

# Optimalisatie van een staalnameprocedure voor detectie van *Toxocara* eitjes in zandbakken

biotechniek  
bachelor in de agro- en biotechniek  
dierenzorg  
campus Roeselare



Vicky Deblock  
3de / Dierenzorg  
Begeleidende lector: Merijn Vanhee  
Stagemotor: Merijn Vanhee



Expertisecentrum Agro- en biotechnologie, Vives  
Wilgenstraat 32  
8800 Roeselare  
Tel. +32 51 23 29 83

merijn.vanhee@vives.be  
<http://www.vives.be/onderzoek>



**Woord vooraf**

Vele mensen hebben mij bij dit werk rechtstreeks of onrechtstreeks geholpen. Bij deze wil ik al die mensen bedanken. Mijn dank gaat allereerst uit naar mijn begeleidende lector en mentor Dr. Ir. M. Vanhee. Hij leidt dit onderzoek en heeft me goed begeleid in de uitvoering en bespreking ervan. Ik heb er veel van geleerd.

Tijdens de stage zelf werd ik ook goed geholpen door de lectoren in het laboratorium van de school. Dit was voornamelijk Mevrouw I. Vanherpe. Ze kon me vooral helpen voor de praktische zaken in het labo en zorgde voor goed gezelschap. Ook Dr. J. Viaene wil ik bedanken. Zij stond ons bij met haar parasitologische kennis.

Naast deze mensen, wil ik ook het Expertisecentrum van de VIVES Hogeschool in Roeselare bedanken voor de kans die ik kreeg om mee te werken aan dit interessant onderzoek. Het was een zeer leerrijke ervaring.

**Vicky Deblock**  
**juni 2014**

## GEÏNTEGREERD EINDWERK

### Titel

Optimalisatie van een staalnameprocedure voor detectie van *Toxocara* eitjes in zandbakken

### Abstract

*Toxocara* is een veel voorkomende darmparasiet bij hond en kat. Via eitjes in de mest, kan deze parasiet overgedragen worden op de mens. Vaak doen hond en kat hun behoefte in een zandbak waar ook de kinderen in spelen en zo besmet zand kunnen opnemen.

Het Expertisecentrum Agro- en biotechnologie plant een studie naar de contaminatiegraad van zandbakken in België. Dit werk is hiervoor een voorstudie in de stad Roeselare waarbij de nadruk ligt op de optimalisatie van de staalnameprocedure.

Voor het onderzoek van zandstalen op aanwezigheid van *Toxocara* eitjes wordt gebruik gemaakt van een zeefmethode voor het fractioneren van het zand gevolgd door sedimentatie, flotatie in sucrose-oplossing en microscopie. De staalnames worden op basis van een literatuurstudie uitgevoerd en aangepast op basis van eigen ondervindingen in de praktijk. Bij positieve stalen wordt via real-time PCR het species (*T. canis* of *T. cati*) bevestigd.

Er werden tien zandbakken onderzocht op aanwezigheid van *Toxocara* eitjes, waarbij drie staalnameprocedures werden uitgetoet. Op basis van de resultaten worden hier de voor- en nadelen van de verschillende staalnameprocedures vergeleken en bediscussieerd.

Van de tien zandbakken die werden onderzocht, bleek één zandbak gecontamineerd met *Toxocara canis*. Daarnaast werden in verschillende zandbakken ook uitwerpselen gevonden waarvan er een aantal gecontamineerd waren met *Toxocara* eitjes.

### Trefwoorden

- *Toxocara*
- Staalnameprocedure
- Bodemcontaminatie
- Zoönose
- Zandbakken

## Inhoudsopgave

<b>GEÏNTEGREERD EINDWERK</b> .....	<b>2</b>
<b>Titel</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>2</b>
<b>Trefwoorden</b> .....	<b>2</b>
<b>Technische fiche stagebedrijf</b> .....	<b>5</b>
<b>1 Voorstelling van het bedrijf</b> .....	<b>6</b>
<b>2 Doelstelling</b> .....	<b>7</b>
2.1 SITUERING EINDWERK .....	7
2.2 CENTRALE PROBLEEMSTELLING EN DOELSTELLING .....	7
2.3 METHODIEK .....	7
<b>3 Literatuurstudie</b> .....	<b>8</b>
3.1 <i>TOXOCARA</i> SPP. ....	8
3.1.1 <i>Classificatie</i> .....	8
3.1.2 <i>Morfologie</i> .....	8
3.1.3 <i>Levenscyclus</i> .....	8
3.1.4 <i>Toxocariasis</i> .....	11
3.1.4.1 Ziektebeeld hond.....	11
3.1.4.2 Ziektebeeld kat .....	11
3.1.4.3 Ziektebeeld mens .....	12
3.1.5 <i>Prevalentie Toxocara</i> .....	12
3.2 DETECTIETECHNIKEN VOOR <i>TOXOCARA</i> EITJES IN BODEMSTALEN.....	12
3.3 PREVALENTIE VAN <i>TOXOCARA</i> EITJES IN DE BODEM .....	14
3.4 STAALNAMEPROCEDURE .....	21
3.4.1 <i>Staalnamelocaties</i> .....	21
3.4.1.1 Studiegebied.....	21
3.4.1.2 Locatie .....	21
3.4.1.3 Bodemsoort .....	24
3.4.1.4 Staalnamepatroon .....	24
3.4.2 <i>Diepte</i> .....	25
3.4.3 <i>Aantal en volume</i> .....	26
3.4.4 <i>Beïnvloedende factoren</i> .....	27
3.4.4.1 Regental en aardwormen.....	27
3.4.4.2 Seizoen .....	27
3.4.4.3 Hondenbeleid .....	27
3.4.4.4 Toegankelijkheid.....	28
3.4.4.5 Verzorgingsstaat zandbakken.....	29
<b>4 Materiaal en methode</b> .....	<b>30</b>
4.1 ISOLATIE EITJES UIT <i>TOXOCARA</i> WORMEN .....	30
4.2 DETECTIE VAN <i>TOXOCARA</i> EITJES IN FAECES D.M.V. FLOTATIE.....	30
4.3 DETECTIE VAN <i>TOXOCARA</i> EITJES IN ZAND D.M.V. ZEVING, SEDIMENTATIE EN FLOTATIE .....	31
4.3.1 <i>Vorbereiding</i> .....	31
4.3.2 <i>Zeven</i> .....	32
4.3.3 <i>Sedimentatie</i> .....	33
4.3.4 <i>Centrifugatie</i> .....	33
4.3.5 <i>Flotatie</i> .....	33

4.3.6	<i>Microscopisch onderzoek</i> .....	34
4.3.7	<i>Onderhoud van het zeeftoestel</i> .....	34
4.4	DNA EXTRACTIE UIT <i>TOXOCARA</i> EITJES .....	35
4.5	REAL-TIME PCR.....	35
4.6	REINIGING .....	36
4.7	STAALNAMEPROCEDURE .....	37
<b>5</b>	<b>Resultaten</b> .....	<b>39</b>
5.1	ISOLATIE EITJES UIT <i>TOXOCARA</i> WORMEN .....	39
5.2	BEPALEN VAN DE GEVOELIGHEID VAN DE ZEEFMETHODE .....	40
5.3	BEPALEN VAN DE GEVOELIGHEID VAN DE DNA EXTRACTIE EN REAL-TIME PCR.....	41
5.4	ONDERZOEK VAN ZANDSTALEN UIT 10 SPEELTUINEN IN ROESELARE OP AANWEZIGHEID VAN <i>TOXOCARA</i> EITJES .....	42
5.4.1	<i>Algemene bevindingen</i> .....	42
5.4.1.1	Vorm en oppervlakte zandbak .....	42
5.4.1.2	Plakkaten .....	42
5.4.1.3	Aanwezigheid hond en kat .....	43
5.4.1.4	Aanwezigheid uitwerpselen .....	44
5.4.1.5	Microscopische analyse van zandstalen .....	45
5.4.2	<i>Staalnameprocedure</i> .....	49
5.4.2.1	Staalnameprocedure 1 .....	49
5.4.2.2	Staalnameprocedure 2 .....	49
5.4.2.3	Staalnameprocedure 3 .....	49
<b>6</b>	<b>Discussie en algemeen besluit</b> .....	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Bio-ethische reflectie</b> .....	<b>53</b>
<b>8</b>	<b>Publiceerbaar artikel</b> .....	<b>54</b>
<b>9</b>	<b>Persoonlijke visie op de stage en het stagebedrijf</b> .....	<b>56</b>
	<b>Bijlagen</b> .....	<b>I</b>
	<b>Lijst met gebruikte afkortingen</b> .....	<b>II</b>
	<b>Lijst met figuren</b> .....	<b>III</b>
	<b>Lijst met tabellen</b> .....	<b>V</b>
	<b>Lijst met grafieken</b> .....	<b>VI</b>
	<b>Bronvermelding</b> .....	<b>VII</b>
	<b>Artikels</b> .....	<b>VII</b>

**Technische fiche stagebedrijf**

<b>Naam stagebedrijf:</b>	Expertisecentrum agro-en biotechnologie, Vives campus Roeselare
<b>Adres:</b>	Wilgenstraat 32
	8800 Roeselare
<b>Telefoonnummer:</b>	051 23 29 83
<b>GSM-nummer:</b>	0485 83 45 32
<b>Faxnummer:</b>	051 22 82 58
<b>E-mail:</b>	vanhee.merijn@vives.be
<b>Directeur/diensthoofd:</b>	Isabel Vanslemsbrouck, directeur studiegebied Biotechniek
<b>Stagementor:</b>	Dr. Ir. Merijn Vanhee
<b>Sector:</b>	Praktijkgericht wetenschappelijk onderzoek
<b>Afdeling/Groep binnen het stagebedrijf:</b>	Onderzoeksgroep Dier en Biotechnologie
<b>Aantal werknemers:</b>	
<b>Omzet:</b>	
<b>Producten:</b>	
<b>Specialisatie:</b>	
<b>Twee relevante publicaties van het stagebedrijf:</b>	
<b>Bijkomende gegevens:</b>	

# 1 Voorstelling van het bedrijf

Dit eindwerk wordt begeleid door het expertisecentrum agro- en biotechnologie. Dit expertisecentrum maakt deel uit van de Vives campus in Roeselare.

Een expertisecentrum doet aan wetenschappelijk onderzoek binnen het kader van de opleidingen binnen het departement. Dit project kadert binnen een samenwerking tussen de onderzoeksgroep Dier en de onderzoeksgroep Biotechnologie.

In de onderzoeksgroep Dier is er bijzondere aandacht voor onderwerpen met betrekking tot dierenwelzijn, de therapeutische waarde van dieren en de relatie mens-dier in onze maatschappij. Er wordt aan maatschappelijke dienstverlening gedaan en aan professionalisering van de betreffende sector via bijscholingscursussen.

Binnen de onderzoeksgroep Biotechnologie wordt onderzoek verricht op twee domeinen: plantenbiotechnologie en laboratoriumdiagnostiek voor dierziekten. In het laboratorium zijn verschillende (moleculaire) testen voorhanden voor detectie van pathogenen bij dieren, onder andere voor *Toxocara canis* en *Toxocara cati*.



## 2 Doelstelling

### 2.1 Situering eindwerk

Dit eindwerk kadert in een project opgezet door het Expertisecentrum agro- en biotechnologie van de Vives hogeschool in Roeselare. Het project werd opgezet om de prevalentie van *Toxocara* in publieke ruimten te onderzoeken en de invloed van het hondenbeleid hierop. Dit eindwerk is als het ware een voorstudie voor dit onderzoek. Hierin zal de optimalisatie van de staalname voor detectie van *Toxocara* eitjes het belangrijkste onderdeel zijn van dit werk.

### 2.2 Centrale probleemstelling en doelstelling

*Toxocara* behoort tot de meest voorkomende parasieten bij hond en kat. Aangezien dit een zoönose is, kan de verspreiding ervan een gevaar voor de mens betekenen. Studies uit het buitenland geven aan dat er potentieel gevaar dreigt op plaatsen waar kinderen, honden en katten samenkomen zoals in een zandbak, stadsparken, enzovoort.

Het einddoel van dit project is om de prevalentie van *Toxocara* in kaart te brengen en zo het hondenbeleid eventueel aan te passen. Dit eindwerk is een voorstudie om de staalname op punt te stellen. Het doel van dit eindwerk is om de staalname procedures van de bodem te optimaliseren om zo *Toxocara* species te determineren en in kaart te kunnen brengen.

### 2.3 Methodiek

Eerst werd een literatuurstudie uitgevoerd naar procedures voor het opsporen van *Toxocara* eitjes op openbare plaatsen. Op basis hiervan werd een studie opgezet in de stad Roeselare, waarbij op verschillende manieren zandstalen werden genomen in zandbakken in speeltuinen. Met behulp van een zeefmethode gevolgd door flotatie en microscopisch onderzoek, werden de stalen onderzocht op aanwezigheid van *Toxocara* eitjes. Positieve stalen werden telkens onderworpen aan een real-time PCR test voor differentiatie tussen *T. canis* en *T. cati*. Aan de hand van de resultaten en ervaringen uit de praktijk kan vervolgens een standaard staalnameprocedure worden opgesteld voor toekomstige studies naar omgevingscontaminatie met *Toxocara* eitjes.

## 3 Literatuurstudie

### 3.1 *Toxocara* spp.<sup>1</sup>

*Toxocara* is een spoelworm die frequent voorkomt bij de hond en de kat. Deze spoelworm leeft als volwassen worm in de dunne darmen van zijn gastheer. De somatische larven ervan leven in diverse weefsels. De parasiet kan zich ook in andere gastheren vestigen zoals knaagdieren, vogels, varkens, de mens, enzovoort. Dit zijn de niet-specifieke gastheren. Hierin zal de parasiet geen volwassen wormen kunnen vormen, maar enkel somatische larven die zich in weefsels begeven.

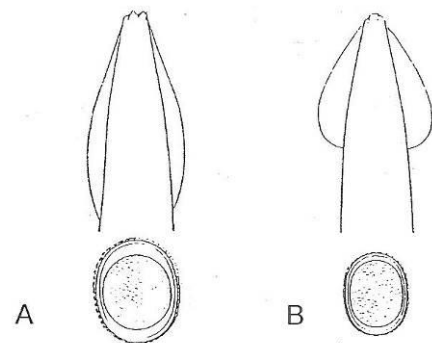
#### 3.1.1 Classificatie<sup>2</sup>

Stam	<i>Nematoda</i>
Klasse	<i>Chromadorea</i>
Orde	<i>Ascaridida</i>
Superfamilie	<i>Ascaridoidea</i>
Familie	<i>Toxocaridae</i>
Genus	<i>Toxocara</i>
Soort	<i>Toxocara canis</i> <i>Toxocara cati</i>

Tabel 1: Classificatie van *Toxocara canis* en *cati*.

#### 3.1.2 Morfologie

Ze zijn ovipaar en kunnen tot 200 000 eieren per dag leggen. De eieren zijn rond, dikwandig en zeer resistent. In een vochtige omgeving kunnen ze jarenlang overleven. De *T. canis* eitjes hebben gemiddelde diameters van 74,8 x 86,0 µm. De *T. cati* eitjes zijn een stuk kleiner met diameters van 62,3 x 72,7 µm<sup>3</sup>. In de eieren ontwikkelt er zich een larve van het tweede larvaal stadium. Volwassen wormen hebben lange grof gestreepte kopvleugels (Figuur 1). De vrouwelijke worm wordt 12 tot 18 cm lang en de mannelijke worm 10 tot 12 cm.



Figuur 1: Kopvleugels en eieren bij *Toxocara canis* (A) en *cati* (B).

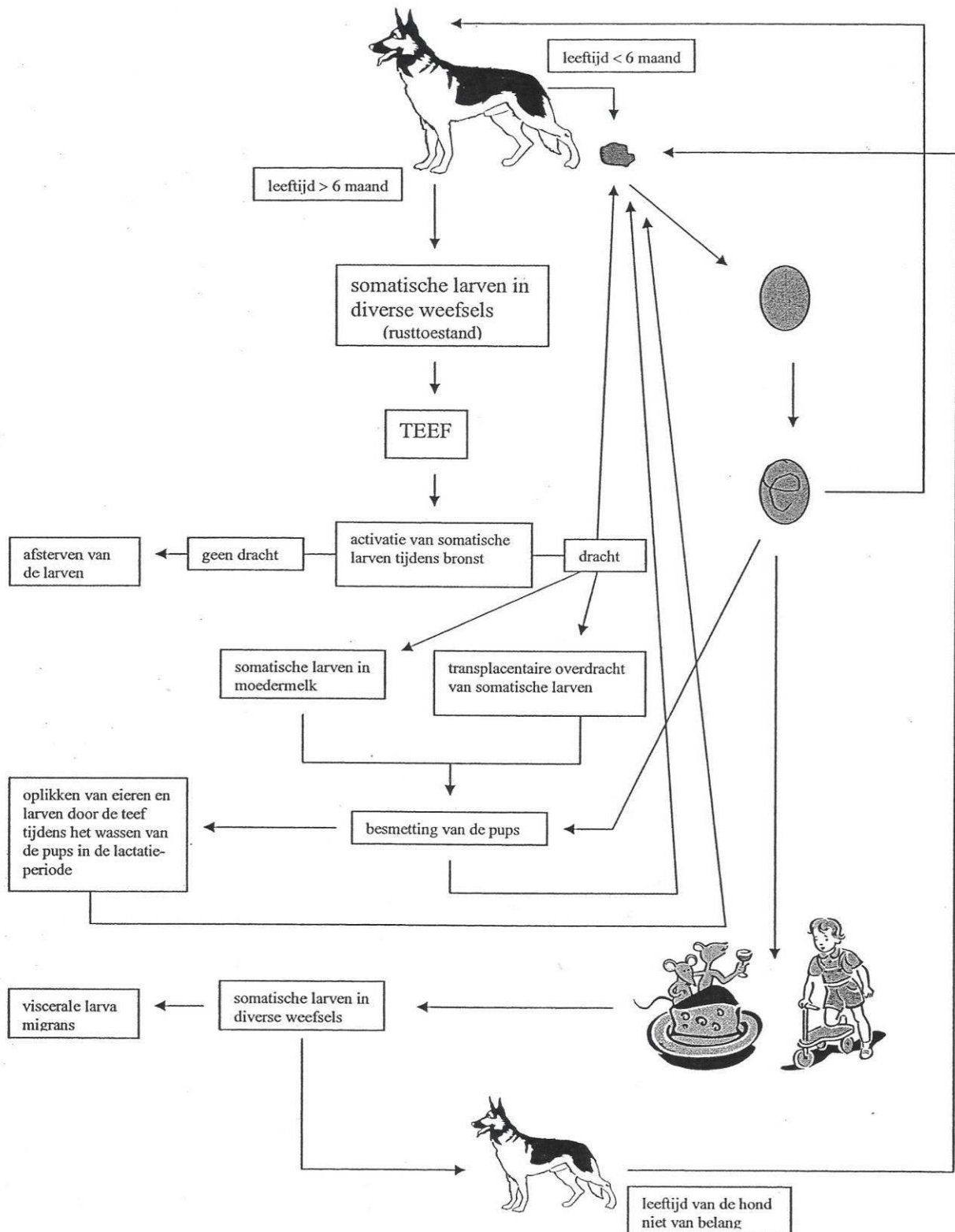
#### 3.1.3 Levenscyclus

In dit stukje wordt enkel de levenscyclus van *Toxocara canis* besproken. Deze is het best gekend en is vrij gelijkaardig met die van *T. cati*. Toch zijn er een aantal verschillen met die van de hondenspoelworm maar deze worden verder in dit hoofdstuk besproken.

<sup>1</sup> Viaene (2011)

<sup>2</sup> NCBI (2014)

<sup>3</sup> Fahrion *et al* (2011)



**Figuur 2: Levenscyclus en transmissie van *Toxocara canis*.**

De cyclus begint met de feco-orale opname door de hond van geëmbryoneerde eitjes die een larve van het tweede larvaal stadium bevatten. De larven komen vrij uit de eitjes in de dunne darm. Vanaf dan beginnen ze aan hun viscerale migratie in het lichaam van de hond. Welke migratie er gevolgd zal worden, is afhankelijk van de leeftijd van de hond, geslacht van de hond of het type gastheer.

### **Honden tot 6 maanden oud**

Bij deze groep honden treedt er voornamelijk lever-long-luchtpijp-migratie op. De larven die vrijkomen in de dunne darm doorboren de darmwand en komen zo in de bloedbaan terecht. Via het bloed gaan ze naar de lever en vervolgens naar de longen. In de longalveolen vervellen de larven. Vanaf dan zijn ze larven van het derde larvaal stadium. Ze migreren dan naar de slokdarm en de keel. De hond hoest ze op en slikt ze terug in. Opnieuw komen de larven in de dunne darm terecht waar ze nog tweemaal vervellen en uitgroeien tot volwassen wormen. Dit gehele proces neemt ongeveer 30 dagen in beslag. Na geslachtelijke voortplanting kunnen de vrouwelijke wormen bevruchte, niet-geëmbryoneerde eieren afscheiden. Via de feces gaan de niet infectieuze eitjes naar de buitenwereld. De embryonerig treedt op in de buitenwereld waardoor ze ook infectieus worden. Na embryonerig en vervelling ontstaat er een larve van het tweede larvaal stadium in het ei. De ontwikkelingsduur hiervan is afhankelijk van verschillende factoren zoals temperatuur, vochtigheid en zuurstofgehalte. Dit duurt minimaal 10 tot 15 dagen.

