., & Pavlik, I. (2004). Distribution of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in organs of naturally infected bull-calves and breeding bulls. *Veterinary Microbiology, 103*(3-4), 209-217.
- Bach, H., & McLean, I. (2003). Remote Explosive Scent Training: Genuine or a Paper Tiger? *Journal of Conventional Weapons Destruction, 7*(1), 24.
- Barkema, H. W., Hesselink, J. W., McKenna, S. L. B., Benedictus, G., & Groenendaal, H. (2010). Global prevalence and economics of infection with Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in ruminants. *Paratuberculosis: organism, disease, control, 10*, 21.
- Barkema, H. W., Orsel, K., Nielsen, S. S., Koets, A. P., Rutten, V. P. M. G., Bannantine, J. P., . . . Whittington, R. J. (2018). Knowledge gaps that hamper prevention and control of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis infection. *Transboundary and Emerging Diseases, 65*, 125-148.
- Bastida, F., & Juste, R. A. (2011). Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of immune based therapies and vaccines, 9*(1), 1-17.
- Beard, P. M., Daniels, M. J., Henderson, D., Pirie, A., Rudge, K., Buxton, D., . . . McKendrick, I. (2001). Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland. *Journal of clinical microbiology, 39*(4), 1517-1521.
- Benedictus, G., Verhoeff, J., Schukken, Y. H., & Hesselink, J. W. (2000). Dutch paratuberculosis programme history, principles and development. *Veterinary Microbiology, 77*(3-4), 399-413.
- Bijland, L. R., Bomers, M. K., & Smulders, Y. M. (2013). Smelling the diagnosis a review on the use of scent in diagnosing. *Neth. J. Med, 71*(2013), 300-307.
- Birks, J., Messenger, J., Braithwaite, T., Davison, A., Brookes, R., & Strachan, C. (2005). Are scat surveys a reliable method for assessing distribution and population status of pine martens? In *Martens and fishers (Martes) in human-altered environments* (pp. 235-252). Springer.
- Bjartell, A. S. (2011). Dogs sniffing urine: a future diagnostic tool or a way to identify new prostate cancer markers? In: Citeseer.
- Blackman D.E. . (1983). Operant conditioning. In I. N. J. F. B. (eds.) (Ed.), (pp. 38–61.). Psychology survey 4. British Psychological Society, Leicester:.
- Blackman, D. E. (1983). Operant conditioning. In I. N. J. F. B. (eds.) (Ed.), (pp. 38–61.). Psychology survey 4. British Psychological Society, Leicester:.

- Boedeker, E., Friedel, G., & Walles, T. (2012). Sniffer dogs as part of a bimodal bionic research approach to develop a lung cancer screening. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 14(5), 511-515.
- Boelaert, F., Walravens, K., Biront, P., Vermeersch, J. P., Berkvens, D., & Godfroid, J. (2000). Prevalence of paratuberculosis (Johne's disease) in the Belgian cattle population. *Veterinary microbiology*, 77(3-4), 269-281.
- Bomers, M. K., van Agtmael, M. A., Luik, H., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Smulders, Y. M. (2014). A detection dog to identify patients with *Clostridium difficile* infection during a hospital outbreak. *Journal of Infection*, 69(5), 456-461.
- Bouton, M. E., & Ricker, S. T. (1994). Renewal of extinguished responding in a second context. *Animal Learning & Behavior*, 22(3), 317-324.
- Browne, C., Stafford, K., & Fordham, R. (2006). The use of scent-detection dogs. *Irish Veterinary Journal*, 59(2), 97.
- Bryce, E., Zurberg, T., Zurberg, M., Shajari, S., & Roscoe, D. (2017). Identifying environmental reservoirs of *Clostridium difficile* with a scent detection dog: preliminary evaluation. *Journal of Hospital Infection*, 97(2), 140-145.
- Buszewski, B., Ligor, T., Jezierski, T., Wenda-Piesik, A., Walczak, M., & Rudnicka, J. (2012). Identification of volatile lung cancer markers by gas chromatography–mass spectrometry: comparison with discrimination by canines. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404(1), 141-146.
- Böcker, F. (2016). Sign Survey, Camera Trapping, Scent Detection Dog–Evaluation of different methods to investigate wolf presence. *Masterarbeit. Fakultät für Umwelt und Natürliche Ressourcen, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg im Breisgau*.
- Campbell, L. F., Farmery, L., George, S. M. C., & Farrant, P. B. J. (2013). Canine olfactory detection of malignant melanoma. *Case Reports*, 2013, bcr2013008566.
- Chacon, O., Bermudez, L. E., & Barletta, R. G. (2004). Johne's disease, inflammatory bowel disease, and *Mycobacterium paratuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 329-363.
- Chiodini, R. J. (1989). Crohn's disease and the mycobacterioses: a review and comparison of two disease entities. *Clinical microbiology reviews*, 2(1), 90-117.
- Chiodini, R. J. (1996). Immunology: resistance to paratuberculosis. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12(2), 313-343.
- Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J., & Merkal, R. S. (1984). Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): The current status and future prospects. *Cornell Veterinarian*, 74(3), 218-262.
- Clare, J. D. J., Anderson, E. M., Macfarland, D. M., & Sloss, B. L. (2015). Comparing the costs and detectability of bobcat using scat-detecting dog and remote camera surveys in central Wisconsin. *Wildlife Society Bulletin*, 39(1), 210-217.
- Clark Jr, D. L., Koziczkowski, J. J., Radcliff, R. P., Carlson, R. A., & Ellingson, J. L. E. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: comparing fecal culture versus serum enzyme-linked immunosorbent assay and direct fecal polymerase chain reaction. *Journal of dairy science*, 91(7), 2620-2627.
- Clarke, C. J. (1997). The pathology and pathogenesis of paratuberculosis in ruminants and other species. *Journal of comparative pathology*, 116(3), 217-261.
- Clinton, S. M., Shupe, E. A., Glover, M. E., Unroe, K. A., McCoy, C. R., Cohen, J. L., & Kerman, I. A. (2022). Modeling heritability of temperamental differences, stress reactivity, and risk for anxiety and depression: Relevance to research domain criteria (RDoC). *European Journal of Neuroscience*, 55(9-10), 2076-2107.
- Collins, M. T., Wells, S. J., Petrini, K. R., Collins, J. E., Schultz, R. D., & Whitlock, R. H. (2005). Evaluation of five antibody detection tests for diagnosis of bovine paratuberculosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 12(6), 685-692.

- Concha, A., Mills, D. S., Feugier, A., Zulch, H., Guest, C., Harris, R., & Pike, T. W. (2014). Using sniffing behavior to differentiate true negative from false negative responses in trained scent-detection dogs. *Chemical senses*, 39(9), 749-754.
