

UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT DIERGENEESKUNDE
Academiejaar 2014-2015

EEN GEVAL VAN STEATITIS BIJ DE VALKPARKIET (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*)

door

Astrid STROOBANTS

Promotor: Tom Hellebuyck

Copromotor: Prof. Dr. An Martel

Klinische casusbespreking in
het kader van de masterproef

© 2015 Astrid Stroobants

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

UNIVERSITEIT GENT
FACULTEIT DIERGENEESKUNDE
Academiejaar 2014-2015

EEN GEVAL VAN STEATITIS BIJ DE VALKPARKIET (*NYMPHICUS HOLLANDICUS*)

door

Astrid STROOBANTS

Promotor: Tom Hellebuyck

Copromotor: Prof. Dr. An Martel

Klinische casusbespreking in

het kader van de masterproef

© 2015 Astrid Stroobants

VOORWOORD

Eerst en vooral zou ik graag mijn promotor, Tom Hellebuyck, willen bedanken voor de begeleiding tijdens deze masterproef. Mijn vragen werden snel beantwoord en de stukjes tekst die ik doorstuurde werden altijd snel verbeterd. Het was aangenaam om telkens een opbouwende feedback te ontvangen. Verder zou ik ook mijn ouders willen bedanken voor de steun tijdens het schrijven en de financiële middelen die het mogelijk maken om deze studie tot een goed einde te brengen. Als laatste zou ik Leen Croes willen bedanken voor de hulp met de lay-out van deze masterproef.

INHOUDSOPGAVE

SAMENVATTING	1
INLEIDING.....	2
1. Klinische casus.....	3
1.1. Signalement.....	3
1.2. Anamnese	3
1.3. Onderzoek	3
1.3.1. Klinisch onderzoek.....	3
1.3.2. Bloedonderzoek.....	4
1.4. Differentiaal diagnose.....	5
1.5. Plan.....	5
1.5.1. Chirurgie.....	5
1.5.2 Histologie.....	6
1.6. Diagnose.....	6
1.7. Opvolging.....	6
2. Bespreking.....	7
2.1. Differentiaal diagnose voor een massa ter hoogte van de vleugel	7
2.1.1. Absces	7
2.1.2. Granuloom	8
2.1.3. Hematoom	9
2.1.4. Vederfollikel cyste	9
2.1.5. Metabole afzettingen	9
2.1.5.1. Xanthoma	9
2.1.5.2. Steatitis.....	11
2.1.6. Neoplasie.....	13
2.1.6.1. Lipoma/Liposarcoma	13
2.1.6.2. Basaal cel tumoren.....	15
2.1.6.3. Plaveiselcelcarcinoma	15
2.1.6.4. Fibroma/fibrosarcoma.....	16
2.1.6.5. Hemangioma/hemangiosarcoma	18
2.2. Diagnostische benadering van een massa ter hoogte van de vleugel.....	21
2.2.1. Anamnese.....	21
2.2.2. Klinisch onderzoek	21
2.2.3. Hematologisch en biochemisch onderzoek.....	21
2.2.4. Cytologie	21
2.2.5. Radiografie	22
2.2.6. Histologie.....	22
2.3. Therapeutische benadering steatitis bij vogels	22
CONCLUSIE.....	24
REFERENTIES.....	26

SAMENVATTING

Deze casus handelt over een valkparkiet (*Nymphicus hollandicus*) met een massa ter hoogte van de vleugel. De vogel gaf een suffe indruk tijdens het klinisch onderzoek en aan de linkervleugel was een nodulaire massa van ongeveer 2,5 cm diameter te zien ter hoogte van de carpometacarpus. Op het bloedonderzoek was een sterke verhoging van creatine kinase de meest opmerkelijke bevinding. Vanwege de omvang, lokalisatie en invasiviteit van de massa werd gekozen voor een en bloc resectie van de carpometacarpus. Op basis van het klinisch verloop en het uitzicht van de massa werd de waarschijnlijkheidsdiagnose van een neoplastisch proces gesteld. Na chirurgische verwijdering werd de massa opgestuurd voor histologisch onderzoek. Op de weefselcoupes waren multifocale calcificaties te zien samen met een toename van macrofagen en heterofielen. Ook in het omliggende vetweefsel was er een toename van heterofielen aanwezig. Op basis van het histologisch onderzoek kon men concluderen dat er steatitis aanwezig was ter hoogte van de nodulaire massa samen met secundaire calcificaties. De chirurgische wegname leidde tot een volledige klinische genezing. Na de casusbeschrijving wordt er dieper ingegaan op de diagnostische benadering van een massa ter hoogte van de vleugel. Vervolgens wordt de therapeutische benadering van steatitis bij vogels kort toegelicht.

INLEIDING

Steatitis is een aandoening gekenmerkt door inflammatie en geelverkleuring van het vetweefsel. Het kan gelokaliseerd of veralgemeend voorkomen over heel het lichaam. Het is beschreven bij verscheidene diersoorten waaronder honden (Brown et al., 1994), katten (Munson et al., 1958), paarden (Taylor et al., 1988) en vogels. Bij vogels is een vitamine E-deficiëntie de meest voorkomende gekende oorzaak van de aandoening (Neagari, 2011). Deze deficiëntie kan ontstaan door een tekort aan vitamine E in het dieet, door de consumptie van grote hoeveelheden onverzadigde vetzuren of door beiden. De opname van vitamine E hangt samen met de opname van onverzadigde vetzuren. Grote hoeveelheden zullen er voor zorgen dat de opname van het vitamine geremd wordt (Gershoff, 1962, Niza et al., 2003).

Vitamine E is een anti-oxidant dat belangrijk is voor het behoud van de stabiliteit van celmembranen. Wanneer er een tekort is aan vitamine E zal het diëtair- en het lichaamsvet een oxidatieve degeneratie ondergaan, wat leidt tot de vorming van peroxiden en hydroperoxiden (Niza et al., 2003). Accumulatie van deze peroxiden resulteert in necrose, gevolgd door inflammatie van het aangetaste vetweefsel. Hierdoor ontstaan vaste nodulaire massa's (Watson, 1998).

De meeste gevallen van steatitis werden beschreven bij piscivore vogels die op een dieet van uitsluitend vis stonden (Wagner en Dietlein, 1970, Nichols et al., 1986, Dierenfeld, 1989, Pollock et al., 1999). Over de oorzaak bij vogels die geen visdieet krijgen, is nog niet veel bekend. Ook hier zou een dieet met te hoge concentraties onverzadigde vetzuren een rol kunnen spelen in het ontstaan van steatitis (Campbell, 1987, Wilson, 1994).