Hoe ouder de gastheer wordt, hoe groter het deel van de larven van het tweede larvaal stadium die tijdens de lever-long-luchtpijp-migratie niet meer tot in de longblaasjes raken. Deze larven blijven dan in een bepaald weefsel en worden daar ingekapseld. Op dat moment bevinden ze zich in een rusttoestand. Zo kunnen ze nog vele jaren overleven en sterven dan finaal af. Dit wordt de somatische cyclus genoemd.

### **Honden ouder dan 6 maanden**

Bij deze honden komt enkel nog de somatische cyclus voor. De reden hiervoor is dat de longblaasjes bij verouderen minder toegankelijk worden voor de larven.

### **Teven**

Bij de vrouwelijke honden wordt een deel van de somatische larven terug geactiveerd tijdens de bronstperiode. Indien er geen dracht volgt, sterven de geactiveerde larven af. Indien er wel dracht volgt, komen de larven terug in de dunne darm terecht waar ze zullen uitgroeien tot volwassen wormen. Rond de 42<sup>e</sup> dag van dracht zal er opnieuw een deel van de somatische larven geactiveerd worden en vrijkomen in de bloedbaan. Een aantal hiervan zullen de placenta bereiken en zo in de bloedbaan van de foetus terecht komen. In de foetus is er migratie tot de lever. Bij geboorte trekken de larven verder tot de longen en na ophoesting naar de dunne darm. Na vervellingen worden ze volwassen wormen en scheiden ze eieren uit.

Een ander deel van de somatische larven in de teef zullen migreren naar de melkklieren. Via de moedermelk zullen de pups dan besmet worden. Deze overdracht is minder belangrijk dan de transplacentaire overdracht.

Tijdens lactatie ziet men een zeer hoge ei-uitscheiding. Dit komt omdat tijdens het aflikken van de pups, heel wat infectieuze eieren en larven kunnen opgenomen worden. Deze worden door de pups geproduceerd. Deze eieren en larven kunnen tijdens de lactatie wel de lever-long-luchtpijp-migratie afmaken. Bij teven buiten lactatie is dit niet mogelijk. Na lactatieperiode treedt er spontane afdrijving op van de volwassen wormen uit de dunne darm. Ook bij pups van ongeveer twee maanden is er afdrijving.

### **Niet specifieke gastheren**

Als dergelijke gastheren infectieuze *Toxocara canis* eieren van de hond binnenkrijgen, kunnen ze zich niet ontwikkelen tot volwassen wormen, maar gaan ze de somatische cyclus volgen. Hierbij kapselen larven van het tweede larvale stadium zich in in diverse weefsels. Als een hond dergelijk besmet weefsel eet, zullen de larven terug geactiveerd worden. Ze zullen dan de lever-long-luchtpijp-migratie uitvoeren en volwassen worden in de dunne darm. Dit gebeurt onafhankelijk van de leeftijd van de hond.

### ***Toxocara cati*<sup>1</sup>**

Bij de kat is er geen transplacentaire besmetting mogelijk. De kittens zijn dus nog niet besmet bij hun geboorte. Dit gebeurt enkel lactogeen waarbij de larven zich rechtstreeks ontwikkelen in de darmen zonder voorafgaande migratie. Besmetting via paratenische gastheren is belangrijker dan bij de hond. Larven vanuit deze besmette prooidieren ontwikkelen zich ook rechtstreeks in de darmen.

Enkel de larven van oraal opgenomen infectieuze eitjes migreren extra-intestinaal. Zoals bij *T. canis* is dan een tracheale of somatische migratie mogelijk. Na tracheale migratie ontstaat darminfectie. Somatische migratie brengt de larven tot in een spier. Bij dracht worden de somatische larven terug geactiveerd en migreren naar de melkklieren.

Er komt hier geen of minder leeftijdsresistentie voor. De leeftijd van de katten heeft weinig invloed op de migratieweg.

## **3.1.4 Toxocariasis<sup>2</sup>**

Toxocariasis is het geheel van aandoeningen veroorzaakt door *Toxocara* species. De ernst van de aandoening is afhankelijk van de leeftijd, het aantal, de lokalisatie en ontwikkelingsstadium van de aanwezige wormen.

### **3.1.4.1 Ziektebeeld hond**

*T. canis* leidt voornamelijk bij pups tot ernstige symptomen. Afhankelijk van het infectiestadium ziet men symptomen die verband houden met de lever, de longen, de maag en de dunne darm.

Vooraf bij pasgeboren pups kunnen larvaire stadia ernstige letstels veroorzaken. Voor de geboorte bevindt het grootste deel van de larven zich in de lever. Na de geboorte migreren ze via het hart naar de longen. Ze kunnen de alveolen binnendringen via de longcapillairen, wat een pneumonie of longontsteking kan veroorzaken. Van daaruit migreren de larven nog verder via de bronchiën en trachea naar de farynx waar ze ingeslikt kunnen worden. In de maag veroorzaken ze irritatie die ze doen braken. In de tweede of derde levensweek ontstaan de meeste symptomen. De pups hebben een zwakkere conditie, vermageren en hebben buikpijn door de spouelwormen in de darmen. Door darmmeteorisme ontstaat een gezwollen buik, het zogenaamde 'wormbuikje'. Er kan diarree ontstaan door een verhoogde darmperistaltiek, afgewisseld met obstipatie.

Zware infecties zoals hierboven beschreven komen zelden voor. Men ziet vaker een infectie die licht tot middelmatig is en waar de symptomen minder uitgesproken zijn. Men ziet dan vooral een gezwollen abdomen, intermitterende diarree en een lichte groeivertraging.

Bij volwassen honden verloopt dit vaak symptoomloos. Door opname van een groot aantal infectieuze eitjes kunnen allergische reacties en migratieletsels ontstaan ter hoogte van de darm. Dit uit zich in verschillende vormen van gastro-enteritis.

### **3.1.4.2 Ziektebeeld kat**

Klinische toxocariasis is zeldzaam bij de kat. Aangezien er geen transplacentaire overdracht is en geen migratie mogelijk is bij lactogene opname, kunnen enkel symptomen bij kittens gezien worden bij aanwezigheid van volwassen wormen.

Bij zware infecties ziet men vermagering, slijmerige diarree, buikzwellings, braken, haaruitval en een ruw haarkleed.

---

<sup>1</sup> Vandenberghe (2012)

<sup>2</sup> Vandenberghe (2012)

### 3.1.4.3 Ziektebeeld mens

Als de mens een infectieus eitje oraal opneemt, kan men besmet geraken met *Toxocara*. Maar aangezien de mens een doodlopende gastheer is, ondergaan de vrijgekomen larven slechts een migratie. Het migreren van een larve wordt larva migrans genoemd. Bij de mens komen twee vormen voor, namelijk de viscerale en oculaire larva migrans. Bij de eerste vorm bevinden de larven zich in een inwendig orgaan. Dit kan specifieke symptomen geven voor dat bepaalde orgaan. Als de larven zich bijvoorbeeld in de lever bevinden, kan dit algemene malaise en leverfunctiestoornissen veroorzaken. Bij de tweede vorm migreren de larven naar het oog. Hierdoor kunnen acute gezichtsstoornissen optreden.

Meestal verloopt een infectie zonder klinische symptomen, hetzij door massale infectie of doordat één of meer larven op verkeerdelijke plaatsen terechtkomen zoals in het zenuwstelsel of het oog.

Een aantal studies beweren zelf dat er een verband is tussen een *Toxocara* infectie en allergische reacties en astma.

### 3.1.5 Prevalentie *Toxocara*

Deze spoelworm kent een kosmopolitische verspreiding. In West-Europa komt ze vrij frequent voor. De infectiegraad bedraagt er van *T. canis* en *cati* tussen de 3,5 % en 34 % voor *T. canis* (in verschillende omgevingen). Voor *T. cati* varieert deze tussen 8 % en 76 %.<sup>1</sup>

In 2009 werd een studie gedaan naar het voorkomen van darmparasieten in gezinshonden, fokhonden en honden met een gastro-intestinale aandoening in Vlaanderen (Claerebout *et al.*, 2009). Zo'n 4,4 % van de gezinshonden werd positief bevonden op *Toxocara canis*. De besmettingsgraad bij fokhonden ligt een stuk hoger, namelijk 26,3 %. Tenslotte onderzocht men honden met een gastro-intestinale aandoening en in deze onderzoeksgroep had 7,4 % een *Toxocara canis* infectie.<sup>2</sup> Uit deze cijfers blijkt dus dat de hondenspoelworm het meest voorkomt bij de fokhonden.

In een latere studie (2013) werden enterpathogenen onderzocht in pups van dierenwinkels en kennels. Hierbij waren 52 % van de pups positief op *Toxocara canis*.<sup>3</sup>

## 3.2 Detectietechnieken voor *Toxocara* eitjes in bodemstalen<sup>4, 5, 6</sup>

Er bestaan verschillende detectietechnieken en afhankelijk van het doel van het onderzoek kan er voor een bepaalde techniek gekozen worden.

Men kan direct onderzoek verrichten via microscopie. Dit is het direct zichtbaar maken van de ziekteverwekker in preparaten afkomstig van materiaal. Aangezien de *Toxocara* eitjes in bodemstalen weinig geconcentreerd zitten, zal aanrijking aangewezen zijn. Via aanrijkmethode kan men eitjes nog meer concentreren zodat detectie ervan mogelijk wordt. Hieronder worden de belangrijkste aanrijkmethode toegelicht. Men kan deze methoden ook combineren.

---

<sup>1</sup> Overgaauw *et al.* (2013)

<sup>2</sup> Claerebout *et al.* (2009)

<sup>3</sup> Dupont *et al.* (2013)

<sup>4</sup> Viaene (2011)

<sup>5</sup> Vanlerberghe *et al.* (2014)

<sup>6</sup> Vanhee (2013)

Met de sedimentatiemethode of bezinkingsmethode laat men de eitjes bezinken. Hiervoor wordt gewoon leidingwater gebruikt. De eitjes zullen er in bezinken door hun hogere dichtheid. De soortelijke massa van water bedraagt 1 g/cm<sup>3</sup>.

Een andere methode die men kan gebruiken, is de flotatiemethode. Dit is het omgekeerde principe van sedimentatie, namelijk een vloeistof toevoegen die een hogere dichtheid heeft dan die van de eitjes. Hierdoor zullen de eitjes drijven of floteren aan het oppervlak. Er bestaan verschillende flotatievloeistoffen die men kan gebruiken voor nematodeneieren (met een dichtheid vanaf 1,10 à 1,20 g/cm<sup>3</sup>):

- Verzadigde NaCl-oplossing (400 g NaCl in 1 l water): 1,19 g/cm<sup>3</sup> bij 20 °C.
- Verzadigde MgSO<sub>4</sub>-oplossing: 1,28 g/cm<sup>3</sup> bij 15°C.
- NaCl-sucrose-oplossing (300 g NaCl en 200 g sucrose in 1 l water): 1,22 g/cm<sup>3</sup>.
- Suikeroplossing (1280 g kristalsuiker in 1 l leidingwater + 2 ml 37 % formaldehyde): 1,27 g/cm<sup>3</sup> bij 20°C.

Na flotatie kleven de eitjes aan het oppervlak van een dekglasje dat via lichtmicroscopie onderzocht kan worden. Een variant hiervan is de Petriplaatmethode<sup>1</sup>. Hierbij wordt het bezinksel dat men bekomt na sedimentatie in een Petriplaat gebracht waaraan flotatievloeistof wordt toegevoegd. Na flotatie kan de Petriplaat rechtstreeks bekeken worden onder een stereomicroscop.

Via centrifugatie kan men bovenstaande methoden stimuleren. Bij sedimentatie kan centrifugatie zorgen voor het neerslaan van de laatste rondzwevende deeltjes en voor het vormen van een mooie pellet waarin zich de wormeitjes bevinden. Bij flotatie zorgt centrifugatie voor het uitzakken van het sediment naar de bodem maar voor het floteren van de wormeitjes naar het oppervlak.

Men kan een staal ook aanrijken door middel van fractionering. Door het staal over een reeks zeven met afnemende poriediameter te sturen, kunnen de aanwezige wormeieren op de zeef met kleinere poriediameter dan de afmeting van de wormeieren tegengehouden worden, terwijl grotere partikels in het staal op de zeven met grotere poriediameter zullen achterblijven.

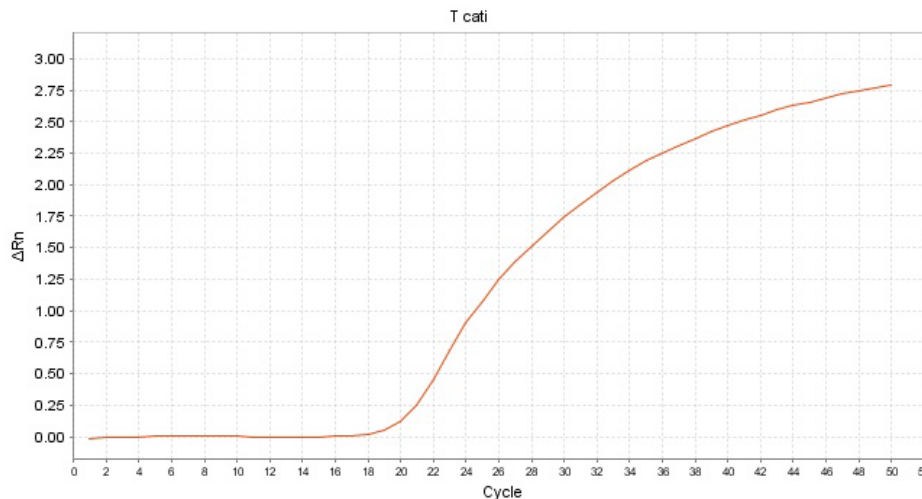
Het voordeel van het bekijken onder een microscoop is dat als de wormeieren duidelijk gezien worden, dit met zekerheid kan gezegd worden. Nadeel is wel dat microscopie niet altijd gemakkelijk is bij wormeieren. Veelal zijn er zaken op het preparaat te vinden die er sterk op lijken (zoals pollenkorrels). Ook kan er via microscopie niet met zekerheid gezegd worden over welk species het gaat. De eitjes van *T. canis* en *cati* zijn quasi gelijk van vorm. Enkel in grootte zit er een klein verschil.

Om met zekerheid te kunnen discrimineren tussen *T. canis* en *T. cati* eitjes, wordt dus best gegrepen naar een andere techniek. Via de PCR techniek, ofwel 'polymerase chain reaction' kan men heel specifiek op zoek gaan naar *Toxocara* eitjes. Hierbij wordt namelijk gezocht naar DNA fragmenten die heel specifiek zijn voor dat organisme. Hiervoor gebruikt men primers. Dit zijn dubbelstrengige startsequenties die ervoor zullen zorgen dat het DNA polymerase specifiek het gewenste DNA fragment zal amplificeren in de PCR. De primers bepalen dus de specificiteit van de PCR reactie.

Aan Vives wordt gebruik gemaakt van een PCR test die werd beschreven door Durant *et al.* (2012). Dit is een real-time PCR test waarbij bovenop de specifieke primers ook gebruik wordt gemaakt van een specifieke probe voor *T. canis* en *T. cati*. Louter op basis van de primers kan immers niet betrouwbaar worden gedifferentieerd tussen de twee species. Een probe is een kort stukje DNA dat complementair is met een DNA sequentie die gelegen is tussen de primersequenties. Deze probe is gelabeld en met behulp van een real-time PCR toestel kan de amplificatie van specifieke DNA fragmenten cyclus per cyclus worden gevisualiseerd (zie onderstaande grafiek).

---

<sup>1</sup> Khazan *et al.* (2012)



**Grafiek 1: Resultaat van de real-time PCR bij een DNA-staal van *T. cati*.**

Het grootste voordeel van de real-time PCR is dat men hiermee heel specifiek op zoek kan gaan naar *T. canis* of *T. cati*. Men kan bovendien ook de hoeveelheid DNA in een staal te weten komen. Het nadeel is wel dat de grondstalen niet altijd rechtstreeks kunnen getest worden via de PCR omwille van lage concentraties aan eitjes en de aanwezigheid van PCR inhibitoren bij rechtstreekse DNA-extractie op zand. In dit onderzoek werd geopteerd om real-time PCR slechts toe te passen na een positief staal vanuit de zeeftechniek. Hoe dit precies wordt aangepakt, wordt verder in dit werk besproken.

### 3.3 Prevalentie van *Toxocara* eitjes in de bodem

*Toxocara* eitjes die uitgescheiden worden via de feces zijn nog niet geëmbryoneerd of infectieus. De eitjes kunnen infectieus worden na 3 weken tot een aantal maanden, afhankelijk van het bodemtype en de omgevingsfactoren zoals temperatuur en vochtigheid. Geëmbryoneerde eitjes kunnen tenminste één jaar levensvatbaar blijven onder optimale omstandigheden. Zo ziet men over heel de wereld hoge bodemcontaminaties voor *Toxocara* (10-30%).<sup>1</sup>

Humane toxocarisis is een gevolg van contaminatie van de bodem met feces van hond, kat of vos die *Toxocara* eitjes bevatten. De combinatie van het feit dat *Toxocara* eitjes zo lang kunnen overleven buiten een gastheer en de hoge productie door volwassen wormen, is verantwoordelijk voor de hoge contaminatie van de bodem met infectieuze eitjes. Deze eitjes worden wereldwijd gevonden in publieke en private plaatsen zoals achtertuinen, landtuinen, parken, zandbakken, tuinen, velden, stranden bij meren en in straten, maar ook in omheinde kindertuinen. De graad van besmetting is gerelateerd aan de hondenpopulatie van dat gebied. Dit is hoger in steden dan in de stadsranden of in landelijk gebied. Aangezien de onderzoeksmethodes om de contaminatie te bepalen nog niet gestandaardiseerd zijn, is het moeilijk om resultaten uit andere landen te vergelijken met elkaar.<sup>2</sup>

Volgende tabel geeft een overzicht van wereldwijde bodemcontaminaties.<sup>3, 4</sup> In deze tabel staan er een aantal zaken die opvallen.

<sup>1</sup> Overgaauw *et al.* (2013)

<sup>2</sup> Holland *et al.* (2006)

<sup>3</sup> Ferre *et al.* (2000)

<sup>4</sup> Holland *et al.* (2006)



De meeste studies uit de tabel werden in Europa uitgevoerd. Dit kan verklaard worden door een hogere bevolkingsdichtheid en hogere ontwikkeling.

Er zijn veel verschillende plaatsen die werden bemonsterd, maar speelplaatsen, stadsparken en zandbakken zijn plaatsen die zeer frequent werden onderzocht. Dit zijn dan ook de hoog risico plaatsen waar hond of kat en kind vaak samen komen.

De meesten hebben centrifugatie en flotatie gebruikt. Voor flotatie zijn er heel wat verschillende flotatievloeistoffen die werden gebruikt. Er zijn er ook een aantal die opteren om ook de zeefmethode toe te passen.

Het aantal positieve stalen varieert van 0 tot 92 %. Zoals al eerder vermeld zijn deze resultaten moeilijk te vergelijken. Allereerst zijn er verschillende detectietechnieken die gebruikt werden. Verder zijn het ook verschillende plaatsen die onderzocht worden met andere grondsoorten enzovoort.

Omdat er wereldwijd zoveel verschillende contaminatiegraden beschreven zijn, wordt een dergelijke studie nu ook in België uitgevoerd. In 2012 werd reeds een beperkte studie uitgevoerd in Brussel<sup>1</sup>. Toen werden 10 parken onderzocht via PCR rechtstreeks op zand, maar werd geen contaminatie waargenomen.