- Cooper, R., Wang, C., & Singh, N. (2014). Accuracy of trained canines for detecting bed bugs (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of economic entomology*, 107(6), 2171-2181.
- Cornu, J.-N., Cancel-Tassin, G., Ondet, V., Girardet, C., & Cussenot, O. (2011). Olfactory detection of prostate cancer by dogs sniffing urine: a step forward in early diagnosis. *European urology*, 59(2), 197-201.
- Corpa, J. M., Perez, V., & Marin, J. F. G. (2000). Differences in the immune responses in lambs and kids vaccinated against paratuberculosis, according to the age of vaccination. *Veterinary Microbiology*, 77(3-4), 475-485.
- Courts, C., Euteneuer, J., & Gosch, A. (2019). There is no evidence that dogs can smell DNA – Comment on “Individual human scent as a forensic identifier using mantrailing”. *Forensic Sci Int*, 297, e14-e15. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.02.013>
- Craven, B. A., Neuberger, T., Paterson, E. G., Webb, A. G., Josephson, E. M., Morrison, E. E., & Settles, G. S. (2007). Reconstruction and morphometric analysis of the nasal airway of the dog (*Canis familiaris*) and implications regarding olfactory airflow. *The Anatomical Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology*, 290(11), 1325-1340.
- Cristescu, R. H., Foley, E., Markula, A., Jackson, G., Jones, D., & Frere, C. (2015). Accuracy and efficiency of detection dogs: a powerful new tool for koala conservation and management. *Scientific Reports*, 5(1), 1-6.
- Curry, E., Skogen, M., & Roth, T. (2021). Evaluation of an odour detection dog for non-invasive pregnancy diagnosis in polar bears (*Ursus maritimus*): Considerations for training sniffer dogs for biomedical investigations in wildlife species. *Journal of Zoo and Aquarium Research*, 9(1), 1-7.
- de Souza, M. d. C. C., Lima, M. C., Braga, I. d. F. E., Schwarz, D. G. G., de Souza Rodrigues, A. P., Sales, E. B., . . . Moreira, M. A. S. (2016). Molecular typing of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis (MAP) isolated from dairy goats in Brazil. *Small Ruminant Research*, 140, 18-21.
- Deary, I. (2000). *Looking down on human intelligence: From psychometrics to the brain* (Vol. 36). OUP Oxford.
- Dhand, N. K., Eppleston, J., Whittington, R. J., & Windsor, P. A. (2016). Changes in prevalence of ovine paratuberculosis following vaccination with Gudair®: results of a longitudinal study conducted over a decade. *Vaccine*, 34(42), 5107-5113.
- Djonne, B. (2010). Paratuberculosis in goats. In (Vol. Wallingford., pp. 169–178). In: M.A.Behr and D.M.: Collins (eds) Paratuberculosis: organism, disease, control. CABI,
- Dubeuf, J.-P. (2010). Characteristics and diversity of the dairy goat production systems and industry around the world. Structural, market and organisational conditions for their development. *Tecnol Ciên Agropec*, 4(4), 25-31.
- Duggan, J. M., Heske, E. J., Schooley, R. L., Hurt, A., & Whitelaw, A. (2011). Comparing detection dog and livetrapping surveys for a cryptic rodent. *The Journal of Wildlife Management*, 75(5), 1209-1217.
- Ehmann, R., Boedeker, E., Friedrich, U., Sagert, J., Dippon, J., Friedel, G., & Walles, T. (2012). Canine scent detection in the diagnosis of lung cancer: revisiting a puzzling phenomenon. *European respiratory journal*, 39(3), 669-676.
- Eisenberg, S. W. F., Koets, A. P., Hoeboer, J., Bouman, M., Heederik, D., & Nielen, M. (2010). Presence of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in environmental samples collected on commercial Dutch dairy farms. *Applied and environmental microbiology*, 76(18), 6310-6312.

- Eisenberg, S. W. F., Nielen, M., Hoeboer, J., Rutten, V., Heederik, D., & Koets, A. P. (2012). Environmental contamination with Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis within and around a dairy barn under experimental conditions. *J Dairy Sci*, *95*(11), 6477-6482. <https://doi.org/10.3168/jds.2012-5548>
- Elliker, K. R., Sommerville, B. A., Broom, D. M., Neal, D. E., Armstrong, S., & Williams, H. C. (2014). Key considerations for the experimental training and evaluation of cancer odour detection dogs: lessons learnt from a double-blind, controlled trial of prostate cancer detection. *BMC urology*, *14*(1), 1-9.
- Ellis, H., Mulder, C., Valverde, E., Poling, A., & Edwards, T. (2017). Reproducibility of African giant pouched rats detecting Mycobacterium tuberculosis. *BMC infectious diseases*, *17*(1), 1-6.
- Feagan, B. G., Vreeland, M. G., Larson, L. R., & Bala, M. V. (2000). Annual cost of care for Crohn's disease: a payor perspective. *The American journal of gastroenterology*, *95*(8), 1955-1960.
- Feltes, P. K., & Boer, S. F. d. (2021). Mapping and Imaging the Aggressive Brain in Animals and Humans. In *PET and SPECT in Psychiatry* (pp. 887-926). Springer.
- Fält, L., Gustavsson, T., Frank, J., Åberg, J., & Norin, A. (2015). Tracking Dogs. Scents and skills. In: SWDI Publishing, Lindesberg.
- Gadbois, S., & Reeve, C. (2014). Canine olfaction: scent, sign, and situation. In *Domestic dog cognition and behavior* (pp. 3-29). Springer.
- Gadbois, S., & Reeve, C. (2016). The semiotic canine: scent processing dogs as research assistants in biomedical and environmental research. *Dog behavior*, *2*(3), 26-32.
- Galsworthy, M. J., Paya-Cano, J. L., Liu, L., Monleón, S., Gregoryan, G., Fernandes, C., . . . Plomin, R. (2005). Assessing reliability, heritability and general cognitive ability in a battery of cognitive tasks for laboratory mice. *Behavior genetics*, *35*(5), 675-692.
- Ganusov, V. V., Klinkenberg, D., Bakker, D., & Koets, A. P. (2015). Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of Mycobacterium avium spp. paratuberculosis in cattle. *Veterinary research*, *46*(1), 1-13.
- Gao, A., Odumeru, J., Raymond, M., & Mutharia, L. (2005). Development of improved method for isolation of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis from bulk tank milk: effect of age of milk, centrifugation, and decontamination. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *69*(2), 81.