Deze masterproef beschrijft de casus van een valkparkiet met gelokaliseerde steatitis ter hoogte van de carpometacarpus. Eerst worden de onderzoeken besproken die werden uitgevoerd om tot de diagnose te komen en vervolgens de toegepaste therapie. Verschillende aandoeningen bij vogels kunnen resulteren in een identieke klinische presentatie en steatitis is een minder frequente oorzaak van een nodulaire massa ter hoogte van de vleugel in vergelijking met bijvoorbeeld neoplasieën. Hierdoor zal vervolgens ook de diagnostische benadering van een massa ter hoogte van de vleugel toegelicht worden. Uiteindelijk zullen de behandelingsmogelijkheden voor steatitis bij vogels kort besproken worden.

1. Klinische casus

1.1. Signalement

Deze casus gaat over een vrouwelijke valkparkiet (*Nymphicus hollandicus*). Op het moment van aanbieden op 27 februari 2014 was ze 8 jaar oud.

1.2. Anamnese

De valkparkiet werd aangeboden met een massa ter hoogte van de linkervleugel. Deze massa was al een tweetal jaar aanwezig en was geleidelijk aan gegroeid tot een duidelijke nodule met een diameter van ongeveer 2,5 cm. Volgens de eigenaar had de vogel er geen last van, ze kon enkel niet meer vliegen ten gevolge van de omvang en lokalisatie van de massa. De vogel legde vroeger ook vaak eieren maar dit had ze al ongeveer een jaar niet meer gedaan. De parkiet leeft in een typische vogelkooi met drie ronde zitstokken, twee schommels en een spiegeltje met een belletje aan. Ze komt niet meer uit haar kooi sinds ze niet meer kan vliegen. Als voeding krijgt ze een zaadmengeling en brood. Ze heeft een zeer goede eetlust maar vertoonde de laatste weken een suffere indruk.

1.3. Onderzoek

1.3.1. Klinisch onderzoek

De vogel gaf een algemeen suffe indruk en liet haar vleugels hangen. Ze had een goede voedingstoestand. Op de linkervleugel was een massa van ongeveer 2,5 cm diameter te zien ter hoogte van de carpometacarpus. Hierover liep een groot bloedvat dat zichtbaar was onder de huid (Fig. 1). De massa voelde relatief zacht en niet omkapseld aan. Na overleg met de eigenaars werd er besloten over te gaan tot chirurgische verwijdering van de massa waarbij er vermoedelijk een volledige amputatie van de carpometacarpus uitgevoerd zou worden. Voorgaand aan de chirurgische ingreep werd er een algemeen bloedonderzoek gedaan omwille van de algemeen suffe indruk die werd vastgesteld tijdens het klinisch onderzoek van de valkparkiet.



Fig. 1: Casus: Valkparkiet (*N. Hollandicus*) met een massa ter hoogte van de carpometacarpus.

1.3.2. Bloedonderzoek

Tabel 1: Biochemische waarden vastgesteld bij een valkparkiet (*N. hollandicus*) met een Vetscan analyser (Referentiewaarden uit Tully et al., 2009).

	Waarden	Referentiewaarden
AST	159 U/l	95-345 U/l
BA	< 35 µmol/l	20-85 µmol/l
CK	1110 U/l	30-245 U/l
UA	1,9 mg/dl	3.5-10.5 mg/dl
GLU	323 mg/dl	200-445 mg/dl
Ca	7,5 mg/dl	8.0-13.0 mg/dl
PHOS	3,2 mg/dl	3.2-4.8 mg/dl
TP	2,3 g/dl	2.4-4.1 g/dl
ALB	2,2 g/dl	0.7-1.8 g/dl
GLOB	0,1 g/dl	2.5-3.8 g/dl
K+	3,3 mmol/l	2.4-4.6 mmol/l
Na+	160 mmol/l	130-153 mmol/l

Op het bloedonderzoek (Tabel 1) is een sterke verhoging van creatine kinase (CK) op te merken. Dit is indicatief voor schade aan de skelet- of hartspier. Door een verstoring in de functie en permeabiliteit van de celmembranen van de spiercel zal er cellyse ontstaan (Sandercock et al., 2001). Hierdoor zullen de intracellulaire enzymen zoals creatine kinase en aspartaat aminotransferase (AST) in het bloed terecht komen. De CK waarde is echter het meest indicatief voor spierschade (Bollinger et al., 1989). Stress bij het vangen en de transport, hyperthermie of veranderingen in het zuur-base evenwicht ter hoogte van de spiercellen kunnen een verhoging van creatine kinase veroorzaken (Sandercock et al., 2001). Ook het albumine is licht verhoogd. Men kan hier echter opmerken dat bij vogels een accurate bepaling van het albuminegehalte het best uitgevoerd wordt via elektroforese (Tully et al., 2009). Vermits de bloedwaarden bepaald werden door middel van een standaard Vetscan bloedanalyser en de waarden niet sterk afwijken van de normaalwaarden, kan deze afwijking van het albuminegehalte als niet significant beschouwd worden. Het totaal proteïne is licht gedaald. Dit kan veroorzaakt worden door overhydratatie, proteïneverlies ten gevolge van een renale ziekte, anorexie, leverziekte of

intestinale problemen (Tully et al., 2009). Bij deze patiënt is de daling echter verwaarloosbaar rekening houdende met de fysiologische referentie-intervallen. Er wordt eveneens een milde daling van het totale calciumgehalte vastgesteld. Calciumconcentraties kunnen beïnvloed worden door zowel fysiologische als pathologische condities. Hypocalcemie bij vogels kan onder andere ontstaan door een tekort aan calcium in de voeding, het leggen van grote hoeveelheden eieren, toediening van glucocorticoïden, hypomagnesemie of een tekort aan blootstelling aan UV-licht (Tully et al., 2009). Hierbij moet bemerkt worden dat calcium in het bloed aanwezig is in twee vormen: een geïoniseerde en een niet-geïoniseerde vorm. Deze laatste vorm is gebonden aan een proteïne en alleen deze wordt gemeten bij het standaard bloedonderzoek. De geïoniseerde fractie kan bepaald worden met ion selectieve elektrodes (Luck en Scanes, 1979).