---

<sup>1</sup> Durant *et al.* (2012)

LOCATIE LAND	LOCATIE STAALNAME	AANTAL STAALNAMES	AANTAL POSITIEVE STALEN (%)	DETECTIETECHNIEK	REFERENTIE
Afrika					
Nsukka, Nigeria	grond van een basisschool	11	54,5	?	Emehelu, 1986
Nigeria	grondstalen	100	13	zeven	Chiejina, 1986
Caïro, Egypte	sportclubs, publieke parken	600	30	?	Oteifa en Moustafa, 1997
Amerika					
Montreal, Canada	10 publieke tuinen zandbakken	43 39	33 18	?	Ghadirian, 1976
Kansas, Verenigde Staten	grondstalen rustplaatsen zandbakken	232 50 23	22 16 39	centrifugatie + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Dada, 1979
Essex County, New Jersey	32 publieke parken	629	0,3	centrifugatie + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Surgan, <i>et al.</i> , 1980
Baton Rouge, Louisiana	grondstalen publieke parken privé tuinen	1529 20 30	0,4 20 16,7	?	Smith, 1979
Baltimore, Maryland	grond van privéverblijven	146	11	zeven + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Childs, 1985
Michigan, Verenigde Staten	grondstalen uit 3 publieke parken	114	19	flotatie (NaNO <sub>3</sub> )	Ludlam, 1989
Havana, Cuba	residentiële plaatsen	45	42	flotatie (NaCl)	Dumenigo en Galvez, 1995
Mexico stad, Mexico	publieke en privé tuinen	281	12,5	?	Vasquez <i>et al.</i> , 1996
Sao Paulo, Brazilië	publieke parken	120	17,5	centrifugatie + flotatie	Santarem <i>et al.</i> , 1998
Lima, Peru	10 parken	50	8 parken (1989) 7 parken (1990)	flotatie (NaCl)	Lescano, <i>et al.</i> , 1998
Campo Grande, Brazilië	publieke parken	74	15 parken	flotatie	de Araujo <i>et al.</i> , 1999
Aracatuba, Brazilië	schoolzandbakken	535	0	centrifugatie + flotatie	Nunes <i>et al.</i> , 2000
Buenos Aires, Argentinië	pleinen en publieke plaatsen	242	13,2	centrifugatie + flotatie (glucose)	Fonrouge, <i>et al.</i> , 2000

Santiago, Chili	publieke pleinen en parken	288 fecale stalen	13,5	?	Castillo <i>et al.</i> , 2000
Sorocaba, Brazilië	publieke pleinen	30 pleinen	16 pleinen	flotatie (MgSO <sub>4</sub> en 5% KI)	Coeino <i>et al.</i> , 2001
Resistencia, Argentinië	publieke parken, kindertuinen, zandbakken, woonwijken	475	1,3	?	Alonso <i>et al.</i> , 2001
Curitiba, Brazilië	69 zandbakken	345	9,6	sedimentatie + centrifugatie + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Sprenger <i>et al.</i> , 2014
Australië					
Brisbane, Queensland	publieke parken	266	1,1	?	Boreham, 1982
Melbourne, Victoria	parken	108	1	?	Carden <i>et al.</i> , 2003
Azië					
Madras, India	grondstalen van op de campus van diergeneeskunde	410	6,6	?	Gunaseelan, 1992
Basrah, Irak	publieke plaatsen, scholen	180	12,5	flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Mahdi en Ali, 1993
Japan	zandbakken, elk 4 tot 15 keer bemonsterd	13	92 12/13 parken	centrifugatie + flotatie (glucose)	Uga, 1993
Japan	zandbakken uit publieke parken	24	87,5	zeven + centrifugatie + flotatie (NaNO <sub>3</sub> )	Shimizu, 1993
	zandbakken uit scholen of kinderopvangen	22	36,4		
Nouméa, Nieuw-Caledonië	zones waarvan aarde en gras	12	50 en 11/12 zones	zeven + sedimentatie + flotatie (MgSO <sub>4</sub> ) + HKI	Beugnet, 1993
Surabaya, Indonesië	parken	223	17	?	Uga <i>et al.</i> , 1995
Kuala Lumpur, Malaysia	parken, achterbuurten	89	1	?	Uga <i>et al.</i> , 1996
Osaka, Japan	zandbakken in stadsparken	40	75	zeven	Abe, 1997
Songkhla, Thailand	landelijke dorpen	102	19	centrifugatie + flotatie (glucose)	Uga <i>et al.</i> , 1997

Petaling Jaya, Serdang, Maleisië	grondstalen in 26 stadsparken	44	54,5	centrifugatie + flotatie (NaCl)	Loh en Israf, 1998
	grondstalen in 22 buiten stedelijke parken	48	45,8		
Kathmandu, Nepal	straten in de stad	122	23	centrifugatie + flotatie (glucose)	Rai <i>et al.</i> , 2000
Teheran, Iran	120 parken	600	10	zeven + flotatie + Petri plaat methode	Khazan, <i>et al.</i> , 2012
Europa					
Groot-Brittannië	publieke parken	800	24,4	?	Borg, 1974
Londen, Engeland	grondstalen	5200	5,2	?	Pegg, 1974
Londen, Engeland	grondstalen van een Greyhound fokkerij	12	92 (11/12)	?	Jacobs, 1977
Ecosse, Frankrijk	grondstalen van publieke en privé tuinen	234	11,1	flotatie (MgSO <sub>4</sub> + KI)	Quinn, 1980
Parijs, Frankrijk	grondstalen van 18 publieke parken	28	50 % stalen 61 % parken	centrifugatie + flotatie zeven + flotatie (NaCl)	Laborde, 1980
Praag, Tsjechië	zandbakken	50	18	?	Valkounova, 1982
Vienne, Frankrijk	grondstalen	334	5,7	?	Kasieczka, 1982
	zandstalen	137	2,9		
München, Duitsland	160 zandbakken	480	12,7	?	Deumer, 1984
Marseille, Frankrijk	13 zandbakken	75	36	?	Gasquet, 1986
Londen, Engeland	grondstalen in 5 parken	503	66	flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Snow, 1987
Angers, Frankrijk	8 speelplaatsen in stadstuinen	58	12,5	?	Chabasse, 1988
Lyon, Frankrijk	zandbakken	5	60	centrifugatie + flotatie (KHgl) + centrifugatie	Doucet, 1989
Palerme, Italië	grondstalen van publieke parken	122	79,5	zeven + centrifugatie + flotatie	Virga, 1989
	grondstalen van familietuinen	26	38	centrifugatie + flotatie	
Dublin, Ierland	parken, tuinen	53	6	?	Holland <i>et al.</i> , 1991

Londen, Verenigd Koninkrijk	parken, tuinen	520	6,30	flotatie (MgSO <sub>4</sub> )	Gillespie <i>et al.</i> , 1991
Praag, Tsjechië	Bemestingsbehandeling planten	3	12-47 eitjes/100 g slik	?	Horak, 1992
Utrecht, Nederland	parken, zandbakken	108	7	zeven + centrifugatie+ flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Jansen <i>et al.</i> , 1993
Dublin, Ierland	publieke speeltuinen	228	15	?	O'Lorcain, 1994
Tenerife, Spanje	grondstalen in speelplaatsen	54	37	OMS modificatie methode	Toledo, 1994
Toulouse, Frankrijk	grondstalen van 10 speelplaatsen	30	40	OMS methode: zeven + flotatie (MgSO <sub>4</sub> )	El Hassan, 1995
Reykjavik, IJsland	speelplaatsen	32	13	flotatie (NaCl)	Skimisson en Smaradottir, 1996
Lublin regio, Polen	achtertuinten, speelplaatsen, zandbakken, straten	273	36	?	Gundlach <i>et al.</i> , 1996
Poznan regio, Polen	achtertuinten, stranden, tuinen, parken, speelplaatsen, wijken	534	10	?	Mizgajska, 1997
Warnemünde, Duitsland	strandzand	126	2	?	Schottler, 1997
Wroclaw, Polen	achtertuinten	100	6	?	Mizgajska, 1999
Centraal Italië	publieke speelparken	22	12 speelparken	?	Giacometti <i>et al.</i> , 1999
Cracow regio, Polen (steden en dorpen)	achtertuinten, recreatie gebieden, straten	160	23	?	Mizgajska, 2000
Ancona, Italië	speelplaatsen	22	14 speelplaatsen	zeven + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Giacometti <i>et al.</i> , 2000
Ankara, Turkije	publieke parken	170	30,6	?	Oge, 2000
Elblag, Polen	achtertuinten, speelplaatsen	72	14	?	Jarosz, 2001
Easter, Spanje	publieke parken	644	1,2	?	Ruiz de Ybanez <i>et al.</i> , 2001
Marche regio, Italië	6 parken boerderij erf	34 120	24 52,7 % boerderijen	zeven + centrifugatie + flotatie (glucose NaNO <sub>3</sub> )	Habluetzel <i>et al.</i> , 2003

Praag, Tsjechië	stadsparken, achtertuinten, zandbakken, landelijke gebieden, asielen (landelijk)	49 20 126 30 20	20,4 45 11,9 5 10	flotatie (NaNO <sub>3</sub> )	Dubná, <i>et al.</i> , 2006
Lodz, Polen	speeltuinen zandbakken schoolsportvelden	168 144 216	7,74 1,39 12,04	flotatie (NaNO <sub>3</sub> )	Blaszkowska <i>et al.</i> , 2012
Brussel, België	speeltuinen en zandbakken	10	0	Real-time PCR	Durant <i>et al.</i> (2012)

**Tabel 2: Wereldwijde bodemcontaminatie van *Toxocara* spp. eitjes, gesorteerd volgens continent en referentiejaar.**

## 3.4 Staalnameprocedure<sup>1</sup>

In dit hoofdstuk zullen een reeks parameters en beïnvloedende factoren worden besproken. Hiermee dient men rekening te houden bij staalnames voor detectie van *Toxocara* eitjes in de bodem.

### 3.4.1 Staalnamelocaties

#### 3.4.1.1 Studiegebied

Voor de studie moet een bepaald gebied afgebakend worden dat zal worden onderzocht. Deze studie zal in België plaatsvinden en specifiek in Roeselare in Vlaanderen. Hierbij zal de relatie kunnen gelegd worden met de afgelopen studie<sup>2</sup> rond het hondenbeleid. Hierin werd de hondenpoepproblematiek in verschillende gemeenten in Vlaanderen eens onder de loep genomen. Ook werd gekeken welke wetgeving er is voorzien rond honden, met andere woorden welk hondenbeleid ze voorzien. Men zag veel verschil in aanpak tussen verschillende gemeentes. In dit onderzoek concludeerde men dat er moet gestreefd worden naar een zelfde duidelijke aanpak vanuit de gemeenten en dat er een mentaliteitsverandering moet komen bij de bevolking. Het hondenbeleid wordt verder in dit hoofdstuk nog meer uitgewerkt.

Men kan ook rekening houden met de hondenpopulatie. Eén op vier huishoudens in Vlaanderen heeft één of meerdere honden en één op vier heeft één of meerdere katten. In totaal zijn er 570 000 honden en 883 000 katten in Vlaanderen.<sup>3</sup>

Er kan een onderscheid worden gemaakt tussen het onderzoeken in een provincie of een stad. De meeste studies worden gedaan in de stad. Dit kan te wijten zijn aan de hogere dichtheden van honden, katten en mensen. Hierdoor zal de besmettingsgraad vermoedelijk hoger liggen. Men kan dus ook onderscheid maken tussen stedelijk en landelijk gebied.

#### 3.4.1.2 Locatie

Verschillende plaatsen kunnen onderzocht worden. Belangrijk is dat op de onderzochte plaatsen honden en katten kunnen komen en dat er potentieel gevaar is voor de bevolking (voornamelijk voor kinderen). In studies uit het buitenland werden verschillende plaatsen onderzocht.

In Utrecht<sup>4</sup> werd de keuze van de parken gemaakt op basis van de gegevens van de reinigings-, markt-, en havendienst. Men koos daarbij parken uit verschillende categorieën waaronder parken en groenzones toegankelijk voor loslopende honden, verboden voor honden en toegankelijk voor aangelijnde honden. Alle speelweiden die werden bemonsterd zijn verboden voor honden. Er werd ook extra gelet op het feit dat er stalen werden genomen in het centrum van de stad en in de buitenwijken. Er werd een inventariserend onderzoek uitgevoerd door in elk park 3 fecesmonsters, 3 gras- en 3 grondmonsters te nemen. In elk van de categorieën werd een uitvoeriger onderzoek gedaan van 6 fecesmonsters, 15 grond- en 15 grasmonsters. Men maakte gebruik van een directe centrifuge flotatiemethode met een ZnSO<sub>4</sub> oplossing.

In onderstaande tabel werden enkel de gegevens van de grond- en grasmonsters weergegeven omdat deze het meest relevant zijn voor deze studie. Hierin zien we de hoogste prevalentie in grondstalen. Daarbij zijn de speelweides het meest gecontamineerd. Bij de grasstalen is de contaminatie het grootst bij plaatsen die verboden zijn voor honden.

---

<sup>1</sup> Holland *et al.* (2006)

<sup>2</sup> Vandenberghe *et al.* (2010)

<sup>3</sup> Vandenberghe *et al.* (2010)

<sup>4</sup> Jansen *et al.* (1993)

Categorie	Grond (% positief)	Gras (% positief)
loslopende honden	5	0
honden verboden	12	9
aangelijnde honden	13	7
speelweide	17	0
<b>TOTAAL</b>	<b>11</b>	<b>5</b>

Tabel 3: Percentages van positieve grond- en grasstalen met *T. canis* eitjes in parken verdeeld in verschillende categorieën (Utrecht).

De zandbakken werden gekozen op basis van een lijst verkregen door de Dienst voor Ruimtelijke Ordening van de stad Utrecht. Er werd willekeurig bemonsterd in de hele stad, er op lettend om in alle stadswijken te komen. Men keek ook naar de data van de zandvervangings- en bij bemonstering lette men op de verzorgingsstaat. Dit deelde men arbitrair in, in klassen goed, redelijk of slecht. Ten slotte lette men op een eventuele afsluiting van de zandbak. Per zandbak werden 2 monsters genomen.

In onderstaande tabel ziet men dat de categorieën redelijk, slecht en afgesloten dicht bij elkaar liggen qua contaminatie. De zandbakken in goede staat vertonen het minste contaminatie. De slecht verzorgde zandbakken hebben de hoogste contaminatiegraad, maar de afgesloten zandbakken hebben ook een opvallend hoog percentage, voornamelijk veroorzaakt door katten.

Staat	N	Ondiep		Diep	
		<i>T. cati</i> (%)	<i>T. canis</i> (%)	<i>T. cati</i> (%)	<i>T. canis</i> (%)
Goed	12	0	0	33	0
Redelijk	26	27	8	50	8
Slecht	16	31	6	63	6
Afgesloten	7	43	0	43	14
<b>TOTAAL</b>	<b>61</b>	<b>25</b>	<b>5</b>	<b>49</b>	<b>7</b>

Tabel 4: Aantallen en percentages positieve stalen met *T. cati* en *canis* eitjes in zandbakken verdeeld naar verzorgingsgraad en diepte. (N = totaal aantal stalen) (Utrecht).

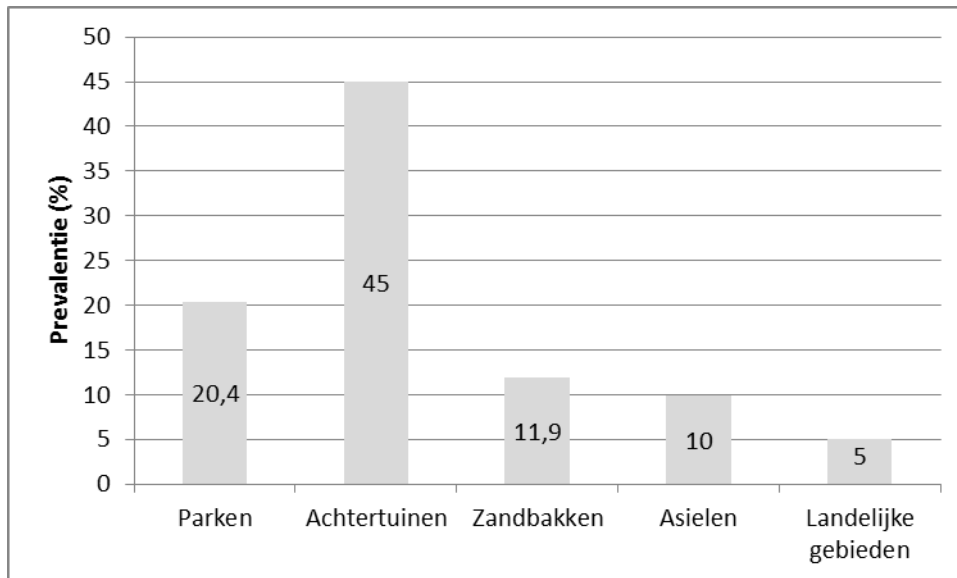
Een ander voorbeeld uit Polen wordt gegeven in volgende tabel. Hier werd onderzocht op welke locatie de meeste contaminatie voorkwam. Dit blijkt in achtertuinen te zijn en daar op volgend in parken en straten en wegen.

Locatie	Aantal staalnames	% positieve stalen	Eitjes/100 g bodem
Achtere tuinen	549	17,3	6,4
Parken	284	8,5	4,9
Straten en wegen	84	6,0	6,0
Speelplaatsen en sportvelden	270	1,5	3,8
Zandbakken	144	4,2	6,3
Stranden	175	2,9	5,0
<b>TOTAAL</b>	<b>1501</b>	<b>9,3</b>	<b>6,0</b>



**Tabel 5: Voorkomen van *Toxocara* spp. eitjes in bodemstalen in Polen (Mizgajska, 2001).**

In Praag<sup>1</sup> werden ook verschillende plaatsen bemonsterd. Onderstaande grafiek geeft aan dat de achtertuinen het meest gecontamineerd zijn. Daarna volgen chronologisch parken, zandbakken, asielen en landelijke gebieden. Men maakte gebruik van flotatie in een NaNO<sub>3</sub> oplossing.

**Grafiek 2: Prevalentie van *Toxocara* eitjes in de bodem van parken, achtertuinen, zandbakken, asielen en landelijke gebieden in Praag.**

In Polen<sup>2</sup> werd een vergelijkende studie uitgevoerd. Er werden stalen genomen in speeltuinen, zandbakken en sportvelden van scholen op twee tijdstippen. Ze maakten gebruik van de flotatiemethode (NaNO<sub>3</sub>). Er werd ook een onderscheid gemaakt tussen omheinde, niet omheinde en deels omheinde plaatsen. Als laatste werd er ook nog een onderscheid gemaakt tussen oppervlakkige (0 – 3 cm) en diepe (15 cm) staalname. Uit de resultaten blijkt dat de schoolsportvelden het hoogste percentage positieve stalen hebben. Daarna volgen speeltuinen en zandbakken.

	jaar	O/NO/DO	aantal positieve stalen (%)	oppervlakkig	diep
speeltuinen	2010	O	5 (10,4)	4	1
		NO	1 (2,8)	1	0
	2011	O	3 (6,25)	3	1
		NO	4 (11,1)	2	1
	<b>Totaal</b>		<b>13 (7,7)</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
zandbakken	2010	O	1 (1,4)	1	0
	2011	O	1 (1,4)	0	1
		<b>Totaal</b>	<b>2 (1,4)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
sportvelden	2010	DO	12 (20)	7	1
		NO	1 (2,1)	0	1

<sup>1</sup> Dubná *et al.* (2006)

<sup>2</sup> Blaszkowska *et al.* (2013)

	2011	DO	10 (16,7)	8	5
		NO	11 (22,9)	3	1
	<b>Totaal</b>		<b>34 (15,7)</b>	<b>18</b>	<b>8</b>
<b>TOTAAL</b>			<b>49 (9,3)</b>	<b>29</b>	<b>12</b>

**Tabel 6: Vergelijkende studie in Lodz, Polen in herfst 2010 en lente 2011 (O = omheind, NO = niet omheind, DO = deels omheind).**

Uit deze vijf verschillende studies blijkt dus dat algemeen gesteld achtertuinen, parken en zandbakken locaties zijn die mogelijks een hogere contaminatie vertonen. Dit zijn ook plaatsen die het meest kans maken op overdracht naar kinderen toe.

### 3.4.1.3 Bodemsoort

In voorgaand hoofdstukje werd een overzicht gegeven van de plaatsen waar men in buitenlandse studies staalnames heeft genomen. Die plaatsen zijn gerelateerd aan een bodemsoort.

In een stadspark vindt men overwegend grasbegroeiing op aarde. In een zandbak is het vanzelfsprekend dat men het zand onderzoekt. Op een boerderij erf wordt ook de aarde onderzocht. In een tuin is meer variatie mogelijk. Men kan hierin namelijk ook bijvoorbeeld de losse aarde in een bloemenperk onderzoeken.

Men zag in Utrecht<sup>1</sup> (zie Tabel 3) een hoger percentage contaminatie in grondstalen dan in grasstalen. In Maryland<sup>2</sup> maakte men een onderscheid tussen groenten- en bloementuinen en plaatsen bedekt met aarde of gras. In groenten- en bloementuinen werden eitjes gevonden in 15 % van de stalen en op plaatsen bedekt met aarde of gras werden ze gevonden in 3,8 % van de stalen.

Een andere studie in Polen (zie Tabel 5) toonde aan dat er een hogere contaminatiegraad te vinden is in achtertuinen en parken ten opzichte van bijvoorbeeld zandbakken en stranden. De vergelijkende studie in Polen<sup>3</sup> (zie Tabel 6) gaf ook meer contaminatie aan op sportvelden en speeltuinen dan in zandbakken. De studie in Praag<sup>4</sup> (zie Grafiek 2) bevestigt deze studies en toont aan dat er meer *Toxocara* eitjes te vinden zijn in achtertuinen en parken dan in zandbakken.

Ondanks dat bepaalde eigenschappen van de bodemsoort zoals vochtigheid, oxygenatie en dichtheid, het overleven van de eitjes kan beïnvloeden, ziet men geen onmiddellijke correlatie tussen de bodemtextuur (percentage grind, zand, klei en slib) en het voorkomen van de eitjes.

Men moet hier wel praktisch rekening mee houden. De techniek waarmee je de eitjes uit de bodem haalt, moet hierop aangepast zijn.

### 3.4.1.4 Staalnamepatroon

Men kan hiervoor specifieke patronen volgen of rekening houden met bepaalde factoren zoals blootstelling aan zonlicht, landschapsvorm, grondstructuur en bevuiling. Daarbij kan men stalen nemen van verschillende plaatsen en apart onderzoeken of mixen tot één geheel voor een bepaalde plek.

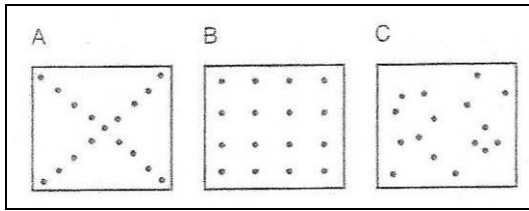
Ook kan men volgens een bepaald patroon stalen nemen. Onderstaande figuur geeft drie voorbeelden aan.