- Garcia, A. B., & Shalloo, L. (2015). Invited review: The economic impact and control of paratuberculosis in cattle. *Journal of dairy science*, *98*(8), 5019-5039.
- Gazit, I., Goldblatt, A., & Terkel, J. (2005). The role of context specificity in learning: the effects of training context on explosives detection in dogs. *Animal Cognition*, *8*(3), 143-150.
- GD. (2004). In. ParaTBCwijzer.
- Geller, T. (2008). *The loved dog*. Simon and Schuster.
- Geneva International Centre for Humanitarian Demining. (2007). In *A guide to mine action and explosive remnants of war*.
- Gibson, T. B., Ng, E., Ozminkowski, R. J., Wang, S., Burton, W. N., Goetzl, R. Z., & Maclean, R. (2008). The direct and indirect cost burden of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Journal of occupational and environmental medicine*, *50*(11), 1261-1272.
- Goddard, M. E., & Beilharz, R. G. (1984). A factor analysis of fearfulness in potential guide dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, *12*(3), 253-265.
- Grabowska-Polanowska, B., Miarka, P., Skowron, M., Sułowicz, J., Wojtyna, K., Moskal, K., & Śliwka, I. (2017). Development of sampling method and chromatographic analysis of volatile organic compounds emitted from human skin. *Bioanalysis*, *9*(19), 1465-1475.
- Grandjean, D., Sarkis, R., Lecoq-Julien, C., Benard, A., Roger, V., Levesque, E., . . . Gully, E. (2020). Can the detection dog alert on COVID-19 positive persons by sniffing axillary sweat samples? A proof-of-concept study. *PLoS One*, *15*(12), e0243122.

- Grimm-Seyfarth, A., Zarzycka, A., Nitz, T., Heynig, L., Weissheimer, N., Lampa, S., & Klenke, R. (2019). Performance of detection dogs and visual searches for scat detection and discrimination amongst related species with identical diets. *Nature Conservation*, *37*, 81.
- Grimm-Seyfarth, A., Harms, W., & Berger, A. (2021). Detection dogs in nature conservation: A database on their world-wide deployment with a review on breeds used and their performance compared to other methods. *Methods in Ecology and Evolution*, *12*(4), 568-579.
- Gsell, A., Innes, J., de Monchy, P., & Brunton, D. (2010). The success of using trained dogs to locate sparse rodents in pest-free sanctuaries. *Wildlife Research*, *37*(1), 39-46.
- Guest, C., Pinder, M., Doggett, M., Squires, C., Affara, M., Kandeh, B., . . . Logan, J. G. (2019). Trained dogs identify people with malaria parasites by their odour. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(6), 578-580.
- Hackner, K., Errhalt, P., Mueller, M. R., Speiser, M., Marzluf, B. A., Schulheim, A., . . . Doll, T. (2016). Canine scent detection for the diagnosis of lung cancer in a screening-like situation. *Journal of breath research*, *10*(4), 046003.
- Hardin, D. S., Anderson, W., & Cattet, J. (2015). Dogs can be successfully trained to alert to hypoglycemia samples from patients with type 1 diabetes. *Diabetes Therapy*, *6*(4), 509-517.
- Harris, N. B., & Barletta, R. G. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in veterinary medicine. *Clinical microbiology reviews*, *14*(3), 489-512.
- Harrison, R. L. (2006). From the field: A comparison of survey methods for detecting bobcats. *Wildlife Society Bulletin*, *34*(2), 548-552.
- Hart, B. L. Behavioural defences in animals against pathogens and.
- Hart, B. L. (2012). Behavioural defences in animals against pathogens and parasites: parallels with the pillars of medicine in humans. *Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci*.
- Hart, B. L., Hart, L. A., Thigpen, A. P., Tran, A., & Bain, M. J. (2018). The paradox of canine conspecific coprophagy. *Veterinary medicine and science*, *4*(2), 106-114.
- Hatlauf, J., Böcker, F., Wirk, L., Collet, S., Schley, L., Szabó, L., . . . Heltai, M. (2021). Jackal in hide: detection dogs show first success in the quest for golden jackal (*Canis aureus*) scats. *Mammal Research*, *66*(1), 227-236.
- Hemsworth, P. H., Barnett, J. L., & Coleman, G. J. (2009). The integration of human-animal relations into animal welfare monitoring schemes. *Animal Welfare*, *18*(4), 335-345.
- Hermon-Taylor, J., & Bull, T. (2002). Crohn's disease caused by Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis: a public health tragedy whose resolution is long overdue. In (Vol. 51, pp. 3-6). *J Med Microbiol*.
- Hiby, E. F., Rooney, N. J., & Bradshaw, J. W. S. (2004). Dog training methods: their use, effectiveness and interaction with behaviour and welfare. *ANIMAL WELFARE-POTTERS BAR THEN WHEATHAMPSTEAD-*, *13*(1), 63-70.
- Hilliard, S. (2003). Principles of animal learning. *Mine Detection Dogs: Training, Operations and Odour*, 23-42.
- Hoffman, E. (2014). Canine scent detection of an invasive wood-boring insect, the Brown Spruce Longhorn Beetle, *Tetropium fuscum*, in laboratory conditions.
- Honap, S., Johnston, E., Agrawal, G., Al-Hakim, B., Hermon-Taylor, J., & Sanderson, J. (2021). Anti-Mycobacterium paratuberculosis (MAP) therapy for Crohn's disease: An overview and update. *Frontline Gastroenterology*, *12*(5), 397-403.
- Horii, Y., Nagasawa, T., Sakakibara, H., Takahashi, A., Tanave, A., Matsumoto, Y., . . . Shimoi, K. (2017). Hierarchy in the home cage affects behaviour and gene expression in group-housed C57BL/6 male mice. *Scientific reports*, *7*(1), 1-12.
- Horowitz, A. (2009). Inside of a Dog: What Dogs See. *Smell and Know*.
- Hoyer-Tomiczek, U., Sauseng, G., & Hoch, G. (2016). Scent detection dogs for the Asian longhorn beetle, *Anoplophora glabripennis*. *EPPO Bulletin*, *46*(1), 148-155.

- Huntley, J. F. J., Whitlock, R. H., Bannantine, J. P., & Stabel, J. R. (2005). Comparison of diagnostic detection methods for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in North American bison. *Veterinary Pathology*, *42*(1), 42-51.
- Hurt, A., Davenport, B., & Greene, E. (2000). Training dogs to distinguish between black bear (*Ursus americanus*) and grizzly bear (*Ursus arctos*) feces. University of Montana Undergraduate Biology Journal. *Montana, USA*.