1.4. Differentiaal diagnose

Massa aan de vleugel:

- Abces
- Granuloom
- Hematoom
- Vederfollikel cyste
- Metabole afzettingen
 - o Xanthoom
 - o Steatitis
- Neoplasië

1.5. Plan

1.5.1. Chirurgie

Omdat de massa sterk verdacht was voor neoplasië en rekening houdende met de omvang en vascularisatie van de massa, werd direct overgegaan tot het plannen van chirurgie zonder verdergaande onderzoeken zoals het uitvoeren van gerichte biopsieën. De operatie werd geïnduceerd met isofluraan 5% in zuurstof met behulp van een masker. Daarna werd eveneens via een masker overgegaan op onderhoud van de anesthesie via isofluraan 2,5% in zuurstof. Er werd een tourniquet ter hoogte van de humerus geplaatst tot na het beëindigen van de amputatie. De aanwezige bloedvaten werden enkelvoudig geligeerd met Vicryl 3/0. Door middel van elektrocauterisatie werden de bloedvaten en weefsels gereceerd. Na het ondermijnen en opstropen van de huid werd het gewricht tussen de metacarpus en de radius en ulna geopend waarna de metacarpus werd geamputeerd. De alula bleef gespaard en de huid werd routinematig gesloten. Na het verwijderen van de tourniquet traden geen residuele bloedingen op. De vogel kwam goed uit de anesthesie. De eigenaar kreeg het advies om postoperatief nog zeven dagen enrofloxacin (10mg/kg per oraal, twee maal daags) toe te dienen aan de vogel.

1.5.2 Histologie

Histologisch onderzoek van het verwijderde weefsel werd uitgevoerd na bereiding van hematoxyline en eosine (HE) gekleurde coupes. Op de histologische coupes waren multifocale calcificaties te zien. Deze waren te zien als haarden met centraal een amorphe eosinofiele massa. Rond de calcificaties was een matige tot uitgesproken toename van vooral macrofagen en heterofielen te zien. Ook was er in mindere mate een toename van lymfocyt en plasmacellen. In het omliggende vetweefsel was er diffuus een matige toename van heterofielen te zien (Fig. 2). Het bijkomende bacteriologisch onderzoek van het weefsel was negatief.

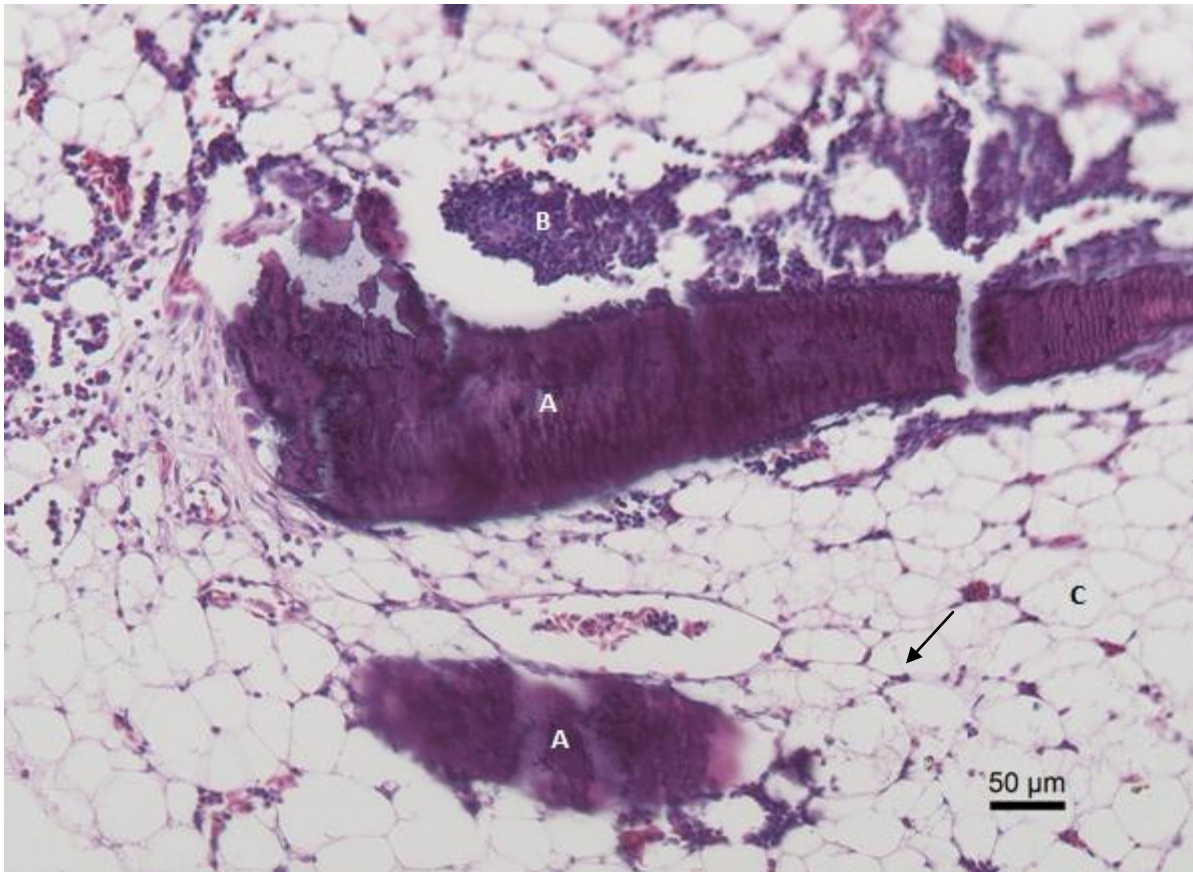


Fig. 2: Histologisch preparaat van de verwijderde massa van de valkparkiet (*N. Hollandicus*) uit de casus. De multifocale calcificaties (A), de ontstekingscellen rond de calcificatie (B) en de heterofielen (pijl) in het omliggende vetweefsel (C) zijn te zien.

1.6. Diagnose

Op basis van het histologisch onderzoek kon geconcludeerd worden dat er steatitis aanwezig was ter hoogte van het weefsel van de nodulaire massa. Secundair bevonden er zich calcificaties.

1.7. Opvolging

Zeven dagen na de operatie werd er contact opgenomen met de eigenaar. De vogel deed het goed maar zat nog af en toe te trillen. De wonde en de vleugeltop leken in orde. Na een paar weken werd er nogmaals contact opgenomen met de eigenaar en de vogel deed het klinisch zeer goed.