<sup>1</sup> Jansen *et al.* (1993)

<sup>2</sup> Childs (1985)

<sup>3</sup> Blaszkowska *et al.* (2013)

<sup>4</sup> Dubná *et al.* (2006)



**Figuur 3: Staalname patronen, A transversaal, B uniform of gelijkmatig, C willekeurig.**

### 3.4.2 Diepte

Tussen 1980 en 1982 werd een studie uitgevoerd om de invloed van de diepte van staalname na te gaan (Mizgajska, 1998). Hierbij werden 200 grondstalen genomen uit 2 lagen, namelijk 0-5 cm en 6-10 cm diep. Men zag dat de eitjes 4 keer meer voorkwamen in de bovenste laag in vergelijking met de onderste laag. Men verkreeg gelijkaardige resultaten in 1993 door Uga. Daar werd het voorkomen van eitjes bekeken op verschillende dieptes in een zandbak. *Toxocara* spp. eitjes kwamen 7 keer meer voor in de eerste 3 cm in vergelijking met de laag van 15-18 cm en 35-38 cm.

Diepte (cm)	<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
0-1	93,8 %	99,6 %
1-2	5,7 %	0,4 %
2-3	0,5 %	0
3-6	0	0
	<b>n = 407</b>	<b>n = 232</b>

**Tabel 7: Verdeling van *T. canis* en *cati* eitjes in een bodem van los zand, 1 jaar na experimentele contaminatie ervan met 35 000 eitjes (Mizgajska, 1998).**

In Tabel 4 worden de resultaten van de studie in Utrecht<sup>1</sup> weergegeven. Er wordt hier onderscheid gemaakt tussen diepe (50 cm) en ondiepe (0 – 5 cm) zandstalen. Gemiddeld is een kwart van de stalen positief voor *T. cati* eitjes in ondiepe stalen en de helft positief in diepe stalen. Het aantal positieve stalen ligt bij *T. canis* veel lager, respectievelijk 3 en 4 stalen. Voor beide species vindt men meer eitjes in diep genomen staaltjes dan in ondiep genomen stalen. Dit wordt verklaard door de uitspoeling van de eitjes door regenwater.

Uit de resultaten van een vergelijkende studie uit Polen<sup>2</sup> (zie Tabel 6) blijkt dat de oppervlakkig genomen stalen (0 – 3 cm) een hogere contaminatie vertonen dan diep genomen stalen (15 cm).

In onderstaande tabel worden een aantal studies met elkaar vergeleken op basis van diepte van staalname.

<sup>1</sup> Jansen *et al.* (1993)

<sup>2</sup> Blaszkowska *et al.* (2013)

Diepte	Plaats	Bodemsoort	Hoeveelheid	Labotechniek	% positief	Bron
Bovenste laag	New Jersey	Aarde	?	centrifugatie + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	0,3 %	Surgan <i>et al.</i> , 1980
	Maryland	Aarde	250 g	zeven + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	11 %	Childs, 1985
	Peru	Aarde	250 g	flotatie (NaCl)	8/10 (1989) 7/10 (1990)	Lescano, <i>et al.</i> , 1998
5 cm	Praag	Aarde + zand	100 g aarde 100 g zand	flotatie (NaNO <sub>3</sub> )	20,1 % <sup>1</sup> 11,9 %	Dubná, <i>et al.</i> , 2006
5 – 15 cm	Japan	Zand	2 kg	zeven	75 %	Abe, 1997

Tabel 8: Vergelijking resultaten van studies op verschillende dieptes.

Deze studies geven tegenstrijdige resultaten indien men ze vergelijkt op basis van diepte. De studies verschillen op vele vlakken zoals staalnameprocedure, detectiemethode, grondsoort enzovoort, waardoor ze moeilijk te vergelijken zijn. Om toch een algemeen besluit te trekken, kan gezegd worden dat de meeste studies contaminatie in de toplaag aangeven. Een bijkomstig argument voor staalname in de toplaag is dat de kans groter is op contact met kinderen.

### 3.4.3 Aantal en volume

Het aantal stalen en het volume van een staal is belangrijk om de resultaten representatief weer te geven. Het volume zal afhangen van de detectietechniek die gebruikt wordt om de eitjes uit de bodem te halen. En om tot een bepaald volume te komen, wordt een bepaald aantal stalen genomen. Indien de stalen worden gepoold tot één staal maakt dit niet uit, aangezien er vanuit dat gemengd staal een bepaald volume wordt genomen.

Onderstaande tabel geeft een vergelijking van een aantal studies naar aantal eitjes per volume.

	Bodem	aantal eitjes	aantal gram	Detectietechniek	Bron
Japan	zand	1-2300	250	zeven	Abe, 1997
Maryland	aarde	1-14	2	zeven + flotatie (ZnSO <sub>4</sub> )	Childs, 1985
Praag	aarde	6,2	100	flotatie (NaNO <sub>3</sub> )	Dubná, <i>et al.</i> , 2006
	zand	2-22	100		
Iran	aarde	1-3	500	zeven + flotatie + Petri plaat methode	Khazan, <i>et al.</i> , 2012
Italië	aarde	0,2-3,6	100	zeven + centrifugatie + flotatie (glucose NaNO <sub>3</sub> )	Habluetzel <i>et al.</i> , 2003

Tabel 9: Vergelijking studies naar aantal eitjes per aantal gram.

De meeste studies onderzoeken 100 g van hun bodemstaal. Het is ook duidelijk dat een groter volume van het staal niet altijd een hogere contaminatiegraad vertoont.

<sup>1</sup> 20,1 % is de gemiddelde contaminatiegraad in parken (20,4 %), achtertuinen (45 %), asielen (10 %) en landelijke gebieden (5 %).

### 3.4.4 Beïnvloedende factoren

#### 3.4.4.1 Regenval en aardwormen

Storey en Philips (1985) waren de eersten die zorgden voor experimentele data over de penetratie van geohelminthische eitjes in de bodem. Ze stelden vast dat *Ascaris* sp. eitjes neerslaan op het bodemoppervlak waarna ze penetreren en zich verspreiden door het regenwater.

Mizgajska (2001) vergeleek het penetratievermogen van *T. canis*, *T. cati* en *A. suum* eitjes in los zand onder natuurlijke omstandigheden. Na 1 jaar werden eitjes van de 3 soorten alleen gevonden tot op een diepte van 3 cm (zie Tabel 7). Aardwormen kunnen levende *Toxocara* eitjes met zich meedragen vanuit diepere lagen naar het oppervlak toe. Daar kunnen ze die houden voor tenminste 1 jaar (Mizgajska, 1997). Het is van weinig belang dat de aardwormen een toevallige gastheer zijn van *Toxocara* en deze eitjes zou opnemen. De aardwormen zijn namelijk een belangrijke voedselbron van vele kleine zoogdieren (Pahari en Sasmal, 1991; Dubinsky *et al.*, 1995). Naast de aardworm, zouden ook kakkerlakken (*Periplaneta fuliginosa*) een belangrijke vector zijn. Kakkerlakken zouden *Toxocara* eitjes opnemen en terug uitscheiden in hun feces in de komende 2 dagen (Takahashi, *et al.*, 1990).

Regenval speelt een belangrijke rol in de horizontale verspreiding van *Toxocara* spp. eitjes doorheen de bodem. De eitjes in een park vertoonden significante verspreiding na hevige regenval (neerslag van de voorafgaande dag bedroeg 30 mm of meer). Dit fenomeen werd niet waargenomen in zandbakken (Uga, niet gepubliceerde data).

#### 3.4.4.2 Seizoen

De graad van bodemcontaminatie met *Toxocara* spp. eitjes werd bestudeerd in Poznan (Polen) tijdens verschillende seizoenen (Mizgajska, 1998). Hieruit bleek dat de bodemcontaminatie hoger is in de lente dan in de herfst. Dit kan te wijten zijn aan de reproductieve periode van de definitieve gastheer, de hogere activiteit van de bodem bewonende organismen en de fysische destructie van eitjes bij hoge temperaturen en zonneschijn tijdens de zomer.

Latere observaties onderzochten veranderingen van contaminatie tijdens een jaar. Elke maand werden identieke volumes en hoeveelheden bodemstalen genomen van dezelfde plaatsen in 6 achtertuinen. Er waren eitjes te vinden in elk bodemstaal met een gemiddeld voorkomen van 16,7 - 47,7 %. Er werden 3 pieken waargenomen, namelijk in de maanden december, juni en augustus. Het laagste voorkomen vond men in de maand juli gevolgd door mei. (Mizgajska, 2004).

In Japan werd het aantal geëmbryoneerde *Toxocara* spp. eitjes uit zandbakken gemeten. Hieruit bleek dat het aantal het hoogst ligt in de herfst (september tot november) en het laagst in de winter (december tot februari) (Uga, 1993).

Opnieuw is het ook hier moeilijk om een besluit te trekken uit de verschillende studies. De eerste twee onderzoeken uit Polen geven tegenstrijdige resultaten, maar ze zijn uitgevoerd op dezelfde plek en door dezelfde auteur. Daardoor lijkt de recentere studie betrouwbaarder. Dus in achtertuinen blijkt de contaminatiegraad het hoogst in december, juni en augustus. De laatste studie in Japan geeft aan dat de contaminatiegraad in zandbakken het hoogste ligt in de herfst.

#### 3.4.4.3 Hondenbeleid<sup>1</sup>

In België worden veel huisdieren gehouden. Op die manier kunnen bepaalde darmparasieten uit de uitwerpselen in de omgeving verspreid worden. Naast de risico's vormt hondenpoep ook een storend element in de maatschappij. Om die overlast in te perken, worden maatregelen genomen vanuit de gemeentes en steden.

---

<sup>1</sup> Vandenberghe *et al.* (2010)

Steden en gemeenten hebben een aantal bepalingen inzake honden en hondenpoep ingebracht in hun gemeentelijke politieverordening. Dit verschilt sterk van gemeente tot gemeente afhankelijk van de mate van overlast. Dit kan gaan van gratis poepzakjes tot verbodsbepalingen van honden in parken. De kleine overlastproblemen kunnen in de gemeenten ook worden opgelost door de invoering van de gemeentelijke administratieve sancties (GAS). De GAS-ambtenaren zijn gemeenschapswachters die de bevoegdheid hebben om vaststellingen te doen. Deze wachters sensibiliseren de mensen op openbare plaatsen. Bij overtredingen kunnen administratieve sancties opgelegd worden, bijvoorbeeld bij het niet onmiddellijk opruimen van hondenpoep. Men kan ook een sanctie krijgen als men de hond niet aanlijnt op plaatsen waar dit verplicht is of als men geen poepzakje bijheeft.

In Vlaanderen werd reeds een rapport opgesteld om de hondenpoepproblematiek en het hondenbeleid in steden en gemeenten weer te geven.<sup>1</sup>

#### 3.4.4.4 Toegankelijkheid

In een studie in Japan in Osaka City<sup>2</sup> werd de prevalentie van eitjes in zandbakken van stadsparken onderzocht en de invloed van een omheining op de contaminatie. Men zag dat een omheining een lagere contaminatiegraad had maar dat deze maatregel niet effectief is om contaminatie te voorkomen.

Men heeft in Utrecht<sup>3</sup> ook gekeken naar de toegankelijkheid in parken (zie Tabel 3). Bij de grondstalen zijn de speelweides die verboden zijn voor honden het meest gecontamineerd. Daarna volgen de plaatsen die toegankelijk zijn voor aangelijnde honden en verboden voor honden. Bij de grasstalen is de contaminatie het grootst bij plaatsen die verboden zijn voor honden. Daarna volgen de plaatsen voor aangelijnde honden. Hieruit blijkt dus dat de parken die voor honden verboden zijn evenzeer besmet zijn als parken die wel honden toelaten. Men kan dit verklaren doordat bepaalde parken die een verbod opleggen zelden voorzien zijn van verbodsborden. En de parken die hier wel van voorzien zijn, hebben weinig effect. Tijdens de staalnames werden regelmatig honden waargenomen in deze parken.

In de vergelijkingsstudie van Lodz in Polen<sup>4</sup> (zie Tabel 6) werden speeltuinen, zandbakken en sportvelden bemonsterd die omheind, deels omheind of niet omheind waren. De omheinde speeltuinen vertonen een hogere contaminatiegraad dan de niet omheinde. De bemonsterde zandbakken waren omheind en vertoonden ook contaminatie. De deels omheinde sportvelden vertonen meer contaminatie dan de niet omheinde. Uit deze cijfers blijkt dus dat omheining weinig of geen effect heeft op de contaminatie. Een hypothese voor dit verschijnsel kan zijn dat de plaatsen waar geen honden kunnen komen juist meer door katten worden bezocht.

Uit al deze studies blijkt dus dat de maatregelen die men neemt op gebied van toegankelijkheid voor honden weinig effect hebben op de contaminatiegraad, hetzij omdat de maatregelen te beperkt zijn of omdat katten de oorzaak zijn van de contaminatie.

---

<sup>1</sup> Vandenberghe *et al.* (2010)

<sup>2</sup> Abe & Yasukawa (1997)

<sup>3</sup> Jansen *et al.* (1993)

<sup>4</sup> Blaszkowska *et al.* (2013)

#### 3.4.4.5 Verzorgingsstaat zandbakken

Opnieuw in Utrecht<sup>1</sup> werd gekeken of de verzorgingsstaat van zandbakken invloed heeft op de contaminatie (zie Tabel 4).

Het lijkt er op dat goed verzorgde zandbakken minder verontreiniging vertonen met *Toxocara* eitjes dan slecht verzorgde. De verzorgde en min of meer afgesloten zandbakken bevatten slechts bij uitzondering *T. canis* eitjes, terwijl *T. cati* hierin vaker voorkomt.

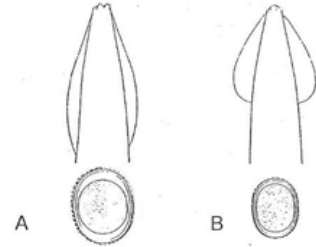
---

<sup>1</sup> Jansen *et al.* (1993)

## 4 Materiaal en methode

### 4.1 Isolatie eitjes uit *Toxocara* wormen

- Bekijk de spoelwormen en differentieer volgens geslacht. Vrouwtjes zijn groter en breder dan mannetjes. Gebruik enkel de vrouwelijke wormen die beduidend groter zijn dan de rest.
- Leg de gekozen wormen individueel op een petriplaat en bekijk onder een stereomicroscop. Differentieer volgens species (*Toxocara canis* of *cati*) aan de hand van de kopvleugels. De hondenspoelworm heeft lange smalle kopvleugels in tegenstelling tot de kattenspoelworm die eerder korte en brede kopvleugels heeft.
- Snij de wormen in fijne stukjes met een schaar of scalpel.
- Voeg leidingwater toe en doe in een 50 ml falcon (eventueel met behulp van een trechter).
- Knijp de stukjes worm dicht met een pincet zodat ze 'gecrusht' worden en de eitjes vrijkomen. Doe dit tot enkel nog 'velletjes' overblijven van de huid.
- Filter het mengsel met de 'BD falcon cell strainer' (met poriën van 100 µm) in een andere 50 ml falcon. Spoel na met leidingwater.
- Vortex kort en bekijk 20 µl onder de microscoop bij 100 x vergroting.
- Centrifugeer 10 minuten op 265 rcf (1300 rpm) in de Jouan centrifuge (type B3.11). Pipetteer het supernatans af en breng dit over naar een afvalfles<sup>1</sup>.
- Voeg kaliumdichromaat ( $K_2CR_2O_7$ ) oplossing toe aan de pellet en vortex om te resuspenderen. Bewaar bij 4°C.



**Figuur 4: Kopvleugels en eieren bij *Toxocara canis* (A) en *cati* (B).**

### 4.2 Detectie van *Toxocara* eitjes in faeces d.m.v. flotatie

- Weeg 5 g faeces af in een mortier. Voeg hierbij 50 ml leidingwater en homogeniseer met stamper.
- Giet 3 keer doorheen een theezeeff in een maatbeker en breng over naar een 50 ml falcon.
- Laat minstens 15 min sedimenteren.
- Giet het supernatans af (in een autoclaveerbare afvalfles).
- Giet het sediment in een 12 ml centrifugeerbuis en spoel na met een kleine hoeveelheid leidingwater.
- Centrifugeer 2 minuten aan 1300 rcf (2900 rpm).
- Giet het supernatans af tot 0,5 cm boven het sediment.
- Voeg sucrose<sup>2</sup> toe tot 2 cm onder de rand.
- Roer sediment op met een wegwerp entnaald tot een homogeen mengsel wordt bekomen.
- Centrifugeer 2 minuten aan 100 rcf (800 rpm) zonder rem.

<sup>1</sup> De afvalfles zal later worden geautoclaveerd.

<sup>2</sup> Flotatievloeistof: 1280 g suiker in 1L demi-water + 2 ml formol 37%.



- Voeg sucrose toe tot een bolle meniscus ontstaat. Leg een dekglasje op de vloeistof en laat 2 min staan.
- Breng op een draagglasje en bekijk op 40 x of 100 x vergroting (4x of 10x lens). Breng intussen terug sucrose en een dekglasje bij het staal om meerdere fracties te kunnen onderzoeken.
- Spoel bij een positief staal de glaasjes af met leidingwater in een 50 ml falcon. Centrifugeer 5 minuten bij 1300 rcf (2900 rpm) en pipetteer het supernatans af. Breng het sediment over naar een eppendorf en bewaar in koelkast of diepvries.

### 4.3 Detectie van *Toxocara* eitjes in zand d.m.v. zeping, sedimentatie en flotatie

In dit onderzoek wordt de zeeftechniek toegepast die voor gebruik geoptimaliseerd werd. De gevoeligheid werd ook bepaald zodat die een betrouwbare ondergrens kan bieden voor het onderzoek.

De methode die toegepast wordt, bestaat uit verschillende opeenvolgende stappen namelijk fractioneren via zeven (grootte tussen 50 en 125  $\mu\text{m}$ ), sedimenteren, floteren en microscopisch onderzoek.

#### 4.3.1 Voorbereiding

- Plaats op voorhand een inox emmer met warm water en een scheut detergent op een verwarmde roerplaat met een roermagneet. Hang een thermometer met een wasknijper aan de rand van de emmer. De temperatuur moet tussen 70 en 80°C zijn.
- Voorzie handschoenen en voldoende absorberend papier.

#### Voorbehandeling met Tween (zeepwater)

- Meng het zandstaal goed op en weeg 100 g zand in een maatbeker. In bepaalde omstandigheden werd 250 à 300 g zand gebruikt.
- Voeg 100 à 200 ml 5% Tween20<sup>1</sup> toe zodat al het zand ondergedompeld is.
- Meng goed op en incubeer minstens 1 h (of overnacht) op kamertemperatuur.

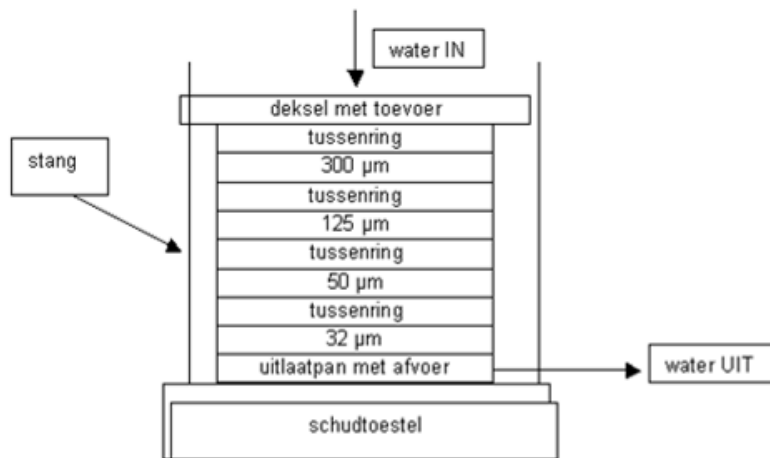
#### Installatie zeeftoestel (Retsch AS 200 basic)

- Plaats de zeefschudder naast de gootsteen.
- Verwijder de schroeven aan de schudplaat, en draai de stangen vast.
- Plaats de zeefpan met darm op de schudplaat.
- Plaats de 50  $\mu\text{m}$  zeef (met zwarte rubberen ring) op de zeefpan.
- Plaats een tussenring (met blauwe rubberen ring) en de 125  $\mu\text{m}$  zeef er bovenop.
- Plaats een tussenring en de 300  $\mu\text{m}$  zeef er bovenop.
- Plaats een tussenring er bovenop.
- Plaats de sproeikop op de stangen en draai vast met de zwarte schroeven (lichtjes aanspannen, niet forceren!).
- Zorg dat er twee waterkannen gevuld staan. Sluit dan de watertoevoer aan.

---

<sup>1</sup> Tween oplossing: 50 ml Tween20 aanlengen tot 1 L met demi-water.

- Open de watertoevoer en controleer of het water goed wegløopt.
- Start de schudder op stand 40, schud 5 min om de zeven voor te spoelen en om te controleren op lekken.



Figuur 5: Zeeftoestel schematisch



Figuur 6: Zeeftoestel

### 4.3.2 Zeven

#### Aanbrengen staal

- Verwijder de sproeikop en breng het staal voorzichtig op de bovenste zeef.
- Start de schudder op stand 40.
- Spoel de maatbeker na met leidingwater en giet op de bovenste zeef (herhaal tot alle debris op de zeef gebracht is).
- **Belangrijk!:** Giet niet te veel ineens op de zeef en controleer telkens of er nergens een zeef verstopt en overloopt. Dit kan worden gecontroleerd door na te gaan of er voldoende water afloopt uit de zeefpan en de tussenringen na te kijken op lekken.