- Hutchinson, E., Avery, A., & VandeWoude, S. (2005). Environmental enrichment for laboratory rodents. *ILAR journal*, *46*(2), 148-161.
- Jamieson, L. T. J., Baxter, G. S., & Murray, P. J. (2018). You are not my handler! Impact of changing handlers on dogs' behaviours and detection performance. *Animals*, *8*(10), 176.
- Jendryn, P., Schulz, C., Twele, F., Meller, S., von Köckritz-Blickwede, M., Osterhaus, A. D. M. E., . . . Welte, T. (2020). Scent dog identification of samples from COVID-19 patients—a pilot study. *BMC infectious diseases*, *20*(1), 1-7.
- Jezierski, T., Adamkiewicz, E., Walczak, M., Sobczyńska, M., Górecka-Bruzda, A., Ensminger, J., & Papet, E. (2014). Efficacy of drug detection by fully-trained police dogs varies by breed, training level, type of drug and search environment. *Forensic Science International*, *237*, 112-118.
- Jezierski, T., Walczak, M., Ligor, T., Rudnicka, J., & Buszewski, B. (2015). Study of the art: canine olfaction used for cancer detection on the basis of breath odour. Perspectives and limitations. *Journal of breath research*, *9*(2), 027001.
- Jin, F., Li, L., Shi, M., Li, Z., Zhou, J., & Chen, L. (2013). The longitudinal study of rat hippocampus influenced by stress: Early adverse experience enhances hippocampal vulnerability and working memory deficit in adult rats. *Behavioural brain research*, *246*, 116-124.
- Johnen, D., Heuwieser, W., & Fischer-Tenhagen, C. (2015). How to train a dog to detect cows in heat—training and success. *Applied animal behaviour science*, *171*, 39-46.
- Johnston, J. M. (1999). Canine detection capabilities: Operational implications of recent R & D findings. *Institute for Biological Detection Systems, Auburn University*, *1*(7), 1-7.
- Kalis, C. H. J., Collins, M. T., Barkema, H. W., & Hesselink, J. W. (2004). Certification of herds as free of *Mycobacterium paratuberculosis* infection: actual pooled faecal results versus certification model predictions. *Preventive veterinary medicine*, *65*(3-4), 189-204.
- KBS 16 juli 2009 Bijlage 1 (positief lijst). In *KBS 16 juli 2009 tot vaststelling van de lijst van niet voor productiedoeleinden gehouden zoogdieren die gehouden mogen worden. Bijlage 1. 01-03-2019*.
- Kennedy, D. (2011). International efforts at paratuberculosis control. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, *27*(3), 647-654.
- Kennedy, D. J., & Allworth, M. B. (2000). Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. *Veterinary microbiology*, *77*(3-4), 443-451.
- Kennedy, D. J., & Benedictus, G. (2001). Control of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* infection in agricultural species. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties*, *20*(1), 151-179.
- Kerley, L. L., & Salkina, G. P. (2007). Using scent-matching dogs to identify individual Amur tigers from scats. *The Journal of Wildlife Management*, *71*(4), 1349-1356.
- Khol, J. L., Pinedo, P. J., Buergelt, C. D., Neumann, L. M., Baumgartner, W., & Rae, D. O. (2012). The collection of lymphatic fluid from the bovine udder and its use for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the cow. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, *24*(1), 23-31.
- Kitiyakara, T., Redmond, S., Unwanatham, N., Rattanasiri, S., Thakkinstian, A., Tangtawee, P., . . . Kositchaiwat, C. (2017). The detection of hepatocellular carcinoma (HCC) from patients' breath using canine scent detection: a proof-of-concept study. *Journal of breath research*, *11*(4), 046002.

- Koenig, G. J., Hoffsis, G. F., Shulaw, W. P., Bech-Nielsen, S., Rings, D. M., & St-Jean, G. (1993). Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. *American journal of veterinary research*, *54*(9), 1441-1445.
- Koets, A., Ravesloot, L., Ruuls, R., Dinkla, A., Eisenberg, S., & Lievaart-Peterson, K. (2019). Effects of age and environment on adaptive immune responses to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) vaccination in dairy goats in relation to paratuberculosis control strategies. *Veterinary sciences*, *6*(3), 62.
- Koets, A. P., Rutten, V., Bakker, D., Van Der Hage, M. H., & Van Eden, W. (2000). Lewis rats are not susceptible to oral infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Veterinary microbiology*, *77*(3-4), 487-495.
- Koivusalo, M., Vermeiren, C., Yuen, J., Reeve, C., Gadbois, S., & Katz, K. (2017). Canine scent detection as a tool to distinguish methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *The Journal of hospital infection*, *96*(1), 93-95.
- Kopecna, M., Ondrus, S., Literak, I., Klimes, J., Horvathova, A., Moravkova, M., . . . Pavlik, I. (2006). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in two brown bears in the Central European Carpathians. *Journal of Wildlife Diseases*, *42*(3), 691-695.
- Koskinen, A., Koskinen, H., Bäck, L., Saxen, H., & Klockars, T. (2017). A detection dog for paediatric urinary tract infection caused by *Escherichia coli*. *Infectious Diseases*, *49*(11-12), 874-877.
- Kostoulas, P., Leontides, L., Billinis, C., Amiridis, G. S., & Florou, M. (2006). The association of sub-clinical paratuberculosis with the fertility of Greek dairy ewes and goats varies with parity. *Preventive veterinary medicine*, *74*(2-3), 226-238.
- Landmine Monitor Report. (2009). In. <http://www.the-monitor.org>.
- Lanszki, J., Heltai, M., & Szabó, L. (2006). Feeding habits and trophic niche overlap between sympatric golden jackal (*Canis aureus*) and red fox (*Vulpes vulpes*) in the Pannonian ecoregion (Hungary). *Canadian Journal of Zoology*, *84*(11), 1647-1656.
- Lanszki, J., Kurys, A., Szabó, L., Nagyapáti, N., Porter, L. B., & Heltai, M. (2016). Diet composition of the golden jackal and the sympatric red fox in an agricultural area (Hungary). *Journal of Vertebrate Biology*, *65*(4), 310-322.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., & Cutlip, R. C. (1975). Age of cattle as related to resistance to infection with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*, *36*(3), 255-257.
- Larsen, A. B., Merkal, R. S., & Vardaman, T. H. (1956). Survival time of *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*, *17*(64), 549-551.
- Lasseter, A. E., Jacobi, K. P., Farley, R., & Hensel, L. (2003). Cadaver dog and handler team capabilities in the recovery of buried human remains in the southeastern United States. *Journal of forensic sciences*, *48*(3), 617-621.