2. Bespreking

2.1. Differentiaal diagnose voor een massa ter hoogte van de vleugel

2.1.1. Abces

Verwonding, aanwezigheid van een vreemd voorwerp of een bacteriële infectie in de huid veroorzaakt een inflammatoire respons. Leukocyten migreren naar de plaats van verwonding en de venules vertonen een verhoogde permeabiliteit om de ontstekingscellen ter plaatse te brengen (Awadhiya et al., 1980). Vogels hebben in tegenstelling tot zoogdieren geen lymfeknopen. De lymfe die de inflammatie draineert, wordt dus niet gefilterd. Om ervoor te zorgen dat er toch geen pathogenen in de circulatie terechtkomen, zal er fibrine in het geïnflammeerde gebied exsuderen. Dit immobiliseert zowel de pathogenen als de ontstekingscellen. Als het immuunsysteem de pathogenen kan elimineren, zal het proces stoppen en zal het fibrine-exsudaat geleidelijk aan geresorbeerd worden. Doordat de ontstekingscellen ook geïmmobiliseerd worden door het exsudaat zullen in vele gevallen de pathogenen ontkomen aan hun actie. Hierdoor zal de infectie persisteren en zal het inflammatoire proces chronisch worden. De overlevende pathogenen en hun metaboliëten zullen de ontsteking verder zetten (Huchzenmeyer en Cooper, 2000).

Bij zoogdieren zou dit een lokale necrose veroorzaken samen met de vorming van etter, wat resulteert in een abces (Ozaki et al., 2003). Bij vogels zal dit echter de exsudatie van meerdere lagen fibrine stimuleren, wat leidt tot harde subcutane massa's vol kazig materiaal. Een gelamineerd, vaak concentrisch uitzicht is typisch voor dit letsel (Huchzenmeyer en Cooper, 2000). De zwelling wordt vaak een abces genoemd en het exsudaat wordt geïnterpreteerd als opgedroogde etter (Barry, 1998). Deze vorm van chronische inflammatie is echter niet geassocieerd met weefselnecrose, ettervorming of inkapseling, wat de typische kenmerken zijn voor een abces bij een zoogdier (Ozaki et al., 2003). De massa's met 'necrotisch' materiaal zijn eigenlijk fibrineuze exsudaten die afgestorven inflammatoire cellen bevatten. Daarom suggereerden Huchzenmeyer en Cooper in 2000 een andere naam voor dit letsel, namelijk een 'fibrinocess'. De definitie hiervan is een product van een gelokaliseerd, chronisch en inflammatoir proces bij vogels, wat gekarakteriseerd wordt door een incomplete eliminatie van de pathogenen, verdergaande exsudatie van fibrine en een ononderbroken groei (Huchzenmeyer en Cooper, 2000). Soms worden deze afzettingen van fibrine omringd door een granulomateuze cellulaire reactie (Fig. 3). Dit is een tweede belangrijk mechanisme om de verspreiding van infectie te voorkomen (Barry, 1998).

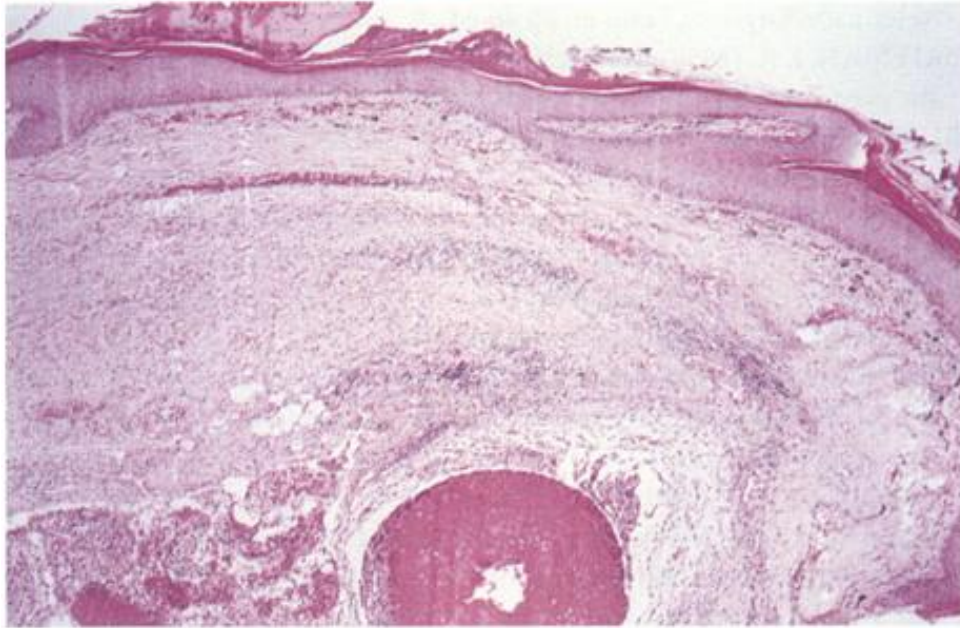


Fig. 3: HE-kleuring 400x. Histologisch preparaat van een fibrinabsces. Centraal is een fibrineus exsudaat te zien dat omringd wordt door een granulomateuze reactie (uit Huchzenmeyer en Cooper, 2000).

Bij roofvogels zal deze fibrinabsces soms ontstaan op de plantaire oppervlakte van de poten, wat bumblefoot wordt genoemd. Een fibrinabsces is veel moeilijker om chirurgisch te behandelen dan een abces. Het moet compleet weggesneden worden en alle fibrine moet verwijderd worden uit de diepere weefsels (Huchzenmeyer en Cooper, 2000). Een abces kon een mogelijkheid zijn bij de valkparkiet uit de casus. De massa bij deze vogel is ontstaan over een tijdsperiode van twee jaar en kon dus een gevolg zijn van een chronische inflammatie ten gevolge van een trauma. Op basis van de uitgevoerde histologische en microbiologische onderzoeken konden er hiervoor echter geen aanwijzingen gevonden worden.

2.1.2. Granuloom

Een granuloom ontstaat als een reactie op een infectieus agens. Op de huid wordt het bij vogels vooral beschreven bij een infectie met mycobacteriën (Koski, 2002). Granulomen kunnen uitsluitend op de huid voorkomen maar ook verspreid over de huid en andere inwendige organen. De huidlesies zijn veelal gelige of witte dermale nodules gelokaliseerd op de kop, extremiteiten of de romp (Koski, 2002). De granulomen kunnen secundair zijn aan een verspreiding van de bacteriën vanuit de interne organen (Ferrer et al, 1996). Ook kunnen ze ontstaan door een transcutane infectie bij huidwonden. Histopathologisch wordt een granuloom gekarakteriseerd door een centrale zone van verkazende necrose, omringd door een brede zone van macrofagen en meerkernige reuzencellen. Dit wordt omringd door lymfocyten en fibroblasten. De mycobacteriën zijn vaak te zien in de macrofagen en reuscellen (Koski, 2002). Bij de casus is een granuloom minder waarschijnlijk omdat er geen suggestieve kenmerken werden vastgesteld via het uitgevoerde histologisch onderzoek.