#### Zeefschudden

- Plaats de sproeikop terug en draai de watertoevoer open tot de kop net begint te sproeien.
- Schud minstens 15 min en bij een zandstaal van meer dan 250 g 20 min.
- Controleer regelmatig op lekken en op een goede waterafvoer.
- Draai de watertoevoer dicht en laat nog enkele minuten verder schudden tot er geen water meer afloopt.

### 4.3.3 Sedimentatie



**Figuur 7:**  
Sedimentatie

- Verwijder de sproeikop en plaats deze op absorberend papier.
- Neem de zeven en tussenringen af en plaats deze op absorberend papier.
- De inhoud van de 125  $\mu\text{m}$  en 300  $\mu\text{m}$  zeef wordt in de bioafvaldoos gedeponeerd. De zeven zelf worden omgekeerd in de emmer (70-80°C) geplaatst.
- Spoel onder de kraan voorzichtig de inhoud van de 50  $\mu\text{m}$  zeef naar 1 punt op de zeef (zorg dat deze niet overloopt!)
- Spoel de inhoud van de zeef in een 50 ml falcon met een spuitfles leidingwater via een grote glazen trechter.
- Laat minstens 1 h sedimenteren.

### 4.3.4 Centrifugatie

- Pipetteer de bovenstaande vloeistof in een afvalfles, let op dat je geen sediment meeneemt.
- Breng het sediment met een 10 ml pipet in 4 centrifugeerbuisen, probeer hierbij het sediment zo gelijk mogelijk over de buizen te verdelen.
- Spoel de 50 ml falcon na met leidingwater en verdeel opnieuw over de centrifugeerbuisen.
- Centrifugeer 5 min bij 1300 rcf (=2900 rpm) zonder rem (1 buis per bucket aan de buitenkant, anders komen ze vast te zitten).

### 4.3.5 Flotatie

- Neem het supernatans af tot net boven het sediment met een 10 ml pipet.
- Voeg flotatievloeistof (sucrose)<sup>1</sup> toe tot ongeveer  $2/3^e$  volume.
- Roer met de achterkant van een plastic entnaald het sediment goed op.
- Centrifugeer 5 min aan 100 rcf (=800 rpm) zonder rem.
- Vul de buizen op tot de rand met flotatievloeistof tot een bolle meniscus.
- Plaats een dekglasje op de meniscus en laat 10 min floteren.
- Breng het dekglasje onder een schuine hoek op een draagglasje.
- Vul de buizen terug op zodat opnieuw een bolle meniscus ontstaat en plaats een nieuw dekglasje. Deze stap wordt nog eens herhaald zodat men finaal per centrifugeerbuis minimum 3 verschillende fracties kan bekijken onder de microscoop.

---

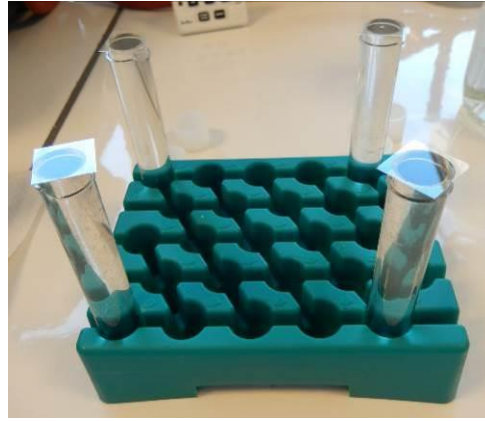
<sup>1</sup> Flotatievloeistof: 1280 g kristalsuiker + 1 L demi-water + 2 ml formaldehyde 37%.



**Figuur 8:**  
Centrifugeerbuisje  
na oproeren



**Figuur 9:**  
Centrifugeerbuisje na  
centrifugatie



**Figuur 10:** Flotatie met dekglasje op bolle meniscus.

### 4.3.6 Microscopisch onderzoek

- Onderzoek het volledige dekglasje op 100 x vergroting.
- Als *Toxocara* eitjes worden gezien, bevestig via meting met het meetoculair. (*T. canis* 75 x 90  $\mu\text{m}$ , *T. cati* 65 x 75  $\mu\text{m}^1$ )
- Tel en noteer het aantal eitjes voor het volledige dekglasje.
- Blijf nieuwe dekglasjes onderzoeken tot er geen eitjes meer terug te vinden zijn.
  - Soms zijn er eitjes terug te vinden op het 2<sup>e</sup> of 3<sup>e</sup> dekglasje waar er op het 1<sup>e</sup> geen te zien waren => bekijk voor de zekerheid steeds 3 dekglasjes, ook al vind je op het eerste geen eitjes.
  - De methode is niet kwantitatief, dus bij een positief staal kan je in principe afbreken na de eerste dekglasjes.
  - Bij positieve stalen kunnen dek- en draagglasjes waarop eitjes te zien zijn, worden afgespoeld met leidingwater in een 50 ml falcon voor DNA extractie en PCR. Centrifugeer 5 minuten aan 1300 rcf (= 2900 rpm) en pipetteer het supernatans af. Pipetteer het sediment over naar een eppendorf en bewaar in de diepvries.

### 4.3.7 Onderhoud van het zeeftoestel

- De tussenringen worden na uitlekken op absorberend papier geautoclaveerd.
- De zeven en de rubbers worden minimum 2 h gedecontamineerd in water van 70-80°C<sup>2</sup> met detergent. Spoel ze daarna af onder de kraan en verwijder vastzittende partikels met een zachte tandenborstel (niet voor de 50  $\mu\text{m}$  zeef!). Leg ze vervolgens op de roosters van de laminaire flow kast om ze droog te blazen. Nadien wordt de UV lamp opgezet, waarbij de zeven kunnen blijven liggen. Pas als de zeven volledig droog zijn, kunnen ze terug worden opgeborgen.

<sup>1</sup> Thienpont *et al.* (2003)

<sup>2</sup> Maya *et al.* (2011)

## 4.4 DNA extractie uit *Toxocara* eitjes

DNA extractie is de isolatie van DNA uit cellen dat later kan onderzocht worden via PCR. Voor de DNA extractie wordt gebruik gemaakt van de 'NucleoSpin Tissue kit' (Macherey-Nagel) volgens het protocol voor weefsels.

- Zorg op voorhand dat buffer B5 en proteïnase K al gemaakt zijn. Verwarm de elutiebuffer BE al voor op 70°C.
- Centrifugeer de eitjes in een eppendorf aan 1300 rcf (3500 rpm) voor 5 min. Neem supernatans af en resuspendeer in 200 µl T1 buffer.
- Voeg steriele glaspereels toe in een 2 ml buisje tot ongeveer aan de ijkstreep van 300 µl. Voeg daaraan 250 µl eitjes in T1 buffer toe. Vortex voor 5 à 10 minuten of langer tot alle eitjes opengebroken zijn. Controleer dit onder de microscoop.
- Neem 200 µl opengebroken eitjes af en breng naar een eppendorf met sluiting. Voeg hieraan 200 µl B3 buffer en 25 µl proteïnase K toe. Vortex en incubeer 15 minuten bij 70 °C.
- Centrifugeer voor 5 minuten aan 11000 rcf en breng het supernatans over naar een nieuw eppendorf.
- Voeg 210 µl ethanol (96-100 %) toe en vortex.
- Plaats een NucleoSpin weefselkolom op een afvalbuisje. Breng de vloeistof over op de kolom. Centrifugeer 1 minuut aan 11000 rcf. Giet de vloeistof in het afvalbuisje in de gootsteen en plaats de kolom er terug op.
- Voeg 500 µl BW buffer toe en centrifugeer 1 minuut aan 11000 rcf. Verwijder opnieuw de vloeistof uit het afvalbuisje. Voeg 600 µl B5 buffer toe en centrifugeer 1 minuut aan 11000 rcf. Verwijder de vloeistof uit het afvalbuisje.
- Centrifugeer de kolom nog eens droog aan 11000 rcf voor 1 minuut.
- Plaats het kolommetje op een 1,5 ml eppendorf en voeg 50 µl voorverwarmde BE buffer toe. Laat 1 minuut staan bij kamertemperatuur. Centrifugeer 1 minuut aan 11000 rcf. Het kolommetje wordt weggegooid en de vloeistof in de eppendorf kan gebruikt worden voor de PCR.

## 4.5 Real-time PCR

Real-time PCR wordt gebruikt om met enige zekerheid onderscheid te kunnen maken tussen *Toxocara cati* en *canis*. Dit kan toegepast worden op geïsoleerde eitjes na DNA extractie.

Om de PCR te kunnen laten werken, moet het te onderzoeken DNA in een PCR master mix worden gebracht. Deze master mix bestaat uit:

- ✓ PCR buffer vloeistof
- ✓ MgCl<sub>2</sub>
- ✓ dNTP's of desoxynucleotidetrifosfaten
- ✓ ROX referentiekleurstof
- ✓ Taq polymerase
- ✓ PCR Water
- ✓ Forward primer
- ✓ Reverse primer
- ✓ Probe met FAM reporter en BHQ-1 quencher

	Forward primer	Probe (FAM-BHQ1)	Reverse primer
<i>T. canis</i>	GCGCCAATTTATGGAATGTG	CCATTACCACACCAGCATAG	GAGCAAACGACAGCSATTC
<i>T. cati</i>	ACGCGTACGTATGGAATGTG	TCTTTCGCAACGTGCATTCCG	GAGCAAACGACAGCSATTC

Tabel 10: *Toxocara* primers en probes volgens Durant *et al.* (2013).

- Maak de mastermix eerst aan zonder primers en probe voor alle stalen. Reken volumes om via onderstaande tabel. Het aantal reacties zijn de te onderzoeken stalen plus een positieve en negatieve controle. Reken best nog een reservevolume bij. Vermenigvuldig het aantal reacties met de volumes van één reactie (zie laatste kolom). Voeg alles samen in een eppendorfje.

Stock	Finale concentratie	1 reactie van 25 $\mu$ L ( $\mu$ l)
Buffer 10x	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	3,2 mM	1,6
dNTP 5 mM	200 $\mu$ M	1
ROX 50x	1x	0,5
Taq 4U/ $\mu$ L	0,5U	0,125
Water	restvolume	14,3
Rev 10 $\mu$ M	400 nM	1
Fw 10 $\mu$ M	400 nM	1
Probe 5 $\mu$ M	200 nM	1

Tabel 11: Overzicht van samenstelling PCR mastermix met concentraties en volumes.

- Splits de mix op in twee om een mastermix te maken voor beide species.
- Voeg 1  $\mu$ l per reactie toe van de forward primer, reverse primer en probe.
- Verdeel de mastermixen uit per 23  $\mu$ l in optische PCR buisjes.
- Voeg 2  $\mu$ l DNA toe en dek af met optische deksels.
- Stel real-time PCR toestel juist in en laadt de PCR-plaat in het toestel. Start PCR reactie.

## 4.6 Reiniging

- Fysisch afval zoals pipetten en handschoenen die mogelijks gecontamineerd zijn, worden in de bioafvaldoos gedeponerd.
- Vloeibaar afval zoals sucrose en kaliumdichromaat, wordt verzameld in een afvalfles. Deze fles wordt ofwel geautoclaveerd en daarna weggegoten in de gootsteen ofwel gesorteerd bij het chemisch afval.
- Vaste materialen zoals rekjes, scharen en pincetten worden met warm water en zeep afgewassen. Deze worden goed nagespoeld en gedroogd. Autoclaveerbaar gerief wordt in autoclaaf ontsmet.
- De bench wordt afgekuist met javel (<5% natriumhypochloriet).

## 4.7 Staalnameprocedure

In deze studie werden verschillende staalnameprocedures voor zandbakken toegepast en vergeleken. In de literatuurstudie worden een reeks parameters opgesomd waarmee rekening dient te worden gehouden bij staalname. Een deel parameters werd constant gehouden doorheen deze studie, terwijl op een aantal parameters werd gevarieerd doorheen de verschillende fasen van deze studie.

### Constate parameters

- Studiegebied: stad Roeselare
- Locatie: 10 openbare speelruimtes (met zandbakken) voor kinderen. Locaties die uit verschillende afgescheiden zones bestaan, werden opgedeeld waarbij één staalname per zone werd uitgevoerd.
- Bodemsoort: zand

### Variabele parameters

- Staalnamepatroon:
  - Per locatie 10 stalen in kruisvorm (zie Figuur 3 A) die worden gepoold tot 1 staal van 100 g.
  - Per locatie 4 stalen van 100 g die elk afzonderlijk worden geanalyseerd.
  - Per locatie 5 à 7 stalen (2 staalnamepotjes gevuld van 130 ml) die worden gepoold tot 1 staal van 250 à 300 g.
- Diepte:
  - Tot 3 cm
  - Tot 5 cm

Naast bovenstaande, controleerbare parameters zijn er ook een reeks parameters die niet controleerbaar zijn, maar wel rekening mee dient te worden gehouden bij de interpretatie van de resultaten. Deze parameters dienen dus nauwgezet geregistreerd te worden. Hiervoor wordt een standaard vragenlijst ingevuld per staalname. Later wordt dit samengevoegd in een Excelfile.

Staal nummer	Staalnummer – locatienummer – datum (DDMM)
Datum	DD/MM/JJJJ
Adres	Buurtnaam Straatnaam
Weersomstandigheden (48h) <ul style="list-style-type: none"> <li>• Algemeen</li> <li>• Relatieve vochtigheidsgraad</li> <li>• Temperatuur</li> </ul>	Zonnig/regen/bewolkt/.. .. % RV .. °C
Toegankelijkheid <ul style="list-style-type: none"> <li>• Plakkaat hondenpoep opruimen</li> <li>• Plakkaat honden aan de leiband</li> <li>• Plakkaat verbod honden</li> <li>• Fysieke afsluiting</li> </ul>	Ja/nee Ja/nee Ja/nee Ja (+hoe)/nee
Aanwezigheid vuilbakken	Ja (+ afstand tot zandbak)/nee
Aanwezigheid uitwerpselen	Ja (+ aantal + waar)/nee
Volle zon op zandbak?	Ja/nee
Leeftijd doelgroep	+2/+6/+10

Beschrijving locatie	Foto + schets <sup>1</sup> Functie domein, groenvoorziening, speeltuigen, huizen aangrenzend, drukke baan, ..
Grootte zandbak	Aantal meter
Overige info	Dieren of sporen van dieren in zandbak gezien 'Bevuiling' zand met plantenmateriaal Recent gebouwde zandbak? Passage hondeneigenaars aan leiband met/zonder poepzakjes Los droog of vast vochtig zand Aantal schepjes en diepte ...

Tabel 12: Standaard vragenlijst bij staalname.

---

<sup>1</sup> Bij elke locatie wordt een schets gemaakt van de zandbak waarop de staalnames en eventuele feces aangeduid wordt.





## 5 Resultaten

### 5.1 Isolatie eitjes uit *Toxocara* wormen

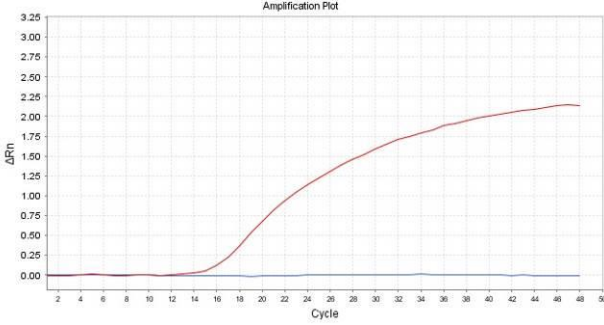
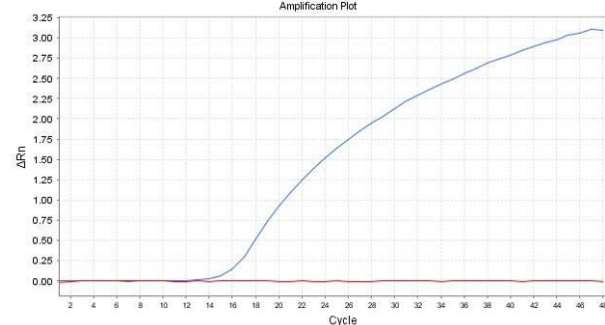
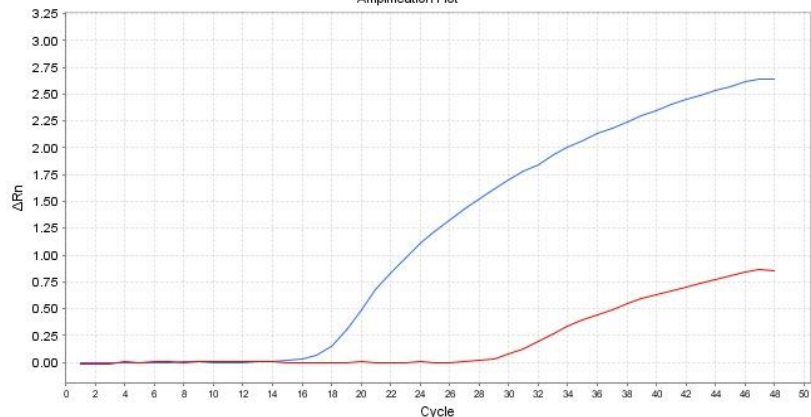
Om de gevoeligheid van de detectiemethoden te bepalen, moeten positieve stalen met een gekende concentratie kunnen gebruikt worden. Om zuivere eitjes te verkrijgen, werden deze rechtstreeks uit *Toxocara* wormen gehaald. De spoelwormen werden verzameld aan de Faculteit Diergeneeskunde te Merelbeke (UGent) op de dienst Pathologie.

Er werden spoelwormen verkregen van beide soorten (*T. cati* en *canis*) en beide geslachten. Daarom moest er via stereomicroscopie nog gedifferentieerd worden (zie Figuur 4). Zie onderstaande tabel voor resultaten. Bij de meeste wormen was het verschil wel duidelijk maar bij anderen was er meer twijfel door het moeilijk zichtbaar worden van de kopvleugels. Worm nummer 070414-ZN was een twijfelgeval en werd voorlopig als *T. canis* aangenomen. Om de speciesdifferentiatie tussen de wormen te bevestigen werd een PCR test uitgevoerd.

<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
00178-3	229
00178-1	070414-2
00178-2	070414-1
00177-1	
070414-ZN	
	
<b>Figuur 11: Kopvleugels van een hondenspoelworm</b>	<b>Figuur 12: Kopvleugels van een kattenspoelworm</b>

Tabel 13: Resultaten van differentiatie van de *Toxocara* species via microscopie.

Van elke worm werd een stukje weefsel afgeknipt en via PCR onderzocht. Worm 070414-ZN bleek geen *T. canis* maar *T. cati* te zijn. Er was ook een worm (070414-1) die voor beide species signaal gaf. Dit lijkt op het eerste zicht niet logisch aangezien een spoelworm slecht van één soort kan zijn. Een mogelijke verklaring hiervoor is dat deze worm bewaard werd in een potje waar ook een deel *T. canis* wormen in werden bewaard, waarvan een deel was opengescheurd. Op die manier werd het DNA staal van de worm wellicht gecontamineerd met DNA afkomstig van andere wormen. Voor alle overige wormen kwam de speciesdifferentiatie via PCR overeen met de stereomicroscopische differentiatie op basis van de kopvleugels.

<i>T. canis</i>	<i>T. cati</i>
00178-1 00178-2 00178-3 00177-1	070414-ZN 070414-2 229
 <p><b>Grafiek 3: Real-time PCR resultaat van speelworm 00177-1.</b></p>	 <p><b>Grafiek 4: Real-time PCR resultaat van speelworm 229.</b></p>
070414-1	
 <p><b>Grafiek 5: Real-time PCR resultaat van speelworm 070414-1</b></p>	

**Tabel 14: Resultaten van de real-time PCR op weefsel van *Toxocara* wormen. (rood = *T. canis*, blauw = *T. cati*)**

Door deze resultaten konden we twee speelwormen uitkiezen die een duidelijk resultaat gaven voor één van de species. Voor *T. cati* kozen we voor speelworm 229 en voor *T. canis* 001771-1. Uit deze speelwormen werden eitjes geïsoleerd om de gevoeligheid van de detectiemethoden te kunnen bepalen. Het DNA uit deze wormen werd ook verder gebruikt als positieve controle in verdere PCR testen.

## 5.2 Bepalen van de gevoeligheid van de zeefmethode

De gevoeligheid van de zeefmethode kon bepaald worden door spiking experimenten uit te voeren. Hiervoor gebruikten we steriel zand waaraan een gekend aantal *Toxocara* eitjes werd toegevoegd. Op die manier kan het percentage recuperatie geweten worden. In onderstaande tabel geeft de tweede kolom het totaal aantal eitjes weer of het aantal eitjes toegevoegd aan het zandstaal. Zo kan ook het aantal eitjes per gram berekend worden. Het 'aantal eitjes geteld' is het aantal die men na de volledige procedure nog terug vindt. Het aantal eitjes dat men terugvindt ten opzichte van het

aantal gespiked in het zand is het percentage recuperatie. Er kan worden geconcludeerd dat gemiddeld 31 % van de eitjes aanwezig in een zandstaal via de zeefmethode kunnen worden gerecupereerd, met een ondergrens van 0,35 eitjes per gram zand.

Datum	Totaal aantal eitjes	Aantal eitjes /gram	Aantal eitjes geteld	% recuperatie
04/02/2014	10000	100	2447	25
14/02/2014	900	9	289	32
17/03/2014	150	1,5	30	20
18/03/2014	35	0,35	4	11
31/03/2014	8500	85	56	66

Tabel 15: Resultaat van de spiking experimenten.