- Lazarowski, L., Krichbaum, S., DeGreeff, L. E., Simon, A., Singletary, M., Angle, C., & Waggoner, L. P. (2020). Methodological considerations in canine olfactory detection research. *Frontiers in Veterinary Science*, *7*.
- Lazarowski, L., Waggoner, L. P., Krichbaum, S., Singletary, M., Haney, P. S., Rogers, B., & Angle, C. (2020). Selecting dogs for explosives detection: behavioral characteristics. *Frontiers in Veterinary Science*, 597.
- Lescureux, N., & Linnell, J. D. C. (2014). Warring brothers: The complex interactions between wolves (*Canis lupus*) and dogs (*Canis familiaris*) in a conservation context. *Biological conservation*, *171*, 232-245.
- Li, Y., Yao, L., Li, J., Chen, L., Song, Y., Cai, Z., & Yang, C. (2020). Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *Journal of medical virology*, *92*(7), 903-908.

- Lienhardt, C., Zumla, A., Gebreselassie, N., Frick, M., Gray, G., Kasaeva, T., & Raviglione, M. (2018). Tuberculosis research and development: seeding the future. *The Lancet Respiratory Medicine*, 6(4), 242-244.
- Lievaart-Peterson, K. (2017). Eindverslag: Publiek private samenwerking kleine herkauwers (PPS-KH) Paratuberculose in de melkgeitenhouderij. In.
- Lilenbaum, W., Marassi, C. D., & Oelemann, W. M. R. (2007). Paratuberculosis: an update. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 580-590.
- Lin, H.-M., Chi, W.-L., Lin, C.-C., Tseng, Y.-C., Chen, W.-T., Kung, Y.-L., . . . Chen, Y.-Y. (2011). Fire ant-detecting canines: a complementary method in detecting red imported fire ants. *Journal of economic entomology*, 104(1), 225-231.
- Lit, L., Schweitzer, J. B., & Oberbauer, A. M. (2011). Handler beliefs affect scent detection dog outcomes. *Animal cognition*, 14(3), 387-394.
- Long, R. A., Donovan, T. M., Mackay, P., Zielinski, W. J., & Buzas, J. S. (2007a). Comparing scat detection dogs, cameras, and hair snares for surveying carnivores. *The Journal of Wildlife Management*, 71(6), 2018-2025.
- Long, R. A., Donovan, T. M., Mackay, P., Zielinski, W. J., & Buzas, J. S. (2007b). Effectiveness of scat detection dogs for detecting forest carnivores. *The Journal of Wildlife Management*, 71(6), 2007-2017.
- Long, R. A., MacKay, P., Ray, J., & Zielinski, W. (2012). *Noninvasive survey methods for carnivores*. Island Press.
- Lovell, R., Levi, M., & Francis, J. (1944). Studies on the survival of Johne's bacilli. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 54, 120-129.
- Lu, Z., Schukken, Y. H., Smith, R. L., & Grohn, Y. T. (2010). Stochastic simulations of a multi-group compartmental model for Johne's disease on US dairy herds with test-based culling intervention. *Journal of theoretical biology*, 264(4), 1190-1201.
- MacKay, P., Smith, D. A., Long, R. A., & Parker, M. (2008). Scat detection dogs. *Noninvasive survey methods for carnivores*, 183-222.
- MacLean, E. L., & Hare, B. (2018). Enhanced selection of assistance and explosive detection dogs using cognitive measures. *Frontiers in Veterinary Science*, 5, 236.
- Mahoney, A. M., Weetjens, B. J., Cox, C., Beyene, N., Mgode, G., Jubitana, M., . . . Durgin, A. (2011). Using giant African pouched rats to detect tuberculosis in human sputum samples: 2010 findings. *Pan African Medical Journal*, 9(1).
- Manning, E. J. B., Kucera, T. E., Gates, N. B., Woods, L. M., & Fallon-McKnight, M. (2003). Testing for Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis infection in asymptomatic free-ranging tule elk from an infected herd. *Journal of Wildlife Diseases*, 39(2), 323-328.
- Martin, G., & Pear, J. (2019). *Behavior modification: What it is and how to do it*. Routledge.
- Matthew, E. E., Verster, R., & Weldon, C. (2021). A case study in canine detection of giant bullfrog scent. *Journal of Vertebrate Biology*, 69(3), 20043-20041.
- Maurer, B. M., Döring, D., Scheipl, F., Küchenhoff, H., & Erhard, M. H. (2008). Effects of a gentling programme on the behaviour of laboratory rats towards humans. *Applied animal behaviour science*, 114(3-4), 554-571.
- McKenna, S. L. B., Keefe, G. P., Tiwari, A., VanLeeuwen, J., & Barkema, H. W. (2006). Johne's disease in Canada part II: disease impacts, risk factors, and control programs for dairy producers. *The Canadian veterinary journal*, 47(11), 1089.
- Mgode, G. F., Weetjens, B. J., Cox, C., Jubitana, M., Machang'u, R. S., Lazar, D., . . . Kaufmann, S. H. E. (2012). Ability of Cricetomys rats to detect Mycobacterium tuberculosis and discriminate it from other microorganisms. *Tuberculosis*, 92(2), 182-186.
- Miller, M. A., Davey, S. C., Van Helden, L. S., Kettner, F., Weltan, S. M., Last, R., . . . Van Helden, P. D. (2017). Paratuberculosis in a domestic dog in South Africa. *Journal of the South African Veterinary Association*, 88(1), 1-5.

- Momotani, E., Whipple, D. L., Thiermann, A. B., & Cheville, N. F. (1988). Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobacterium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Veterinary pathology*, 25(2), 131-137.
- Moser, A. Y., Bizo, L., & Brown, W. Y. (2019). Olfactory generalization in detector dogs. *Animals*, 9(9), 702.
- Moser, E., & McCulloch, M. (2010). Canine scent detection of human cancers: A review of methods and accuracy. *Journal of Veterinary Behavior*, 5(3), 145-152.
- Moss, M. T., Green, E. P., Tizard, M. L., Malik, Z. P., & Hermon-Taylor, J. (1991). Specific detection of Mycobacterium paratuberculosis by DNA hybridisation with a fragment of the insertion element IS900. *Gut*, 32(4), 395-398.
- National Research, C. (2003). Diagnosis and control of Johne's disease.
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697-709.
- Oldenburg Jr, C., Schoon, A., & Heitkönig, I. M. A. (2016). Wildlife detection dog training: a case study on achieving generalization between target odor variations while retaining specificity. *Journal of Veterinary Behavior*, 13, 34-38.