2.1.3. Hematoom

Een hematoom kan ontstaan ten gevolge van een trauma, coagulatiestoornissen of door opname van rodenticiden op basis van coumarine (Forbes en Altman, 1998). Anticoagulerende rodenticiden interfereren met de bloedstolling door het enzyme vitamine K epoxide reductase, wat vitamine K activeert, te inhiberen. Deze inhibitie resulteert in een accumulatie van de inactieve vorm van vitamine K. De vitamine K stollingsfactoren (II, VII, IX en X) en prothrombine zullen niet geactiveerd kunnen worden waardoor er een coagulopathie ontstaat met bloedingen (Binev et al., 2012). Vitamine K wordt ook gesynthetiseerd door intestinale bacteriën. Natuurlijk voorkomende deficiënties in vitamine K komen niet veel voor. Bij kippen is vitamine K deficiëntie wel geassocieerd met een langdurige behandeling met sulfonamiden, welke interfereren met normale intestinale flora (Frost et al., 1956). Een hematoom ten gevolge van een trauma zou bij de valkparkiet uit de casus eventueel een mogelijkheid kunnen geweest zijn. Een coagulatiestoornis of opname van rodenticiden is minder waarschijnlijk omdat er nergens op het lichaam andere bloedingen te zien zijn. Een hematoom ontstaat echter acuut en zal na enige tijd uit zichzelf regresseren, in tegenstelling tot de massa bij de valkparkiet.

2.1.4. Vederfollikel cyste

Vederfollikel cysten ontstaan wanneer groeiende veren gekruld raken in hun follikels zodat de vederschacht niet doorbroken wordt. Aangetaste follikels kunnen samenvloeien en cysten vormen die delen van de schacht, keratine en kliersecreties bevatten (Paraschiv, 2014). Vederfollikel cysten zijn harde gele nodules op de huid. Deze verharding is het gevolg van de accumulatie van keratine (Mutinelli et al., 2008). Bij kanaries komen ze alleen voor ter hoogte van de lichaamsbevedering terwijl het bij andere vogels ook kan voorkomen ter hoogte van de vleugels (Paraschiv, 2014). De aandoening is waarschijnlijk erfelijk, voornamelijk bij kanaries en kanarie hybriden. Cysten kunnen echter ook secundair aan trauma ontstaan, wat vaak het geval is bij valkparkieten. Histopathologisch kan men zien dat de vederfollikels gedilateerd zijn en gevuld met gelamineerd keratineafval (Forbes en Altman, 1998). Een vederfollikel cyste kan bij de casus uitgesloten worden op basis van histologisch onderzoek.

2.1.5. Metabole afzettingen

2.1.5.1. Xanthoma

Een xanthoma is een dermale massa die bestaat uit reuscellen en macrofagen die volgeladen zijn met vetdruppels (Fig. 4). Er worden ook cholesterol clefts in de intercellulaire gebieden gezien (Turrel et al., 1987).

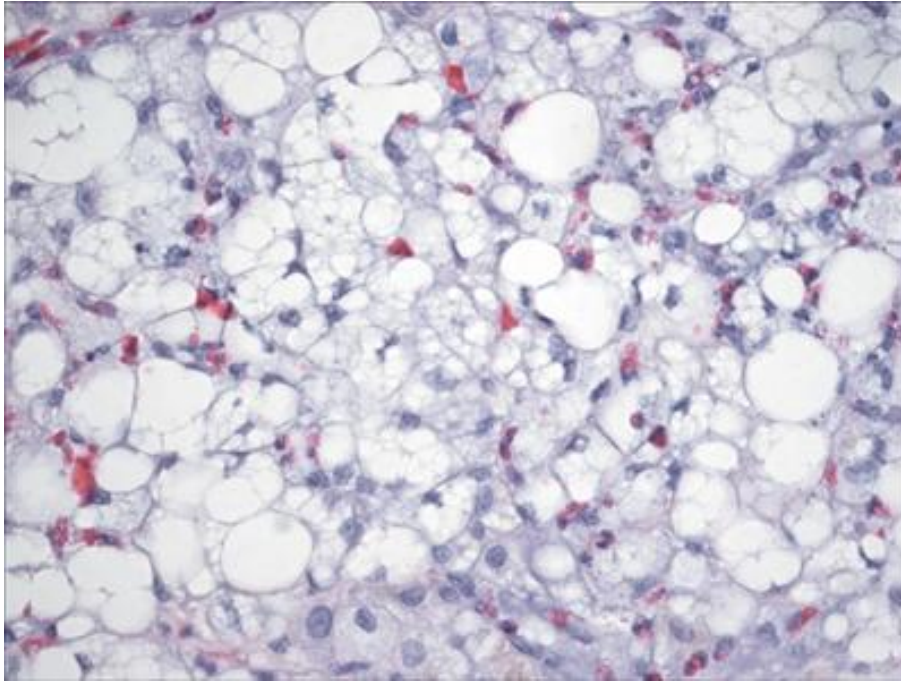


Fig. 4: HE kleuring 600x vergroting. Histopathologisch preparaat van een xanthoom bij een ara (*Ara ararauna*): de massa bestaat uit macrofagen volgeladen met lipiden. Heterofielen zijn verspreid over het preparaat (uit Souza et al., 2009).

Xanthoma's kwamen vroeger voor bij kippen die voeder kregen met daarin vetten die aromatisch gechloroerde koolwaterstof bevatten. Dit toxisch vet accumuleert in het subcutaan vet en doet zich voor als een irriterend of vreemd voorwerp, wat een inflammatie initieert waardoor een xanthoma ontstaat (Sanger en Lagace, 1966). De etiologie bij andere soorten is nog niet volledig bekend. Men denkt dat een abnormaal lipide metabolisme bijdraagt tot de vorming van xanthomen. Vaak zijn verhoogde serumconcentraties cholesterol of andere lipiden aanwezig bij de aangetaste individuen. Hypercholesterolemie kan geassocieerd worden met eierleggende vogels (Souza et al., 2009). In een studie op Japanse kwartels werden xanthoma's geïnduceerd door het voederen van een cholesterol-gesupplementeerd dieet (Hoekstra et al., 1998). Xanthoma's kunnen enkelvoudig of multipel aanwezig zijn op het lichaam als discrete nodules of een diffuse verdikking van de huid. De huid is vaak vederloos, hemorragisch of geulcereerd (Turrel et al., 1987). Ze kunnen overal op het lichaam gevonden worden maar de rug, vleugels, dijen en het ventrale abdomen zijn de meest voorkomende plaatsen (Koski, 2002). Xanthoma's kunnen ook over een andere aandoening gelegen zijn, zoals een lipoma of gebieden van chronische inflammatie (Turrel et al., 1987). De massa komt bij de psittaciformen vooral voor bij de vrouwelijke grasparkieten en valkparkieten maar komen ook voor bij andere soorten (Koski, 2002). Omdat de etiologie nog niet volledig gekend is en de beschrijving van het xanthoom gelijkenissen heeft met de tumor van de valkparkiet, kon deze aandoening ook in aanmerking komen bij de casus. Dit werd echter uitgesloten op basis van het uitgevoerde histologisch onderzoek.