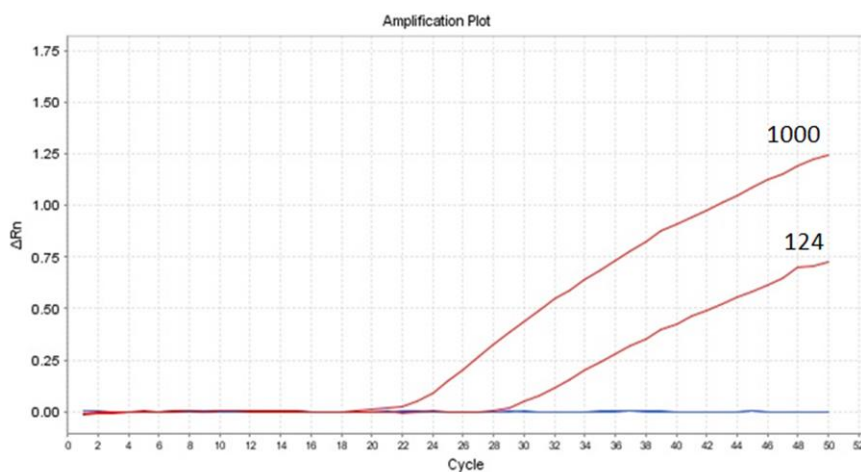
### 5.3 Bepalen van de gevoeligheid van de DNA extractie en real-time PCR

Er werd hiervoor gebruik gemaakt van de zuivere eitjes die geïsoleerd werden uit de wormen. Via PCR werd hun species bevestigd. Er werden verschillende verdunningen aangelegd van de eitjes en het exacte aantal werd bepaald voor elke verdunning. Vervolgens werd uit elke verdunning DNA geëxtraheerd en werden PCR testen uitgevoerd voor *T. canis* en *T. cati*.

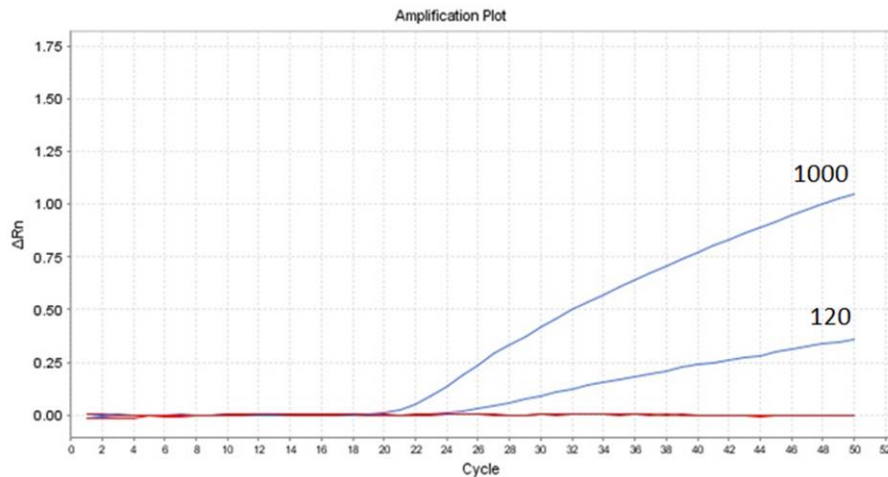
1771-1: <i>T. canis</i>	229: <i>T. cati</i>
1000	1000
124	120
50	40
10	11
3	2

Tabel 16: Aantal eitjes voor real-time PCR van *T. canis* en *cati* eitjes.

Voor beide soorten werd een correct PCR signaal verkregen en dit tot en met de 2<sup>e</sup> verdunning of ongeveer 120 eitjes. Bij positieve stalen zullen we dus minimum 120 eitjes nodig hebben om een real-time PCR te kunnen uitvoeren voor species differentiatie.



Grafiek 6: Resultaat real-time PCR van *T. canis* eitjes met signaal bij 1000 en 124 eitjes. (rood = *T. canis*, blauw = *T. cati*)



Grafiek 7: Resultaat real-time PCR van *T. cati* eitjes met signaal bij 1000 en 120 eitjes. (rood = *T. canis*, blauw = *T. cati*)

## 5.4 Onderzoek van zandstalen uit 10 speeltuinen in Roeselare op aanwezigheid van *Toxocara* eitjes

Om uit te zoeken wat de optimale staalnameprocedure is voor het opsporen van *Toxocara* eitjes in openbare zandbakken, werd een verkennende studie opgezet in de stad Roeselare. In Roeselare zijn er 41 publieke speeltuinen waarvan 10 met een zandbak. Deze zandbakken vormden het voorwerp van deze studie. In elke zandbak werden stalen genomen volgens verschillende staalnameprocedures voor onderzoek op aanwezigheid van *Toxocara* eitjes. Wanneer op 1 locatie meerdere zandbakken aanwezig waren, of wanneer een zandbak uit verschillende delen bestond, werd de locatie nog eens opgedeeld in zones en afzonderlijk bemonsterd.

### 5.4.1 Algemene bevindingen

#### 5.4.1.1 Vorm en oppervlakte zandbak

De zandbakken hebben vaak een willekeurige vorm waardoor de opdeling in een kruis niet altijd gelijk is verdeeld. Ook zijn er een aantal speeltuinen waar meerdere zandbakken zijn of de zandbak te groot is. In het laatste geval moet er worden opgedeeld in zones.

#### 5.4.1.2 PlakATEN

In 8 van de 10 speeltuinen staat een standaard plakkaat (zie Figuur 13) dat aangeeft dat het over een speelplein gaat waar honden aan de leiband moeten en de hondenpoep moet worden opgeruimd. Een bedenking die we maakten bij staalname, was dat dit plakkaat niet overal even duidelijk aangegeven staat. Veelal staat het maar aan één ingang of te ver van het wandelpad. Ook de icoontjes voor de honden staan vrij klein waar men makkelijk over kan kijken. In één park staat wel een duidelijk plakkaat om de hondenpoep op te ruimen (zie Figuur 14). Op één plaats was er een totaal verbod voor honden (zie Figuur 16). In twee parken hing zelfs een plakkaat (zie Figuur 15 en Figuur 17) betreffende huisregels in het park waaronder ook voor het opruimen van hondenpoep. Dit staat echter zeer klein en soms niet leesbaar door bevuiling.



**Figuur 13: Standaardplakkaat speelplein**



**Figuur 14: Plakkaat voor opruimen van hondenpoep**



**Figuur 17: Plakkaat met reglement van de stad Roeselare + honden aan de leiband**



**Figuur 18: Plakkaat voor honden aan leiband**



**Figuur 15: Close up van plakkaat met reglement van de stad Roeselare**



**Figuur 16: Verbodsbepaling voor honden**

### 5.4.1.3 Aanwezigheid hond en kat

Op 3 van de 38 staalnames hebben we toevallig ook een kat in de zandbak of in de buurt er van waargenomen. In 3 zandbakken werden ook pootafdrukken gezien. Op 3 locaties was er ook veel passage van hondeneigenaars die op wandel waren met hun hond. Deze waren steeds aangeliend en bij een paar mensen waren ook poepzakjes te zien.



**Figuur 19: Kat gespot in zandbak bij staalname 2-19-0204.**



**Figuur 20: Pootafdrukken van een kat**



**Figuur 21: Pootafdrukken van een hond**

#### 5.4.1.4 Aanwezigheid uitwerpselen

Bij 12 van de 38 staalnames werden uitwerpselen gevonden. Via sedimentatie en flotatie werden deze onderzocht en 3 daarvan waren positief voor *Toxocara*. In één positief fecesstaal werden ook vele gelarveerde eitjes teruggevonden (zie Figuur 22). In een aantal andere fecesstalen werden ook *Strongyloide* eitjes gevonden (zie Figuur 23).



**Figuur 22: Microscopiebeeld van fecesstaal F30-15-1305 met gelarveerde *Toxocara* eitjes (100 x vergroting).**



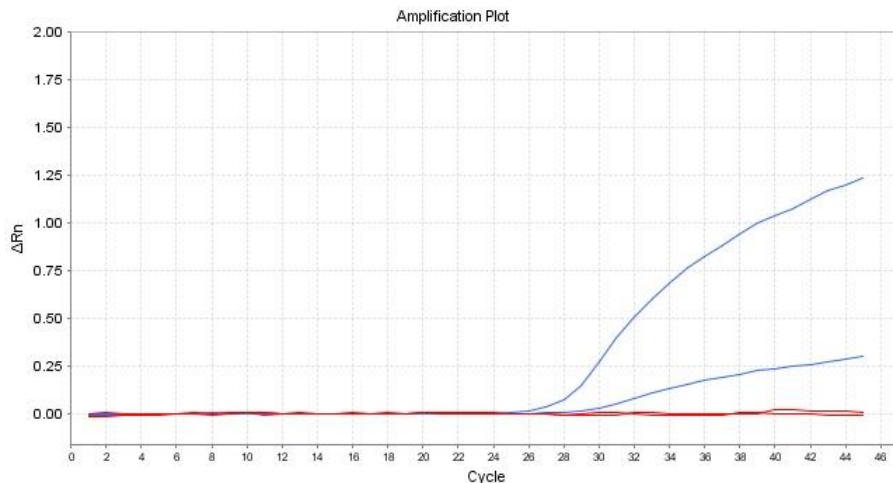
**Figuur 23: Microscopiebeeld van een gelarveerd *Strongyloide* eitje (28,6 x 52 µm bij 400 x vergroting).**

Om het species te bepalen, werden de spoelwormeitjes uit positieve fecesstalen via real-time PCR onderzocht. In onderstaande tabel worden de resultaten hiervan weergegeven. Enkel fecesstaal F29-14-1205 gaf geen signaal na PCR reactie, wat te wijten zal zijn aan het te laag aantal eitjes. Toch is er een vermoeden van het species. Bij microscopie worden de eitjes namelijk altijd gemeten en aan de hand van de afmetingen kan men al bepalen of het over honden- of kattenspoelwormeitjes gaat. Zo werd het vermoeden steeds bevestigd via real-time PCR wat aangeeft dat dit ook een betrouwbare manier is van differentiatie, tenzij er twijfel is door te veel variatie. Voor fecesstaal F29-14-1205

varieerden de afmetingen tussen 62,4 µm en 72,8 µm dus dit gaat vermoedelijk over *Toxocara cati* eitjes die theoretisch 65 x 75 µm meten.

	Aantal eitjes	Species
<b>F11-30-1604</b>	+/- 1600	<i>T. cati</i>
<b>F29-14-1205</b>	+/- 90	<i>T. cati?</i>
<b>F30-15-1305</b>	+/- 6780	<i>T. cati</i>

Tabel 17: Resultaten positieve feces.



Grafiek 8: Resultaat real-time PCR van *Toxocara cati* eitjes in F11-30-1604 (onverdund en 1/10 verdund) (rood = *T. canis*, blauw = *T. cati*).

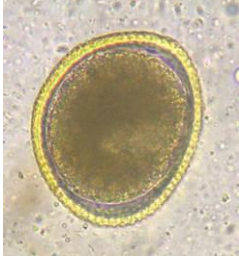
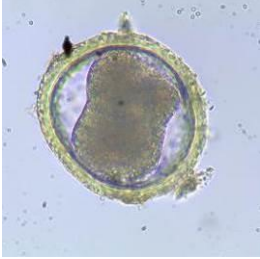


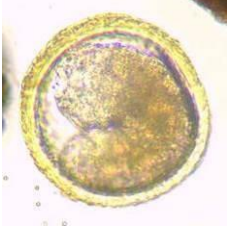

De 3 positieve fecesstalen waren dus allen besmet met kattenspoelwormeitjes. Dit zijn er te weinig om hieruit een besluit uit te trekken. Toch bevestigt dit wel het vermoeden dat katten een grotere rol spelen in contaminatie van zandbakken dan eerst gedacht.

#### 5.4.1.5 Microscopische analyse van zandstalen

Na zeven, sedimenteren en floteren kan het resultaat worden bekeken onder de microscoop. Dit was niet altijd vanzelfsprekend. We kwamen heel wat structuren tegen die lijken op *Toxocara* maar het niet zijn. Door zandstalen te zeven op een poriediameter van 50 - 125 µm bevinden zich op het microscooppreparaat na flotatie enkel structuren in de grootteorde van *Toxocara* eitjes wat de analyse extra bemoeilijkt.

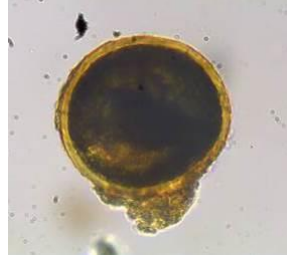
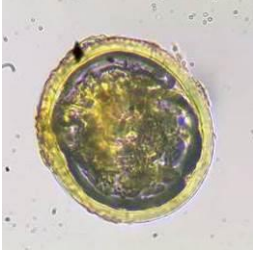



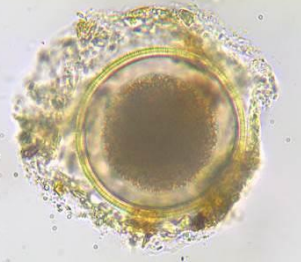
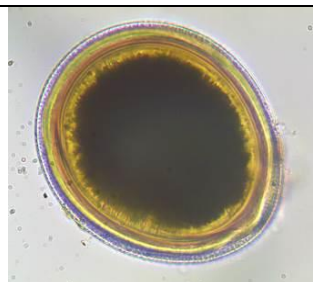



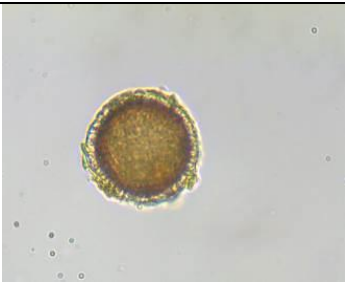
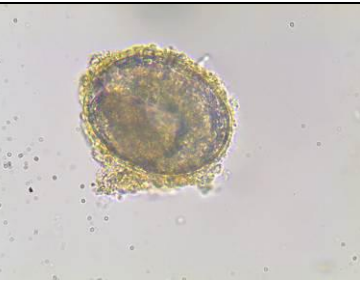

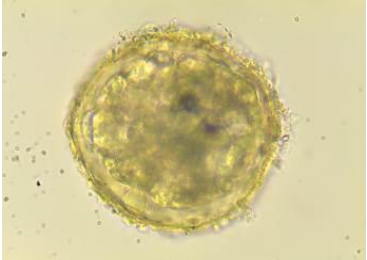
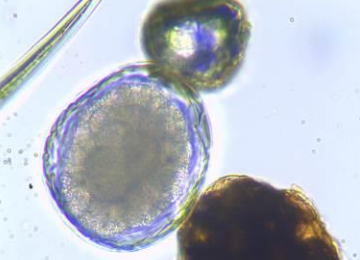
Hieronder worden eerst een aantal *Toxocara* eitjes gegeven en geordend volgens embryoneringsstadium<sup>1</sup>. Daaropvolgend wordt een overzicht gegeven van alles wat werd gezien op een preparaat van een zandstaal en die in bepaalde opzichten lijken op *Toxocara*.

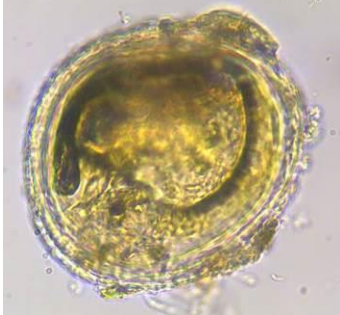

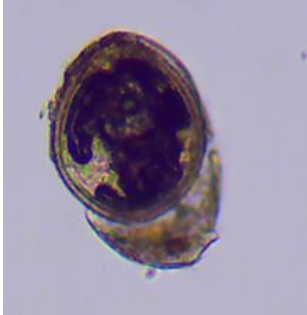
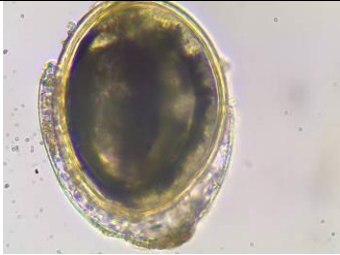
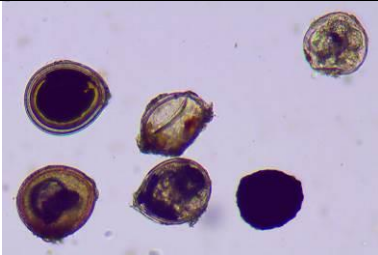
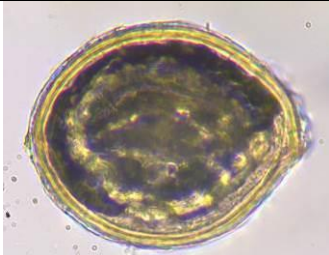
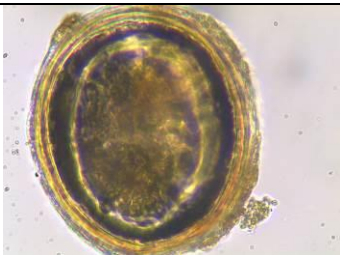
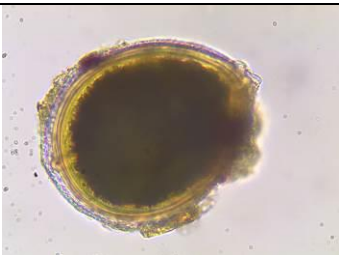
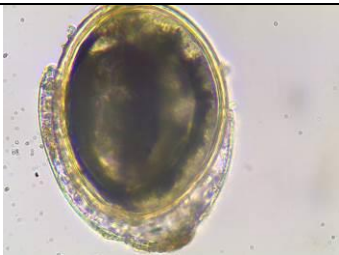

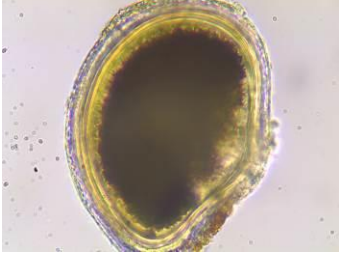
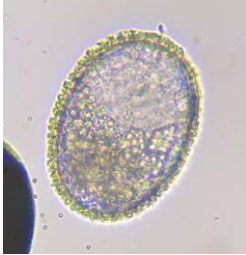
<sup>1</sup> Holland *et al.* (2006)

		
<b>Figuur 24: Eencellig stadium (75 <math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Figuur 25: Tweecellig stadium (71 <math>\mu\text{m}</math> x 83 <math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Figuur 26: Viercellig stadium (65 x 67,6 <math>\mu\text{m}</math>)</b>
		
<b>Figuur 27: Vroege morula stadium (78 x 83,2 <math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Figuur 28: Blastula stadium (78 x 83,2 <math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b>Figuur 29: Larvaal stadium (65 <math>\mu\text{m}</math> x 83,2 <math>\mu\text{m}</math>)</b>

Tabel 18: Overzicht van *Toxocara* eitjes in verschillende embryoneringsstadia (400 x vergroting).



		
<p><b>Figuur 30:</b> 80-90 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 31:</b> 80-90 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 32:</b> 72 x 75 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>
		
<p><b>Figuur 33:</b> 67,6 <math>\mu\text{m}</math> x 111,8 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 34:</b> 85,8 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 35:</b> 78 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>
		
<p><b>Figuur 36:</b> 130 <math>\mu\text{m}</math> lengte bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 37:</b> 62,4 <math>\mu\text{m}</math> lengte bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 38:</b> 98,8 <math>\mu\text{m}</math> lengte bij 400x vergroting</p>
		
<p><b>Figuur 39:</b> 52 <math>\mu\text{m}</math> x 104 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 40:</b> 41,6 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 41:</b> 78 <math>\mu\text{m}</math> lengte bij 400x vergroting</p>
		
<p><b>Figuur 42:</b> 85,8 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 43:</b> 98,8 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>	<p><b>Figuur 44:</b> 78 <math>\mu\text{m}</math> x 90 <math>\mu\text{m}</math> bij 400x vergroting</p>

		
<b>Figuur 45: 98,8 x 104 µm bij 400 x vergroting</b>	<b>Figuur 46: 109,2 x 111,7 µm bij 400 x vergroting</b>	<b>Figuur 47: 90 x 114,4 µm bij 100 x vergroting</b>
		
<b>Figuur 48: 90 x 114,4 µm bij 400 x vergroting</b>	<b>Figuur 49: Tussen 100 en 117 µm bij 100 x vergroting</b>	<b>Figuur 50: 98,8 µm x 117 µm bij 400 x vergroting</b>
		
<b>Figuur 51: 124,8 µm x 143 µm bij 400 x vergroting</b>	<b>Figuur 52: 104 x 117 µm bij 400 x vergroting</b>	<b>Figuur 53: 90 x 114,4 µm bij 400 x vergroting</b>
		
<b>Figuur 54: 90 x 114,4 µm bij 400 x vergroting</b>	<b>Figuur 55: 111,8 x 143 µm bij 400 x vergroting</b>	<b>Figuur 56: 65 x 85,8 µm bij 400 x vergroting</b>

**Tabel 19: Overzicht van veel voorkomende microscopiebeelden.**

Deze figuren zijn nog niet geïdentificeerd. Over een aantal hebben we wel een vermoeden zoals Figuur 33, Figuur 39 en Figuur 56 die mogelijks mijteneieren kunnen zijn. Ook zal een groot deel van de figuren stuifmeelkorrels of ander plantenmateriaal zijn. Hiervoor werd de pollenatlas<sup>1</sup> geraadpleegd maar met weinig succes. Er zijn heel wat pollen die er op lijken maar niet in de grootteorde van *Toxocara*. Ze zijn hiervoor te klein en de meesten uit die lijst worden door de zeven weggespoeld. Indien men een dergelijke studie uitvoert, kan men wel rekening houden met de

<sup>1</sup> <http://www.polleninfo.org/SE/se/allergy-infos/aerobiologics/pollen-atlas.html?letter=A>

seizoenen. Op die manier kan de microscopische analyse vergemakkelijkt worden. Planten hebben een bepaalde bloeiperiode die zich uit in het vrijkomen van pollen. In bijlage zit een kalender die de bloeiperiode van bepaalde planten weergeeft.