- Olsen, I., Sigurðardóttir, Ó., & Djønné, B. (2002). Paratuberculosis with special reference to cattle A review. *Veterinary quarterly*, 24(1), 12-28.
- Orkin, J. D., Yang, Y., Yang, C., Douglas, W. Y., & Jiang, X. (2016). Cost-effective scat-detection dogs: unleashing a powerful new tool for international mammalian conservation biology. *Scientific reports*, 6(1), 1-10.
- Ott, S. L., Wells, S. J., & Wagner, B. A. (1999). Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. *Preventive veterinary medicine*, 40(3-4), 179-192.
- Over, K., Crandall, P. G., O'Bryan, C. A., & Ricke, S. C. (2011). Current perspectives on Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, Johne's disease, and Crohn's disease: a review. *Critical reviews in microbiology*, 37(2), 141-156.
- Palmer, M. V., Stoffregen, W. C., Carpenter, J. G., & Stabel, J. R. (2005). Isolation of Mycobacterium avium subsp paratuberculosis (Map) from feral cats on a dairy farm with Map-infected cattle. *Journal of Wildlife Diseases*, 41(3), 629-635.
- Papet, L. E. (2016). Narcotic and explosive odors: Volatile organic compounds as training aids for olfactory detection. In *Canine Olfaction Science and Law* (pp. 293-306). CRC press.
- Pedersen, K., Manning, E. J. B., & Corn, J. L. (2008). Distribution of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the Lower Florida Keys. *Journal of wildlife diseases*, 44(3), 578-584.
- Penberthy, J. (1912). The treatment of grass land with a view to the elimination of disease. *JR Agric. Soc*, 73, 73-90.
- Perez, V., Tellechea, J., Badiola, J. J., Gutierrez, M., & Jf, G. M. (1997). Relation between serologic response and pathologic findings in sheep with naturally acquired paratuberculosis. *American journal of veterinary research*, 58(8), 799-803.
- Pickel, D., Manucy, G. P., Walker, D. B., Hall, S. B., & Walker, J. C. (2004). Evidence for canine olfactory detection of melanoma. *Applied Animal Behaviour Science*, 89(1-2), 107-116.
- Pirrone, F., & Albertini, M. (2017). Olfactory detection of cancer by trained sniffer dogs: a systematic review of the literature. *Journal of Veterinary Behavior*, 19, 105-117.
- Plomin, R. (2001). The genetics of g in human and mouse. *Nature Reviews Neuroscience*, 2(2), 136-141.
- Poling, A., Valverde, E., Beyene, N., Mulder, C., Cox, C., Mgone, G., & Edwards, T. L. (2017). Active tuberculosis detection by pouched rats in 2014: More than 2,000 new patients found in two countries. *Journal of applied behavior analysis*, 50(1), 165-169.
- Poling, A., Weetjens, B., Cox, C., Beyene, N., Durgin, A., & Mahoney, A. (2011). Tuberculosis detection by giant African pouched rats. *The Behavior Analyst*, 34(1), 47-54.

- Poling, A., Weetjens, B., Cox, C., Beyene, N. W., Bach, H., & Sully, A. (2011). Using trained pouched rats to detect land mines: Another victory for operant conditioning. *Journal of applied behavior analysis, 44*(2), 351-355.
- Poling, A., Weetjens, B. J., Cox, C., Beyene, N. W., & Sully, A. (2010). Using giant African pouched rats (*Cricetomys gambianus*) to detect landmines. *The Psychological Record, 60*(4), 715-728.
- Poyntz, H. C., Stylianou, E., Griffiths, K. L., Marsay, L., Checkley, A. M., & McShane, H. (2014). Non-tuberculous mycobacteria have diverse effects on BCG efficacy against *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis, 94*(3), 226-237.
- Rawson, N. E. (2006). Olfactory loss in aging. *Science of Aging Knowledge Environment, 2006*(5), pe6-pe6.
- Rawther, S. S., Saseendranath, M. R., Nair, G. P. K., Tresamol, P. V., Pillai, U. N., Abraham, J., . . . Nimisha, K. K. N. (2012). Diagnosis of paratuberculosis in goats by cell mediated immune response, conventional and molecular diagnostic techniques. *Tropical animal health and production, 44*(4), 911-914.
- Reddacliff, L., Eppleston, J., Windsor, P., Whittington, R., & Jones, S. (2006). Efficacy of a killed vaccine for the control of paratuberculosis in Australian sheep flocks. *Veterinary microbiology, 115*(1-3), 77-90.
- Reed, S. E., Bidlack, A. L., Hurt, A., & Getz, W. M. (2011). Detection distance and environmental factors in conservation detection dog surveys. *The Journal of Wildlife Management, 75*(1), 243-251.
- Reeve, C., & Koivusalo, M. (2018). Biomedical scent detection dogs: would they pass as a health technology? *Pet Behaviour Science*(6), 1-7.
- Richards, K. M., Cotton, S. J., & Sandeman, R. M. (2008). The use of detector dogs in the diagnosis of nematode infections in sheep feces. *Journal of veterinary behavior, 3*(1), 25-31.
- Robbe-Austerman, S. (2011). Control of paratuberculosis in small ruminants. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice, 27*(3), 609-620.
- Robbe-Austerman, S., Stabel, J. R., & Palmer, M. V. (2006). Evaluation of the gamma interferon ELISA in sheep subclinically infected with *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis using a whole-cell sonicate or a johnin purified-protein derivative. *Journal of veterinary diagnostic investigation, 18*(2), 189-194.
- Roda, F., Sentilles, J., Molins, C., Duchamp, C., Hansen, É., & Jean, N. (2021). Wolf scat detection dog improves wolf genetic monitoring in new French colonized areas. *Journal of Vertebrate Biology, 69*(3), 20102-20101.
- Rohlf, V. I., Bennett, P. C., Toukhsati, S., & Coleman, G. (2010). Why do even committed dog owners fail to comply with some responsible ownership practices? *Anthrozoös, 23*(2), 143-155.
- Rohlf, V. I., Bennett, P. C., Toukhsati, S., & Coleman, G. (2012). Beliefs underlying dog owners' health care behaviors: results from a large, self-selected, internet sample. *Anthrozoös, 25*(2), 171-185.
- Rolland, R. M., Hamilton, P. K., Kraus, S. D., Davenport, B., Gillett, R. M., & Wasser, S. K. (2007). Faecal sampling using detection dogs to study reproduction and health in North Atlantic right whales (*Euhalaena glacialis*). *Journal of Cetacean Research and Management, 8*(2), 121.
- Rowe, M. T., & Grant, I. R. (2006). *Mycobacterium avium* ssp. paratuberculosis and its potential survival tactics. *Letters in applied microbiology, 42*(4), 305-311.