2.1.5.2. Steatitis

Steatitis of 'yellow fat disease' is een aandoening gekenmerkt door inflammatie en geel-oranje verkleuring van het vetweefsel, wat overal in het lichaam kan voorkomen. Steatitis kan gelokaliseerd of veralgemeend optreden. Bij vogels wordt steatitis voornamelijk veroorzaakt door een vitamine E-deficiëntie (Neagari, 2011). Deze deficiëntie kan ontstaan door een tekort aan vitamine E (α -tocopherol) in het dieet, door de consumptie van grote hoeveelheden onverzadigde vetzuren (PUFA's) of door beiden. De opname van vitamine E hangt samen met de opname van onverzadigde vetzuren, grote hoeveelheden zullen de opname van het vitamine remmen (Gershoff, 1962, Niza et al., 2003). Diëten met een hoog vetgehalte kunnen dus een relatieve deficiëntie van vitamine E veroorzaken. Ook kan de hoeveelheid vitamine E in het voedsel verminderen door oxidatie van vet tijdens het verwerkingsproces of bij het verlengd bewaren van het voedsel (Watson, 1998, Neagari, 2011). Als laatste kunnen malabsorptiesyndromen, bijvoorbeeld bij een intestinale protozoa infectie, en een teveel aan vitamine A in het dieet soms ook een vitamine E-deficiëntie veroorzaken (Wilson, 1994).

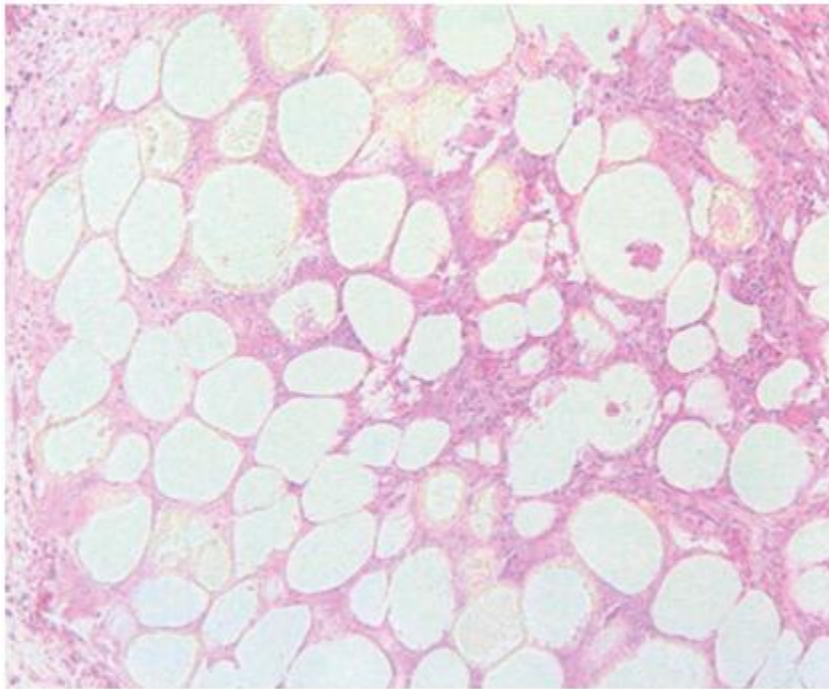


Fig. 5: HE-kleuring 40x vergroot. Septale inflammatie bij felijne steatitis. Het ceroïd is in de periferie van de vetvacuole te zien (uit Niza et al., 2003).

Vitamine E is een natuurlijk anti-oxidant en is belangrijk om de stabiliteit van celmembranen te behouden. Het verhindert de oxidatie van vetten door elektronen te doneren aan de vrije radicalen die instaan voor peroxidatie van vet. Wanneer er een tekort is aan vitamine E zal het diëtair- en het lichaamsvet oxidatieve degeneratie ondergaan, wat leidt tot de vorming van peroxiden en hydroperoxiden (Niza et al., 2003). Een van deze peroxiden is ceroïd, een pigment dat accumuleert in het subcutaan of intra-abdominaal vet (Fig. 5). Dit pigment zorgt voor de geelverkleuring van het vet. De accumulatie van de gevormde peroxiden resulteert in necrose gevolgd door inflammatie van het aangetaste vetweefsel. Hierdoor ontstaan vaste, nodulaire massa's (Watson, 1998). Histopathologisch

is er necrotisch vetweefsel te zien (Fig. 6), wat geïnfiltreerd wordt door vele heterofielen en een kleinere hoeveelheid macrofagen (Pollock, 1999).

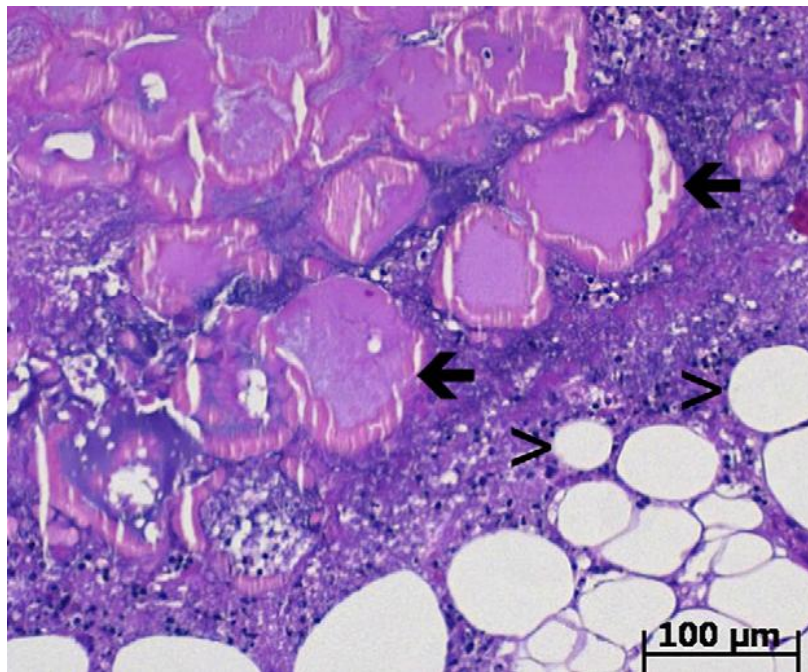


Fig. 6: HE-kleuring. Vetnecrose in het omentum van een kat: necrotische adipocyten (pijlen) en normale adipocyten (pijlpunten) (uit Zini et al., 2007).