## 5.4.2 Staalnameprocedure

### 5.4.2.1 Staalnameprocedure 1

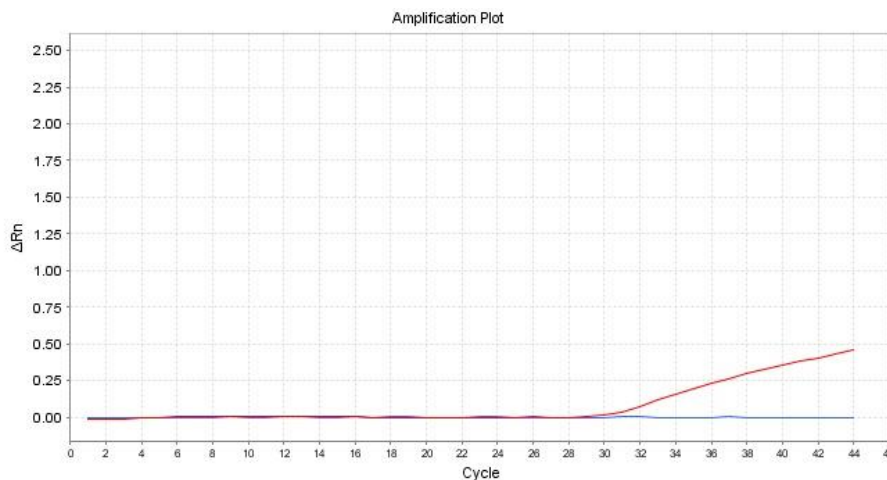
De eerste staalnameprocedure bestond uit het bemonsteren van de zandbak in een kruisvorm. Hierbij werden 10 schepjes op 3 cm diepte genomen en samen gepoold tot één staal van 100 g.

Na deze staalnames was 1 van de 10 zandbakken positief voor *Toxocara*. Daarin werd 1 eitje gevonden in 100 g zand.

### 5.4.2.2 Staalnameprocedure 2

De eerste staalnameprocedure leverde – met uitzondering van één zandbak waarin welgeteld één eitje werd gevonden op 100 g zand – geen positieve resultaten op. Uit internationale literatuur blijkt nochtans dat zand op openbare plaatsen wereldwijd frequent is gecontamineerd met spoolwormeitjes, wat doet vermoeden dat dit in onze contreien niet anders zal zijn. Bovendien werden verschillende uitwerpselen gevonden die sterk besmet waren met *Toxocara* eitjes. Dit doet vermoeden dat de staalnameprocedure nog niet optimaal is om contaminatie vast te stellen in zandbakken.

Daarom werd in de zandbak waar wel 1 eitje werd gevonden een andere staalnameprocedure toegepast. Er werd op 4 plaatsen, willekeurig verspreid over de zandbak, telkens 100 g zand genomen en dit maal op 5 cm diepte in plaats van 3 cm. Daarin was er contaminatie te zien op 1 van de 4 staalnameplaatsen. Op die ene plaats werden 120 eitjes geteld. Via real-time PCR bleek dat het over *Toxocara canis* ging.



Grafiek 9: Resultaat real-time PCR van 19-18-2804. (rood = *T. canis*, blauw = *T. cati*)

Hieruit blijkt dus dat de contaminatie niet homogeen verdeeld is over een zandbak maar plaatselijk is. Hierdoor is het niet aangewezen om per zandbak slechts 1 staal van 100 g te nemen daar de kans dat de contaminatie mislopen wordt te groot zal zijn. Men moet dus een zekere spreiding behouden.

### 5.4.2.3 Staalnameprocedure 3

Uit voorgaand experiment blijkt dat het nemen van meerdere stalen op één locatie de kans op detectie van *Toxocara* eitjes gevoelig verhoogt. De analyse van 4 verschillende stalen van 100 g via de zeefmethode is echter zeer tijdrovend. Daarom werd nog steeds in dezelfde zandbak een 3<sup>e</sup> staalnameprocedure uitgetoet. Deze bestond uit het nemen van 5 à 7 stalen op 5 cm diepte verspreid over de zandbak gevolgd door het poolen van deze stalen tot één staal van 250 à 300 g. Dit

staal werd dan in zijn geheel onderworpen aan het proces van zeven, sedimenteren, floteren en microscopische analyse. Een voorafgaande test met een blanco zandstaal had immers aangetoond dat het toepassen van de zeefmethode op 300 g i.p.v. 100 g zand geen noemenswaardige problemen oplevert.

De analyse van het staal van 300 g leverde hier opnieuw een positief resultaat op. Ditmaal werden 6 eitjes teruggevonden. Ten opzichte van voorafgaande staalnameprocedures heeft deze procedure een aantal voordelen:

- Kortere tijdsduur dan procedure 2
- Nog steeds een zekere spreiding over de locatie
- 3 x meer zand dus de gevoeligheid wordt verhoogd.

Deze procedure werd vervolgens verder toegepast op de overige 9 zandbakken die het onderwerp vormden voor deze studie. Hierbij werden voorgaande negatieve resultaten nog eens bevestigd.

## 6 Discussie en algemeen besluit

Dit onderzoek werd uitgevoerd om de staalnameprocedure te optimaliseren om *Toxocara* te kunnen determineren in zandbakken. Er werden drie staalnameprocedures vergeleken met elkaar. Ze hebben allen hun voor- en nadelen maar voor dit onderzoek bleek de laatste procedure (gespreide staalnames over 5 à 7 plaatsen en analyse op 300 g zand) het beste, rekening houdend met de werklast die gepaard gaat met de analyses van het zand.

Bij het op punt stellen van de staalname was één zandbak op tien in Roeselare positief voor *Toxocara canis*. Door het uitproberen van verschillende staalnameprocedures werd aangetoond dat deze contaminatie niet homogeen verdeeld was maar slechts plaatselijk. Daarom is het belangrijk om bij staalname een hoge spreidingsgraad te behouden. Indien dit niet wordt gedaan, kan een vals negatief resultaat bekomen worden. De contaminatiegraad van zandbakken in Roeselare ligt wel lager dan verwacht in vergelijking met de buitenlandse studies. Zoals al vermeld, is dit moeilijk te vergelijken door gebruik van verschillende methoden. Deze studie was uiteraard maar een voorstudie en werd niet uitgevoerd om de contaminatie in kaart te brengen. Ook was ze beperkt in ruimte; slechts tien zandbakken werden onderzocht in één bepaalde stad.

Bij de staalnames werd al snel duidelijk dat de zandbakken niet enkel door kinderen werd bezocht maar ook door hond en kat. Bij twaalf van de achtendertig staalnames werden uitwerpselen gevonden, bij drie staalnames een kat gespot en bij twee staalnames pootafdrukken in het zand van hond én kat. In een aantal steden en gemeenten worden reeds maatregelen genomen om de hondenpoepproblematiek aan te pakken via het hondenbeleid. Zo staan bijvoorbeeld in Roeselare plakaten om honden aan de leiband te houden of hondenpoep op te ruimen. Een kanttekening hierbij is dat deze plakaten niet altijd goed zichtbaar zijn. Het lijkt er op dat de nadruk van het probleem ligt bij honden, terwijl katten misschien wel een hoger aandeel hebben dan gedacht. Katten kunnen namelijk vrij rondlopen en hun behoeftes ongeremd achterlaten in een zandbak. Praktisch is het moeilijker om katten te beperken in ruimte. Het enige waarmee men een kat kan tegenhouden om in een zandbak te kruipen, is door de zandbakken af te dekken.

Drie van de twaalf uitwerpselen die gevonden werden in de zandbakken, waren positief voor *Toxocara*. Indien deze nog recent is, lijkt dit op zich niet zo'n probleem aangezien verwacht wordt dat de eitjes in de uitwerpselen nog niet infectieus zijn. Maar in één van die drie stalen werden ook geëmbryoneerde eitjes gevonden, wat dus wel infectieus is. Ook al is de zandbak zelf niet positief, de uitwerpselen op zich vormen ook al een probleem in de zandbak want dit kan uiteraard ook opgenomen worden door kinderen. Zoals al aangehaald, wil een positief meststaal in een zandbak nog niet zeggen dat het zand daarom positief is of omgekeerd. De drie zandbakken waar uitwerpselen gevonden werden die positief waren voor *Toxocara*, waren zelf negatief. En omgekeerd, in de zandbak die positief was voor *Toxocara*, vonden we drie keer uitwerpselen die negatief waren. Dit geeft indicatie dat de verspreiding van de eitjes traag verloopt en zich uit in plaatselijke contaminatie.

De uitvoering van dit project heeft ook een aantal praktische problemen aan het licht gebracht. Zo was het microscopische luik van het onderzoek veel moeilijker dan vooreerst gedacht. Door de vele artefacten op een preparaat van een zandstaal die lijken op spoelwormeitjes, werd de identificatie bemoeilijkt. Foto's van deze twijfelgevallen werden regelmatig doorgestuurd naar specialisten die ervaring hebben met parasitologisch onderzoek, maar de meesten onder hen waren niet vertrouwd met het onderzoeken van zandstalen en de aanwezigheid van plantenmateriaal. Een preparaat met veel twijfelgevallen werd eens via real-time PCR onderzocht en het resultaat was negatief. Door dit resultaat en het gegeven dat er tijdens deze studie wel degelijk zandstalen met duidelijk herkenbare *Toxocara* eitjes werden teruggevonden, kan er worden gesteld dat men een zandstaal pas positief kan beoordelen op de aanwezigheid van spoelwormeitjes als deze hun typische vorm en de correcte afmetingen vertonen. Duidelijke spoelwormeitjes hebben de juiste afmetingen (*T. canis* 75 x 90 µm

en *T. cati* 65 x 75 µm) en vertonen de typische wandstructuur ('golfbalstructuur') met de juiste kleuren (helderkeurige wand en binnenin een duidelijk afgelijnde grijsachtige structuur). Alle structuren die veel werden gezien en die er op lijken werden allen geregistreerd en opgelijst. Identificatie is nog niet gebeurd maar hiervoor zijn (planten)specialisten nodig. Voor een toekomstig studie kan misschien rekening worden gehouden met het seizoen. In de winter zal namelijk veel minder pollen of ander plantenmateriaal te vinden zijn op het preparaat wat de microscopie makkelijker kan maken.

Een ander discussiepunt bij staalname was het volume van het te onderzoeken zand. Men kan stellen dat het volume zand steeds hetzelfde moet zijn, of het gewicht zand. Indien men kiest voor gewicht, zit men met een beperking van het aantal schepjes. Iedere staalname is namelijk anders. Indien het zand nat is, zal er veel meer zand worden meegenomen per schep dan droog zand dat er makkelijker afglijdt. Indien je teveel zand hebt, blijft er altijd een deel zand (waar mogelijks eitjes in zitten) over dat niet onderzocht wordt. Daarom is het misschien beter om met een marge te werken. In de laatste staalnameprocedure werden zoveel mogelijk schepjes met een zo groot mogelijke spreiding genomen om twee staalnamepotjes te vullen. Er werd ook een marge van gewicht genomen. Als dit goed wordt bijgehouden, kan later even goed het aantal eitjes per gram worden berekend.

In de toekomst is het de bedoeling om met behulp van dit eindwerk en de op punt gestelde procedure, de omgevingscontaminatie met *Toxocara* te bestuderen in een bepaalde regio of stad. Van daaruit kunnen dan maatregelen worden genomen om contaminatie te vermijden en de bevolking te sensibiliseren. Belangrijk hierbij is dat er geen paniek ontstaat, maar dat de mensen goed worden ingelicht met de juiste informatie. Dit zal nog niet direct gebeuren, aangezien nog meer onderzoek nodig is zoals het in kaart brengen van de gecontamineerde plaatsen, de gevolgen van een infectie, de kans op infectie bij opname, enzovoort.

Om af te sluiten kan er gezegd worden dat de opzet van deze studie geslaagd is. De staalnameprocedure is geoptimaliseerd en kan gebruikt worden voor verder onderzoek. In deze voorstudie zijn bovendien vele praktische zaken naar boven gekomen waarmee in de toekomst rekening dient te worden gehouden.

## 7 Bio-ethische reflectie

**Groepsleden gesprek:** Lore De Vos (sociaal), Yaël De Bruyckere (economisch)

*Toxocara* is een parasiet die leeft in de darmen van de hond en de kat. Via de feces kunnen eitjes zich verspreiden. Zo kunnen ze ook in de bodem terecht komen waar ze lange tijd kunnen overleven en infectieus blijven. Hier schuilt het gevaar dat ze kunnen opgenomen worden door een andere gastheer dan de hond of kat. In een andere gastheer, bijvoorbeeld de mens, kunnen ze ernstige aandoeningen veroorzaken. Zo kunnen ze blind worden of ernstige leverschade krijgen.

Er bestaat dus een risico voor de volksgezondheid. Om te weten te komen hoe groot dit risico is, wordt dit onderzoek uitgevoerd. Buitenlandse studies tonen namelijk aan dat er duidelijke bodemcontaminatie is op plaatsen waar veel honden en katten komen zoals op speelpleinen, zandbakken, achtertuinen, enzovoort. Hier kunnen ook kinderen komen, wat het risico op besmetting beduidend groter maakt. Dit eindwerk is een eerste onderzoek dat plaatsvindt om de staalnameprocedure op punt te stellen. Indien de volledige studie afgewerkt is, kan men met de feiten van contaminatie naar de overheid stappen om aan te tonen dat er duidelijk gevaar is. Op die manier kan men maatregelen treffen om zo aan preventie te doen en het risico op besmetting te doen dalen.

Om de duurzaamheid van dit eindwerk eens na te gaan, zal dit vanuit drie standpunten bekeken worden, namelijk het economische, ecologische en sociale standpunt.

**Economisch** gezien zal dit zeker een kost zijn voor de overheid. Enerzijds om dit onderzoek te financieren en anderzijds om later maatregelen te treffen. Men zal de bevolking moeten sensibiliseren om de hondensoep altijd op te ruimen. Steden en gemeenten zullen een hondenbeleid moeten invoeren. Hierdoor kunnen de gemeentebelastingen stijgen. Ook zullen de mensen hun huisdieren regelmatig moeten ontwormen. De dierenartsen zullen dan ook hun ontwormingsstandaarden moeten aanpassen. Dit kan dan weer positieve gevolgen hebben voor de farmaceutische industrie die de ontwormingsmiddelen produceren.

Indien we dit **ecologisch** bekijken, kunnen we ook een aantal opmerkingen maken. Doordat er hier in Vlaanderen redelijk veel honden en katten gehouden worden op een kleine oppervlakte, is er een hoge infectiedruk. De bodemcontaminatie zal op die manier alleen maar toenemen. Ook stijgt de kans op besmetting van wilde populaties hondachtigen zoals van vossen en wolven. De populaties kunnen aangetast worden en bij besmetting kunnen ze zo de eitjes verder en verder verspreiden.

Als laatste bekijken we dit onderwerp vanuit het **sociale** standpunt. Het is algemeen geweten dat *Toxocara* een gevaar betekent voor de volksgezondheid. Hierdoor moet men de bevolking sensibiliseren. De mensen moeten weten dat er gevaar dreigt en wat ze er aan kunnen doen. Als men bijvoorbeeld tuinierd, moet men handschoenen dragen of toch zeker grondig de handen wassen na tuinieren. Ook kinderen moet men zeker behoeden voor de gevaren van speeltuinen en zandbakken. Als ze gespeeld hebben in de zandbakken, moeten ze ook zeker hun handen wassen. Huisdieren houdt men best weg van zandbakken door ze bijvoorbeeld af te dekken. Naast deze maatregelen zal men zijn huisdier nog regelmatig moeten ontwormen. De hondensoep zullen ze ook steeds moeten opruimen. Nu al is er overlast in bepaalde steden of gemeenten. Bepaalde gemeentes hebben dan ook al een hondenbeleid ingevoerd. Men kan bijvoorbeeld beboet worden indien men de hondensoep niet opruimt. Bepaalde parken of speeltuinen zijn ook niet meer toegankelijk voor honden. Na het volledig onderzoek zouden deze maatregelen sterk uitgebreid kunnen worden tot nationaal niveau.

Als hier een besluit voor moet gevormd worden, kan men zeggen dat dit eindwerkonderwerp een duurzaam project is. Hier ligt de nadruk voornamelijk op het sociaal vlak, want het risico voor de volksgezondheid is de hoofdoorzaak voor dit onderzoek. Om de duurzame doelen na te komen, zal nog meer onderzoek verricht moeten worden.

## 8 Publiceerbaar artikel

### PARASieten IN ZANDBAKKEN: OOK BIJ ONS?

*Buiten spelen is gezond, of toch niet helemaal? Meer en meer studies uit het buitenland tonen aan dat zandbakken, stadsparken en speeltuinen besmet zijn met parasieten. Meer nog, ze zouden mee aan de oorzaak liggen van allergieën en astma bij kinderen. Voor het eerst wordt nu ook onderzocht hoe het in België gesteld is met de besmettingsgraad van openbare plaatsen.*

Men zegt vaak dat we niet te proper moeten leven om zo een goed immuunsysteem te kweken. Zo laten we onze kinderen bijvoorbeeld ravotten in de tuin en spelen in de zandbak. Toch blijkt dit niet helemaal zonder gevaar, want in een zandbak kunnen zich namelijk eitjes van parasieten bevinden die er terecht komen via de uitwerpselen van hond en kat. Zo blijkt het toch uit vele buitenlandse studies, zoals bijvoorbeeld bij onze noorderburen. Daar zou 10 tot 30 % van de parken en 30 tot 70 % van de zandbakken besmet zijn.

#### Wat ligt aan de basis van dit probleem?

Hond en kat zijn drager van verschillende parasieten, waaronder ook van de spoelworm "*Toxocara*". De eitjes van deze spoelworm worden via de uitwerpselen in de omgeving verspreid. Helaas zijn uitwerpselen een vast beeld in de straat geworden en vind je ze regelmatig in stadsparken, op speelpleinen en zelfs in zandbakken. Veel hondeneigenaars die op wandel zijn met hun hond, ruimen nog steeds de hondenpoep niet op. Een groeiend aantal steden en gemeenten neemt het voortouw met de uitwerking van een heus hondenbeleid. Dit zijn maatregelen die men neemt om de bevolking te sensibiliseren. Men zal bijvoorbeeld plakaten zetten, brochures rondsturen, hondentoiletten installeren enzovoort. Helaas hebben nog steeds niet alle steden en gemeenten een dergelijk beleid.

Een bijkomend probleem is dat ook katten verantwoordelijk zijn voor de besmetting van speelruimtes met spoelwormeitjes, vooral in regio's met veel zwervkatten. Aangezien je katten weinig beperkingen kunt opleggen, is dit minder makkelijk aan te pakken. De enige mogelijke manier om deze tegen te houden is om plaatsen fysiek af te sluiten en onbereikbaar te maken voor katten. Praktisch is dit bijna onmogelijk, behalve misschien bij

zandbakken die met een deksel kunnen worden afgedekt.

#### Wat zijn de gevolgen?

Vooral uitwerpselen in zand vormen een probleem aangezien dit makkelijker kan opgenomen worden door kinderen. De spoelwormeitjes die zich in de drollen bevinden, worden verspreid over de bodem. Bij opname van een deel van deze bodem kunnen kinderen namelijk Toxocariasis ontwikkelen. Dit betekent zoveel als een infectie met de honden- of kattenspoelworm. Uit deze eitjes komt een larve die migreert doorheen het lichaam. De migrerende larven kunnen zich weliswaar niet ontwikkelen in de darm om uit te groeien tot een volwassen spoelworm, maar in plaats daarvan blijven ze steken in een orgaan zoals het oog of de lever. Veelal veroorzaakt dit geen noemenswaardige problemen, maar in sommige gevallen kunnen ze schade aanrichten die kan leiden tot ernstige ziektesymptomen. Daarnaast gaan er ook meer en meer stemmen op dat er een verband zou bestaan tussen een *Toxocara* infectie en het voorkomen van allergieën en astma bij kinderen.

#### Hoe zit het in België?

Wereldwijd werden al talrijke studies uitgevoerd om de besmettingsgraad van openbare plaatsen met deze parasiet te onderzoeken, waarbij de resultaten sterk variëren. De vraag is hoe het nu zit bij ons. Het Expertisecentrum Agro- en biotechnologie van de Hogeschool Vives wil hier een antwoord op bieden. De eerste voorbereidende studies zijn reeds achter de rug. De technieken om de parasieteneitjes in de bodem terug te vinden, werden door studenten en onderzoekers van Vives op punt gesteld en ook de manier van staalname in zandbakken werd onder de loep



genomen. Hiervoor werden al enkele zandbakken in Roeselare onderzocht.