- Saxegaard, F., & Fodstad, F. H. (1985). Control of paratuberculosis (Johne's disease) in goats by vaccination. *The Veterinary Record, 116*(16), 439-441.
- Schuling, E., & Groenveld, J. (2005). Geitenziektes en hun Schade. *WUR: Wageningen, The Netherlands*.
- Schulze-Röbbecke, R., & Buchholtz, K. (1992). Heat susceptibility of aquatic mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology, 58*(6), 1869-1873.
- Schwartz, C. W., Schwartz, E. R., & Kiester, A. R. (1974). *The three-toed box turtle in central Missouri*. Missouri Department of Conservation.

- Sergeant, E. S. G., Whittington, R. J., & More, S. J. (2002). Sensitivity and specificity of pooled faecal culture and serology as flock-screening tests for detection of ovine paratuberculosis in Australia. *Preventive Veterinary Medicine*, 52(3-4), 199-211.
- Sevilla, I., Li, L., Amonsin, A., Garrido, J. M., Geijo, M. V., Kapur, V., & Juste, R. A. (2008). Comparative analysis of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis isolates from cattle, sheep and goats by short sequence repeat and pulsed-field gel electrophoresis typing. *BMC microbiology*, 8(1), 1-8.
- Shulaw, W. (2011). VME-0003-01-Johne's disease in sheep and goat. In (Vol. fact sheet. Vet. Prev. Med. 1900 Coffey Road, Columbus, OH 43210.). Ohio State University.
- Sigurðardóttir, Ó. G., Valheim, M., & Press, C. M. (2004). Establishment of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in the intestine of ruminants. *Adv Drug Deliv Rev*, 56(6), 819-834. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2003.10.032>
- Silverstein, M. D., Loftus Jr, E. V., Sandborn, W. J., Tremaine, W. J., Feagan, B. G., Nietert, P. J., . . . Zinsmeister, A. R. (1999). Clinical course and costs of care for Crohn's disease: Markov model analysis of a population-based cohort. *Gastroenterology*, 117(1), 49-57.
- Sivakumar, P., Singh, N., & Tripathi, B. N. (2005). Pathology and diagnosis of paratuberculosis in water buffaloes. In (Vol. Proceedings of 8th ICP 2005 theme 2: Immunology, pathology and pathogenesis., pp. p 160).
- Smith, D. A., Ralls, K., Davenport, B., Adams, B., & Maldonado, J. E. (2001). Canine assistants for conservationists. *Science*, 291(5503), 435-435.
- Smith, D. A., Ralls, K., Hurt, A., Adams, B., Parker, M., Davenport, B., . . . Maldonado, J. E. (2003). Detection and accuracy rates of dogs trained to find scats of San Joaquin kit foxes (*Vulpes macrotis mutica*). *Animal Conservation*, 6(4), 339-346.
- Sockett, D. C., Conrad, T. A., Thomas, C. B., & Collins, M. T. (1992). Evaluation of four serological tests for bovine paratuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 30(5), 1134-1139.
- Sonoda, H., Kohnoe, S., Yamazato, T., Satoh, Y., Morizono, G., Shikata, K., . . . Kakeji, Y. (2011). Colorectal cancer screening with odour material by canine scent detection. *Gut*, 60(6), 814-819.
- Souriau, A., Freret, S., Foret, B., Willemsen, P. T. J., Bakker, D., & Guilloteau, L. A. (2017). Identification of new antigen candidates for the early diagnosis of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection in goats. *Research in veterinary science*, 115, 278-287.
- Spruijt, B. M., Van Hooff, J. A., & Gispen, W. H. (1992). Ethology and neurobiology of grooming behavior. *Physiological reviews*, 72(3), 825-852.
- Stabel, J. R., Bradner, L., Robbe-Austerman, S., & Beitz, D. C. (2014). Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *Journal of dairy science*, 97(10), 6296-6304.
- Stehman, S. M. (1996). Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 12(2), 441-455.
- Sternberg, S., & Viske, D. (2003). Control strategies for paratuberculosis in Sweden. *Acta Vet Scand*, 44(3-4), 247-249.
- Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., Juan, d. L., Denham, S., . . . Greig, A. (2009). Occurrence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol*, 9(1), 212-212. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-212>
- Sugden, E. A., Corner, A. H., Samagh, B. S., Brooks, B. W., Turcotte, C., Nielsen, K. H., . . . Duncan, J. R. (1989). Serodiagnosis of ovine paratuberculosis, using lipoarabinomannan in an enzyme-linked immunosorbent assay. *American journal of veterinary research*, 50(6), 850-854.
- Sweeney, R. W. (1996). Transmission of paratuberculosis. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 12(2), 305-312.

- Sweeney, R. W., Jones, D. E., Habecker, P., & Scott, P. (1998). Interferon-gamma and interleukin 4 gene expression in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. *American journal of veterinary research*, *59*(7), 842-847.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Buckley, C. L., Spencer, P., Rosenberger, A. E., & Hutchinson, L. J. (1994). Diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, using enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. *American journal of veterinary research*, *55*(7), 905-909.
- Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., & Rosenberger, A. E. (1992). *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *Journal of clinical microbiology*, *30*(1), 166-171.
- Tahamtan, A., & Ardebili, A. (2020). Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert review of molecular diagnostics*, *20*(5), 453-454.
- Taverna, G., Tidu, L., Grizzi, F., Torri, V., Mandressi, A., Sardella, P., . . . Giusti, G. (2015). Olfactory system of highly trained dogs detects prostate cancer in urine samples. *The Journal of urology*, *193*(4), 1382-1387.
- Thorel, M.-F., Krichevsky, M., & Lévy-Frébault, V. V. (1990). Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium*, and description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov., and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *40*(3), 254-260.
- Tom, B. M. (2012). A comparison of noninvasive survey methods for monitoring mesocarnivore populations in Kentucky.
- Tuerlinckx, A., Vicca, J., Deprez, P., & Pardon, B. (2018). Paratuberculosis in dairy and pygmy goats: an underestimated problem? *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*, *87*(3), 127-133.
- Valentin-Weigand, P., & Goethe, R. (1999). Pathogenesis of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections in ruminants: still more questions than answers. *Microbes and infection*, *1*(13), 1121-1127.
- Valheim, M., Hasvold, H. J., Storset, A. K., Larsen, H. J. S., & Press, C. M. (2002). Localisation of CD25+ cells and MHCII+ cells in lymph nodes draining *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis vaccination granuloma and the presence of a systemic immune response. *Research in veterinary science*, *73*(1), 77-85.