Vitamine E-deficiëntie geeft ook andere symptomen dan steatitis. Oedeem en bloedingen in het cerebellum (encephalomalacie), degeneratie van de skelet- en hartspiercellen en vochttopstapeling in de weefsels (exsudatieve diathese) zijn de belangrijkste. Bij broedhennen zal ook de fertiliteit en de broeduitkomst verminderen (Pandian et al., 2012)

Aviaire heterofielen zijn gegranuleerde leukocyten, te vergelijken met de neutrofielen van de zoogdieren. Ze hebben dezelfde functionele rol. Heterofielen zijn aanwezig in acute inflammatoire reacties en hebben een fagocyterende functie (Barry, 1998). Ze accumuleren in het ontstekingsweefsel en veroorzaken plaatselijk weefselschade. Het verschil met neutrofielen is dat ze geen myeloperoxidase bevatten. Dit is een peroxidase enzyme dat wel in de granulomen van neutrofielen zit (Maxwell, 1998). Het wordt geactiveerd tijdens fagocytose en produceert waterstofhypochloriet (HClO) uit waterstofperoxide (H_2O_2) en een chloride ion (Cl^-). Ook oxideert het tyrosine tot tyrosyl. Zowel waterstofhypochloriet als tyrosyl zijn cytotoxisch en worden door de neutrofiel gebruikt voor het elimineren van bacteriën en andere pathogenen. Voor anti-microbiële activiteit hangen de heterofielen dus voornamelijk af van niet-oxidatieve mechanismen. Ze bevatten verschillende lysosomale en niet-lysosomale enzymen waarmee ze een grote variëteit aan pathogenen kunnen elimineren (Barry, 1998).

De meeste gevallen van steatitis werden beschreven bij piscivoren zoals kwakken, grote zilverreigers, groene reigers, jonge en adulte Amerikaanse blauwe reigers, pelikanen en schuitbekreigers (Wagner en Dietlein, 1970, Nichols et al., 1986, Dierenfeld, 1989, Pollock et al., 1999). Deze dieren stonden allen op een dieet met uitsluitend vis. Deze vis werd in de meeste gevallen te lang bewaard of was

ontdood in de zon waardoor deze ranzig werd met een verminderde vitamine E-concentratie als gevolg. De symptomen bij deze vogels waren anorexie, lethargie, subcutane nodules van necrotisch vet en een opgezette coelomholte. Doordat de huid van vogels veel dunner is, zal de geel-oranje kleur van de massa's door de huid te zien zijn (Dierenfeld, 1989, Pollock, 1999). Ook bij katten komt steatitis vaak voor bij dieren die op een dieet staan met een hoog gehalte aan onverzadigde vetzuren, voornamelijk bij een visdieet. Het komt voornamelijk voor bij het voederen van vette vis zoals tonijn en sardienen, witte vis zoals haring en kabeljauw of bij combinaties (Munson et al., 1958, Gershoff en Norkin, 1962, Koutinas et al., 1993).

Over steatitis bij vogels die geen visdieet krijgen, is weinig bekend. In 1999 werd een geval beschreven van steatitis bij een roodstaartbuizerd (*Buteo Jamaicensis*). Deze had ongeveer dezelfde symptomen als de piscivore vogels met steatitis ten gevolge van een vitamine E-deficiëntie. Men had echter geen verklaring voor het voorkomen van steatitis bij deze soort (Wong et al., 1999). Bij een studie bij lori's die enkel vetformules kregen, ontstond steatitis ten gevolge van een tekort aan vitamine E (Wilson, 1994). Ook bij *Neophema* parkieten die ranzig hondenvoer kregen, werd steatitis aangetoond (Campbell, 1987). Het uitzicht van de tumor bij de valkparkiet komt overeen met de beschrijving van steatitis. Beiden zijn vaste nodulaire massa's met een geel-oranje kleur. De vogel krijgt geen vetrijk dieet maar omdat de etiologie van steatitis nog niet volledig gekend is, kan het niet uitgesloten worden. Op basis van histologie kwam men tot de bevestiging van gelokaliseerde steatitis ter hoogte van de massa bij de besproken casus.

2.1.6. Neoplasië

2.1.6.1. Lipoma/Liposarcoma



Fig. 7: Een lipoma bij een roze kaketoë (*Eolophus roseicapilla*) (uit Filippich, 2004).

Een lipoma is een goedaardige omkapselde tumor die bestaat uit lipocyten en lipoblasten (Fig. 7). Het is de meest voorkomende goedaardige tumor bij vogels en komt vooral voor bij grasparkieten, roze

kaketoës en valkparkieten (Forbes en Alman, 1998, Turrel et al., 1987). Overgewicht en ouderdom zijn predisponerende factoren (Turrel et al., 1987). Vogels verdikken als het energiegehalte in het dieet hoger is dan de energie nodig voor de normale metabole functies en beweging. Veel eigenaars geven hun vogel te grote hoeveelheden ongeschikt voedsel zoals cake, koekjes, frieten en chocolade. Ook zijn vogels vaak selectief tijdens het eten en verkiezen zaden zoals zonnebloempitten of pindanootjes. Deze voeding bevat veel vetten en weinig essentiële voedingsstoffen. Verveling en verminderde activiteit kan ook zorgen voor een grotere consumptie van voedsel met verdikking als gevolg (Tully et al., 2009, Forbes en Alman, 1998). Een andere oorzaak voor het ontstaan van obesitas is een dieet met een tekort aan essentiële nutriënten. De vogels zijn hierdoor verplicht om meer voedsel op te nemen om zo voldoende hoeveelheden voedingsstoffen binnen te krijgen (Forbes en Alman, 1998).