Bij het nemen van de stalen werd al snel duidelijk dat zandbakken niet enkel door kinderen worden bezocht maar ook door honden en katten. Zo zagen we bij 1/3<sup>e</sup> van de staalnames uitwerpselen liggen in de zandbak. In een aantal van deze uitwerpselen werden effectief spoelwormeitjes gevonden. Bij een aantal staalnames werd ook de dader zelf gespot (zie foto) of een pootafdruk er van.



#### **Wat kunnen we er aan doen?**

Om besmetting van de omgeving tegen te gaan, kunnen op verschillende niveaus

maatregelen worden genomen. Zo moeten honden en katten regelmatig ontwormd worden. Dierenartsen kunnen hier een belangrijke rol in spelen door de mensen voldoende te informeren over het belang voor de volksgezondheid. Door te ontwormen, zijn minder honden en katten drager van de parasieten en zal er dus minder uitscheiding zijn van parasieteneitjes in de omgeving. Een andere manier om besmetting van de omgeving te vermijden, is de uitwerpselen steeds opruimen, of beter nog, de toegang voor honden en katten tot openbare speelruimten beperken.

Uiteraard blijft ook hygiëne een belangrijk aandachtspunt. Kinderen die buiten hebben gespeeld, moeten steeds hun handen wassen.

#### **Besluit**

Ook in België zijn openbare plaatsen zoals zandbakken en speeltuinen ongetwijfeld besmet met parasieteneitjes. Hoe groot die besmettingsgraad precies is, zullen toekomstige studies moeten uitwijzen. De aanzet is alvast gegeven.

## 9 Persoonlijke visie op de stage en het stagebedrijf

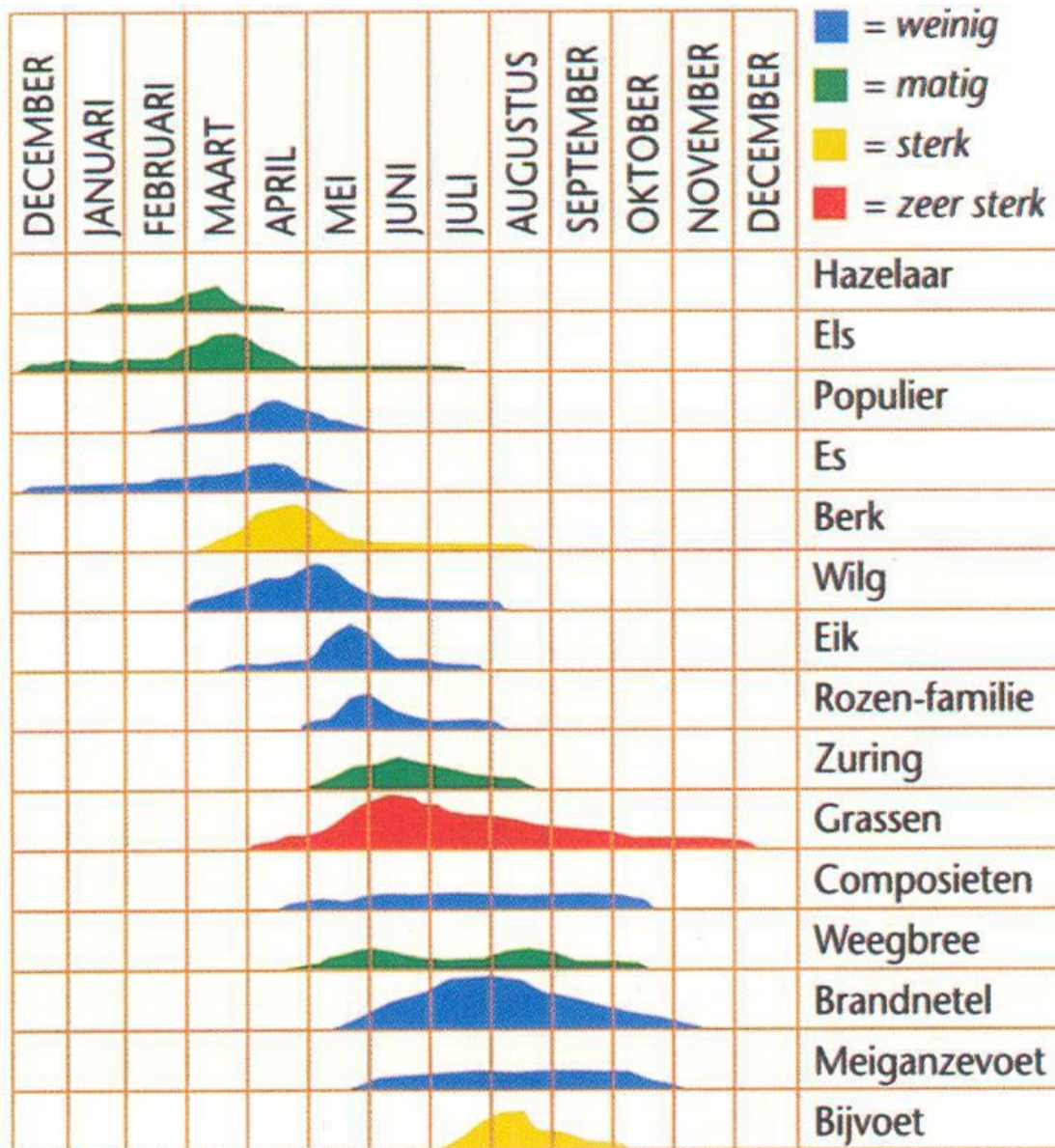
Deze stage was er één in functie van het onderzoek. Het was heel leerrijk en tof door de flexibiliteit er van. In een onderzoek is het verloop ervan namelijk onvoorspelbaar. Hierin werd ik redelijk zelfstandig gelaten om het onderzoek uit te voeren, wat ik zeker positief vond.

Dit is uiteraard een zeer mooie aanvulling op mijn huidige opleiding. Door het maatschappelijk thema dat hierin aangehaald wordt, leer ik kritischer denken. Je leert goed zelfstandig werken en vooral praktisch plannen in een labo.

Het Expertisecentrum van de Vives hogeschool is zeker en vast een goede stageplek voor studenten. Het voordeel hiervan is dat men zaken intern sneller en makkelijker kan regelen. De student kan een bijdrage betekenen op bepaalde maatschappelijke projecten en wetenschappelijk onderzoek. Hierbij is de vrijheid die je hebt groter dan in de bedrijfswereld waar je veelal beperkingen hebt op gebied van onderzoek. Een nadeel hierbij is dat je als student geen nieuw bedrijf leert kennen en je dus niet laat kennen aan de bedrijfswereld (denk maar aan toekomstig werk). Je leert ook geen nieuwe mensen kennen maar lectoren of onderzoekmedewerkers worden collega's.

Dit was zeker een stage die aan te raden is. Ik heb er veel uit geleerd en deze stage bevestigt nog maar eens mijn interesse in labo werk.

Bijlagen



Figuur 57: Kalender met de bloeiperiode van bepaalde planten.

### **Lijst met gebruikte afkortingen**

Real-time PCR: real-time polymerase chain reaction

**Lijst met figuren**

Figuur 1: Kopvleugels en eieren bij <i>Toxocara canis</i> (A) en <i>cati</i> (B).	8
Figuur 2: Levenscyclus en transmissie van <i>Toxocara canis</i> .	9
Figuur 3: Staalname patronen, A transversaal, B uniform of gelijkmatig, C willekeurig.	25
Figuur 4: Kopvleugels en eieren bij <i>Toxocara canis</i> (A) en <i>cati</i> (B).	30
Figuur 5: Zeeftoestel schematisch	32
Figuur 6: Zeeftoestel	32
Figuur 7: Sedimentatie	33
Figuur 8: Centrifugeerbuisje na oproeren.	34
Figuur 9: Centrifugeerbuisje na centrifugatie	34
Figuur 10: Flotatie met dekglasje op bolle meniscus.	34
Figuur 11: Kopvleugels van een hondenspoelworm.	39
Figuur 12: Kopvleugels van een kattenspoelworm.	39
Figuur 13: Standaardplakkaat speelplein	43
Figuur 14: Plakkaat voor opruimen van hondenpoep	43
Figuur 15: Close up van plakkaat met reglement van de stad Roeselare.	43
Figuur 16: Verbodsbepaling voor honden.	43
Figuur 17: Plakkaat met reglement van de stad Roeselare + honden aan de leiband	43
Figuur 18: Plakkaat voor honden aan leiband	43
Figuur 19: Kat gespot in zandbak bij staalname 2-19-0204.	43
Figuur 20: Pootafdrukken van een kat	44
Figuur 21: Pootafdrukken van een hond.	44
Figuur 22: Microscopiebeeld van fecesstaal F30-15-1305 met gelarveerde <i>Toxocara</i> eitjes (100 x vergroting).	44
Figuur 23: Microscopiebeeld van een gelarveerd <i>Strongyloide</i> eitje (28,6 x 52 µm bij 400 x vergroting).	44
Figuur 24: Eencellig stadium (75 µm).	46
Figuur 25: Tweecellig stadium (71 µm x 83 µm)	46
Figuur 26: Viercellig stadium (65 x 67,6 µm)	46
Figuur 27: Vroege morula stadium (78 x 83,2 µm)	46
Figuur 28: Blastula stadium (78 x 83,2 µm)	46
Figuur 29: Larvaal stadium (65 µm x 83,2 µm)	46
Figuur 30: 80-90 µm bij 400x vergroting.	47
Figuur 31: 80-90 µm bij 400x vergroting.	47
Figuur 32: 72 x 75 µm bij 400x vergroting	47
Figuur 33: 67,6 µm x 111,8 µm bij 400x vergroting.	47

Figuur 34: 85,8 $\mu\text{m}$ bij 400x vergroting .....	47
Figuur 35: 78 $\mu\text{m}$ bij 400x vergroting .....	47
Figuur 36: 130 $\mu\text{m}$ lengte bij 400x vergroting.....	47
Figuur 37: 62,4 $\mu\text{m}$ lengte bij 400x vergroting.....	47
Figuur 38: 98,8 $\mu\text{m}$ lengte bij 400x vergroting.....	47
Figuur 39: 52 $\mu\text{m}$ x 104 $\mu\text{m}$ bij 400x vergroting.....	47
Figuur 40: 41,6 $\mu\text{m}$ bij 400x vergroting .....	47
Figuur 41: 78 $\mu\text{m}$ lengte bij 400x vergroting.....	47
Figuur 42: 85,8 $\mu\text{m}$ bij 400x vergroting .....	47
Figuur 43: 98,8 $\mu\text{m}$ bij 400x vergroting .....	47
Figuur 44: 78 $\mu\text{m}$ x 90 $\mu\text{m}$ bij 400x vergroting .....	47
Figuur 45: 98,8 x 104 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 46: 109,2 x 111,7 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 47: 90 x 114,4 $\mu\text{m}$ bij 100 x vergroting .....	48
Figuur 48: 90 x 114,4 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 49: Tussen 100 en 117 $\mu\text{m}$ bij 100 x vergroting.....	48
Figuur 50: 98,8 $\mu\text{m}$ x 117 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting.....	48
Figuur 51: 124,8 $\mu\text{m}$ x 143 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting.....	48
Figuur 52: 104 x 117 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 53: 90 x 114,4 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 54: 90 x 114,4 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 55: 111,8 x 143 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 56: 65 x 85,8 $\mu\text{m}$ bij 400 x vergroting .....	48
Figuur 57: Kalender met de bloeiperiode van bepaalde planten. ....	I

**Lijst met tabellen**

Tabel 1: Classificatie van <i>Toxocara canis</i> en <i>cati</i> . .....	8
Tabel 2: Wereldwijde bodemcontaminatie van <i>Toxocara</i> spp. eitjes, gesorteerd volgens continent en referentiejaar. ....	20
Tabel 3: Percentages van positieve grond- en grasstalen met <i>T. canis</i> eitjes in parken verdeeld in verschillende categorieën (Utrecht). ....	22
Tabel 4: Aantallen en percentages positieve stalen met <i>T. cati</i> en <i>canis</i> eitjes in zandbakken verdeeld naar verzorgingsgraad en diepte. (N = totaal aantal stalen) (Utrecht).....	22
Tabel 5: Voorkomen van <i>Toxocara</i> spp. eitjes in bodemstalen in Polen (Mizgajska, 2001). ....	23
Tabel 6: Vergelijkende studie in Lodz, Polen in herfst 2010 en lente 2011 (O = omheind, NO = niet omheind, DO = deels omheind). ....	24
Tabel 7: Verdeling van <i>T. canis</i> en <i>cati</i> eitjes in een bodem van los zand, 1 jaar na experimentele contaminatie ervan met 35 000 eitjes (Mizgajska, 1998).....	25
Tabel 8: Vergelijking resultaten van studies op verschillende dieptes. ....	26
Tabel 9: Vergelijking studies naar aantal eitjes per aantal gram. ....	26
Tabel 10: <i>Toxocara</i> primers en probes volgens Durant <i>et al.</i> (2013). ....	36
Tabel 11: Overzicht van samenstelling PCR mastermix met concentraties en volumes.....	36
Tabel 12: Standaard vragenlijst bij staalname. ....	38
Tabel 13: Resultaten van differentiatie van de <i>Toxocara</i> species via microscopie. ....	39
Tabel 14: Resultaten van de real-time PCR op weefsel van <i>Toxocara</i> wormen. (rood = <i>T. canis</i> , blauw = <i>T. cati</i> ).....	40
Tabel 15: Resultaat van de spiking experimenten. ....	41
Tabel 16: Aantal eitjes voor real-time PCR van <i>T. canis</i> en <i>cati</i> eitjes. ....	41
Tabel 17: Resultaten positieve feces. ....	45
Tabel 18: Overzicht van <i>Toxocara</i> eitjes in verschillende embryoneringsstadia (400 x vergroting). ....	46
Tabel 19: Overzicht van veel voorkomende microscopiebeelden.....	48

**Lijst met grafieken**

Grafiek 1: Resultaat van de real-time PCR bij een DNA-staal van <i>T. cati</i> .....	14
Grafiek 2: Prevalentie van <i>Toxocara</i> eitjes in de bodem van parken, achtertuinen, zandbakken, asielen en landelijke gebieden in Praag. ....	23
Grafiek 3: Real-time PCR resultaat van spoelworm 00177-1. ....	40
Grafiek 4: Real-time PCR resultaat van spoelworm 229. ....	40
Grafiek 5: Real-time PCR resultaat van spoelworm 070414-1 ....	40
Grafiek 6: Resultaat real-time PCR van <i>T. canis</i> eitjes met signaal bij 1000 en 124 eitjes. (rood = <i>T. canis</i> , blauw = <i>T. cati</i> ) .....	41
Grafiek 7: Resultaat real-time PCR van <i>T. cati</i> eitjes met signaal bij 1000 en 120 eitjes. (rood = <i>T. canis</i> , blauw = <i>T. cati</i> ) .....	42
Grafiek 8: Resultaat real-time PCR van <i>Toxocara cati</i> eitjes in F11-30-1604 (onverdund en 1/10 verdund) (rood = <i>T. canis</i> , blauw = <i>T. cati</i> ).....	45
Grafiek 9: Resultaat real-time PCR van 19-18-2804. (rood = <i>T. canis</i> , blauw = <i>T. cati</i> ).....	49



## Bronvermelding

### Artikels

ABE, N., YASUKAWA, A., 'Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in sandpits of parks in Osaka city, Japan, with notes on the prevention of egg contamination by fence construction', Journal veterinary medical science, 1997, 59, p. 79-80.

BLASZKOWSKA, J., WOJCIK, A., KURNATOWSKI, P., SZWABE, K., 'Geohelminth egg contamination of children's play areas in the city of Lodz (Poland)', Veterinary Parasitology, 2013, 192, p. 228-233.

CHILDS, J. E., 'The prevalence of *Toxocara* species ova in backyards and gardens of Baltimore, Maryland', Public health, 1985, 75, p. 1092-1094.

CLAEREBOUT, E., CASAERT, S., DALEMANS, A., -C., DE WILDE, N., LEVECKE, B., VERCRUYSSSE, J., GEURDEN, T., '*Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium', Veterinary parasitology, 2009, 161, p.41-46.

DUBNA, S., LANGROVA, I., JANKOVSKA, I., VADLEJCH, J., PEKAR, S., NAPRAVNIK, J., FECHTNER, J., 'Contamination of soil with *Toxocara* eggs in urban (Prague) and rural areas in the Czech Republic', Veterinary parasitology, 2006, 144, p. 81-86.

DUPONT, S., BUTAYE, P., CLAEREBOUT, E., THEUNS, S., DUCHATEAU, L., VAN DE MAELE, I., DAMINET, S., 'Enteropathogens in pups from pet shops and breeding facilities', Journal of small animal practice, 2013, 54, p. 475-480.

DURANT, J., IRENGE, L., FOGT-WYRWAS, R., DUMONT, C., DOUCET, J., MIGNON, B., LOSSON, B., GALA, J., 'Duplex quantitative real-time PCR assay for the detection and discrimination of the eggs of *Toxocara canis* and *Toxocara cati* (Nematoda, Ascaridoidea) in soil and fecal samples', Parasites & Vectors, 2012, 5, 288.

FAHRION, A.S., SCHNYDER, M., WICHERT, B., DEPLAZES, P., '*Toxocara* eggs shed by dogs and cats and their molecular and morphometric species-specific identification: Is the finding of *T. cati* eggs shed by dogs of epidemiological relevance?', Veterinary parasitology, 2011, 177, p. 186-189.

FERRE, P., DORCHIES, PH., 'Recherche des oeufs de *Toxocara* dans le sable des aires de jeux de huit jardins publics de Toulouse', Revue Méd. Vét., 2000, 151, p. 501-506.

FISHER, M., '*Toxocara cati*: an underestimated zoonotic agent', Trends in parasitology, 2003, 19, p. 167-170.

HABLUETZEL, A., TRALDI, G., RUGGIERI, S., ATTILI, A.R., SCUPPA, P., MARCHETTI, R., MENGHINI, G., ESPOSITO, F., 'An estimation of *Toxocara canis* prevalence in dogs, environmental egg contamination and risk of human infection in the Marche region of Italy', Veterinary parasitology, 2003, 113, p.243-252.

JANSEN, J., VAN KNAPEN, F., SCHREURS, M., VAN WIJNGAARDEN, TH., '*Toxocara* eieren in parken en zandbakken in de stad Utrecht', Tijdschrift voor diergeneeskunde, 1993, deel 118, aflevering 19, p. 611-614.

KHAZAN, H., KHAZAEI, M., SEYYED TABAEE, SJ, MEHRABI, A., 'Prevalence of *Toxocara* spp. eggs in public parks in Tehran city Iran', Iranian journal parasitology, 2012, vol. 7, nr. 3, p. 38-42.

LESCANO, AZ., S., CHIEFFI, P.P., A PERES, B., O DE MELLO, E., NAQUIRA VELARDE, C., APAZA SALNIAS, A., ESTACIO ROJAS, C., 'Soil contamination and human infection by *Toxocara* sp. In the urban area of Lima, Peru', Mem inst oswaldo cruz, 1998, vol. 93, nov/dec, p. 733-734.

MORGAN, E.R., AZAM, D., PEGLER, K., 'Quantifying sources of environmental contamination with *Toxocara* spp. eggs', Veterinary parasitology, 2013, 193, p. 390-397.

OVERGAAUW, P., VAN KNAPEN, F., 'Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp', Veterinary parasitology, 2013; 193, p. 398-403.

SPRENGER, L.K., GREEN, K.T., MOLENTO, M.B., 'Geohelminth contamination of public areas and epidemiological risk factors in Curitiba, Brazil', Veterinary parasitology, 2014, 23, nr. 1, p. 69-73.

SURGAN, M. H., PHD, COLGAN, K. B., KENNETT, S. I., PAFFMANN, J. V., 'A survey of canine toxocariasis and *Toxocara* soil contamination in Essex Country, New Jersey', Public health, 1980, 70, p 1207-1208.

### **Boeken**

HOLLAND, C.V., SMITH, H.V., 'Toxocara the enigmetic parasite', Cabi Publishing, 2006, p. 211-227.

THIENPONT, D., ROCHETTE, F., VANPARIJS, O.F.J., 'Diagnosing helminthiasis by coprological examination', Janssen animal health, Beerse, 2003, 215 p.

VANDENBERGHE, F., DEPUYDT, L., 'Hondenpoep in Vlaanderen: alternatieven voor preventie en verwerking', OVAM, Mechelen, 2010, 289 p.

VANDENBERGHE, F., 'Infectieziekten en zoönosen', Vives HIVB, Roeselare, 2012, 147 p.

VANHEE, M., 'Diagnostische labotechnieken', Vives HIVB, Roeselare, 2013, 52 p.

VIAENE, J. Parasitologie, Vives HIVB, Roeselare, 2011, 161 p.

### **Internet**

IAA, 'Pollenatlas', internet, 22-04-2014, (<http://www.polleninfo.org/SE/se/allergy-infos/aerobiologics/pollen-atlas.html?letter=A>).

NCBI, 'Toxocara', internet, 19-04-2014, ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6264&lvl=3&p=mapview&p=has\\_linkout&p=blast\\_url&p=genome\\_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=6264&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock)).

VIVES, 'Expertisecentrum dier-en-zorg', internet, 24-05-2012, (<http://www.katho.be/page.aspx?smid=773>).

### **Verslagen**

VANLERBERGHE, A., TIMMERMAN, M., DIERICK, W., DEMEERSSEMAN, T., 'Optimaliseren van de zeefttechniek voor het opsporen van *Toxocara* eitjes in bodemstalen', Vives HIVB, Roeselare, 2014, 45 p.