- Van Den Berge, K. (2018). Year (s) of the wolf: no doubt about it! *Lutra (Leiden)*, *61*(2), 215-217.
- Van Der Poel, A. M., De Vos-Frerichs, T. P., & Kruk, M. R. (1979). The induction of aggressive behaviour by electrical stimulation in the hypothalamus of male rats. *Behaviour*, *70*(3-4), 292-322.
- Van der Poel, A. M., Olivier, B., Mos, J., Kruk, M. R., Meelis, W., & Van Aken, J. H. M. (1982). Anti-aggressive effect of a new phenylpiperazine compound (DU27716) on hypothalamically induced behavioural activities. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, *17*(1), 147-153.
- Van Hulzen, K. J. E., Koets, A. P., Nielen, M., Hoeboer, J., Van Arendonk, J. A. M., & Heuven, H. C. M. (2012). Genetic variation for infection status as determined by a specific antibody response against *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis in milk of Dutch dairy goats. *Journal of dairy science*, *95*(10), 6145-6151.
- Verhagen, R., Cox, C., Machang'u, R., Weetjens, B., & Billet, M. (2003). Preliminary results on the use of *Cricetomys* rats as indicators of buried explosives in field conditions. *Mine detection dogs: training operations and odour detection*. Geneva: Geneva International Centre for Humanitarian Demining, 175-193.
- Verhagen, R., Weetjens, F., Cox, C., Weetjens, B., & Billet, M. (2006). Rats to the rescue: Results of the first tests on a real minefield. *The Journal of Conventional Weapons Destruction*, *9*(2), 51.
- Vervaecke, H., Van Krunkelsven, E., & Van Den Berge, K. (2021). Training of Ecological Detection Dogs for Wolf Scat (*Canis lupus*). *Bulletin of the University of Agricultural Sciences & Veterinary Medicine Cluj-Napoca. Animal Science & Biotechnologies*, *78*(1).

- Vesely, D. G. Training of Conservation Detection Dogs to Locate Kincaid's Lupine (*Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*).
- Vesely, D. G. (2008). Training of Conservation Detection Dogs to Locate Kincaid's Lupine (*Lupinus sulphureus* ssp. *kincaidii*).
- Vlasseva, A., Chassovnikarova, T., & Atanasov, N. (2017). Autumn-winter diet and food niche overlap between red fox (*Vulpes vulpes* L., 1758) and golden jackal (*Canis aureus* L., 1758) in two regions in Bulgaria. *Acta Zool Bulg*, *69*, 217-220.
- Vynne, C., Skalski, J. R., Machado, R. B., Groom, M. J., Jácomo, A. T. A., Marinho-Filho, J., . . . Smith, H. (2011). Effectiveness of scat-detection dogs in determining species presence in a tropical savanna landscape. *Conservation Biology*, *25*(1), 154-162.
- Wasser, S. K., Davenport, B., Ramage, E. R., Hunt, K. E., Parker, M., Clarke, C., & Stenhouse, G. (2004). Scat detection dogs in wildlife research and management: application to grizzly and black bears in the Yellowhead Ecosystem, Alberta, Canada. *Canadian Journal of Zoology*, *82*(3), 475-492.
- Webb, E. K., Saccardo, C. C., Poling, A., Cox, C., & Fast, C. D. (2020). Rapidly training African giant pouched rats (*Cricetomys ansorgei*) with multiple targets for scent detection. *Behavioural processes*, *174*, 104085.
- Weetjens, B. J., Mgode, G. F., Machang'u, R. S., Kazwala, R., Mfinanga, G., Lwilla, F., . . . Mtandu, R. (2009). African pouched rats for the detection of pulmonary tuberculosis in sputum samples. *The International journal of tuberculosis and lung disease*, *13*(6), 737-743.
- Whist, A. C., Liland, K. H., Jonsson, M. E., Sæbø, S., Sviland, S., Østerås, O., . . . Hopp, P. (2014). Designing a risk-based surveillance program for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* in Norwegian dairy herds using multivariate statistical process control analysis. *Journal of Dairy science*, *97*(11), 6835-6849.
- Whitlock, R. H., & Buergelt, C. (1996). Preclinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, *12*(2), 345-356.
- Whittington, R. J., & Sergeant, E. S. G. (2001). Progress towards understanding the spread, detection and control of *Mycobacterium avium* subsp. *para-tuberculosis* in animal populations. *Australian Veterinary Journal*, *79*(4), 267-278.
- Wiersinga, W. J., Rhodes, A., Cheng, A. C., Peacock, S. J., & Prescott, H. C. (2020). Pathophysiology, transmission, diagnosis, and treatment of coronavirus disease 2019 (COVID-19): a review. *Jama*, *324*(8), 782-793.
- Williams, M., & Johnston, J. M. (2002). Training and maintaining the performance of dogs (*Canis familiaris*) on an increasing number of odor discriminations in a controlled setting. *Applied Animal Behaviour Science*, *78*(1), 55-65.
- Willis, C. M., Britton, L. E., Harris, R., Wallace, J., & Guest, C. M. (2011). Volatile organic compounds as biomarkers of bladder cancer: Sensitivity and specificity using trained sniffer dogs. *Cancer Biomarkers*, *8*(3), 145-153.
- Windsor, P. A. (2015). Paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Microbiol*, *181*(1-2), 161-169. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.019>
- Woo, S.-R., & Czuprynski, C. J. (2008). Tactics of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* for intracellular survival in mononuclear phagocytes. *Journal of veterinary science*, *9*(1), 1.
- World Health Organization (WHO). (2007). In. <https://www.who.int/>.
- World Health Organization (WHO). (2015). In. <https://www.who.int/>.
- Xiao, A. T., Tong, Y. X., & Zhang, S. (2020). False-negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: rather than recurrence. *Journal of medical virology*.
- Xu, P., Wang, K., Lu, C., Dong, L., Chen, Y., Wang, Q., . . . Liu, X. (2017). Effects of the chronic restraint stress induced depression on reward-related learning in rats. *Behavioural brain research*, *321*, 185-192.

- Yakes, B. J., Lipert, R. J., Bannantine, J. P., & Porter, M. D. (2008). Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* by a sonicate immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering. *Clinical and Vaccine Immunology*, *15*(2), 227-234.
- Zubedat, S., Aga-Mizrachi, S., Cymerblit-Sabba, A., Shwartz, J., Leon, J. F., Rozen, S., . . . Avital, A. (2014). Human–animal interface: the effects of handler's stress on the performance of canines in an explosive detection task. *Applied Animal Behaviour Science*, *158*, 69-75.