Lipoma's zijn meestal enkelvoudig maar kunnen ook verspreid over het lichaam voorkomen. Ze worden het meest gevonden in het subcutane weefsel van het sternum, de vleugel, de poten en het abdomen (Filippich, 2004). Ze kunnen traag groeien over een periode van maanden tot jaren of ze kunnen snel ontwikkelen. De tumoren die snel groeien hebben meestal necrose in het centrum. Grote massa's kunnen interfereren met de beweging van de ledematen, resulterend in problemen bij het zitten, klimmen of vliegen. De tumoren hebben een gele kleur, voelen zacht en goed omkapseld aan en de huid is verplaatsbaar ten opzichte van de tumor. De overliggende huid is meestal normaal maar kan ook xanthomateus of necrotisch zijn (Turrel et al., 1987). Een vermoedelijke diagnose kan gesteld worden met behulp van macroscopisch en cytologisch onderzoek. Op dit laatste is vrij liggend vet te zien met nog een paar intacte lipocyten. De definitieve diagnose moet gesteld worden door histologie na chirurgische excisie (Turrel et al., 1987).

De behandeling bestaat onder andere uit een verandering van het dieet. Overschakeling naar pelletvoeding, wat alle essentiële voedingsbestanddelen bevat en waarbij de vogel niet meer selectief kan zijn, is een goede optie. Ook kan men de vogel aanzetten tot beweging door de kooi te verrijken met speelgoed (Tully et al, 2009). Complete chirurgische verwijdering van het lipoma is een goede keuze wanneer de verandering van dieet geen effect heeft of het lipoma de beweging van de vogel hindert. Ook wanneer de tumor geulcereerd of genecrotiseerd is, kan deze best volledig weggesneden worden (Filippich, 2004). Hoewel een lipoma niet kwaadaardig is, kan het teruggroeien wanneer het niet volledig verwijderd wordt of de dieetmaatregelen post-operatief niet nageleefd worden (De Voe et al., 2004). Een excisie kan echter risicovol zijn wanneer geen goede hemostase bekomen wordt bij deze goed gevasculeerde tumor. De meeste dierenartsen kiezen daarom eerst voor een minder invasieve behandeling alvorens over te gaan naar chirurgie. Dieetmaatregelen voor de chirurgie kunnen er immers voor zorgen dat het vetweefsel van het lipoma vermindert waardoor de operatie gemakkelijker en minder invasief is. Ook zal de kans op bloedingen afnemen (Filippich, 2004).

Een liposarcoma is een weinig frequent geziene kwaadaardige tumor van de lipocyten en lipoblasten. Het werd al gerapporteerd bij volwassen gras- en valkparkieten, een monniksparkiet, een groenwangparkiet en een grijze roodstaartpapegaai (Graham et al., 2003). De tumor heeft dezelfde locaties als een lipoma maar is vaster, meer gevasculeerd en meer infiltratief (Turrel et al., 1987, Koski, 2002). Een vermoedelijke diagnose kan gesteld worden met behulp van cytologisch onderzoek

van een aspiratiebiopt maar een histologisch onderzoek is nodig voor een definitieve diagnose (Turell et al., 1987). Op histologie zijn liposarcoma's meer cellulair dan lipoma's, met gebieden van necrose en bloedingen (Graham et al., 2003). Een wijde chirurgische excisie is nodig voor het verwijderen van deze tumoren. Liposarcoma's zijn weinig omkapseld en kunnen metastaseren, wat een slechtere prognose geeft (Filippich, 2004).

Een lipoma of een liposarcoma kon zeker in aanmerking komen bij de valkparkiet uit de casus. De massa is langzaam ontstaan en is enkelvoudig. Haar goede voedingstoestand, eetlust en oudere leeftijd konden ook bijgedragen hebben tot het ontstaan van deze tumoren. Op histologisch onderzoek kon dit echter uitgesloten worden.

2.1.6.2. Basaalceltumoren

Een goedaardige basaalceltumor is een vederfolliculoma. Deze tumor is vaak geassocieerd met vedercysten. De nodules kunnen enkelvoudig of multipel voorkomen en betrekken meestal de vliegvederen. Macroscopisch zijn ze vast en geel. Folliculoma's komen vooral voor bij grasparkieten. (Koski, 2002).

Basaalcelcarcinoma's zijn laaggradige kwaadaardige tumoren en zijn zeer zeldzaam bij vogels. De etiologie is onbekend, hoewel blootstelling aan UV-licht en trauma gerapporteerd zijn als potentiële etiologische factoren. De tumor ontstaat uit pluripotente epitheliale cellen in de basale cellagen van de epidermis en adnexa. Het kan zich differentiëren in epidermis of structuren uit de adnexa zoals vederfollikels. Het is een vaste, afgeronde massa die goed omschreven is. Vaak komt de tumor solitair voor maar soms kunnen er ook meerdere aanwezig zijn. Een basaalcelcarcinoma heeft een lokaal invasief karakter maar metastasen komen zelden voor. De diagnose wordt gesteld na histologisch onderzoek. Op histologie kan men solide, gekeratiniseerde en ongekleurde cellen zien (Tell et al., 1997).

Als behandeling wordt resectie aanbevolen. Hoewel de tumor niet zo kwaadaardig is, groeit het toch vaak terug. Dit gebeurt vooral als het niet volledig weggesneden wordt. 5-Fluorouracil kan gebruikt worden om teruggroei te voorkomen. Dit is een anti-metabool van uracil dat DNA- en RNA-synthese inhibeert. Het is cyclusspecifiek en wordt topicaal aangebracht om het hergroeien van tumoren zoals basaalceltumoren te voorkomen (Filippich, 2004).

Ook deze tumor kon in overweging genomen worden bij de valkparkiet doordat het gaat om een tumor die vooral in de buurt van vliegvederen voorkomt en een gele kleur heeft. Trauma tijdens het vliegen of rondlopen kon hier als oorzaak aangewezen worden. Histologisch onderzoek heeft dit echter uitgesloten.

2.1.6.3. Plaveiselcelcarcinoma

Een plaveiselcelcarcinoma of squamous cel carcinoma is een kwaadaardige tumor van de plaveiselcellen. Het is een relatief weinig voorkomende tumor die vooral wordt gezien bij oudere vogels. Het is al bij verschillende soorten gerapporteerd. De tumor komt vaak voor op gebieden van chronische irritatie en inflammatie, zoals gebieden van chronisch vederplukken (Turrell et al., 1987, Koski, 2002). Een cutaan plaveiselcelcarcinoma kan over heel het lichaam voorkomen maar

frequenter op de huid van de nek, borst, vleugel, poten, bek, oogleden en stuitklier. De massa is lokaal sterk invasief maar metastaseert zelden (Diaz-Figueroa et al., 2006). Het is een slecht afgelijnde tumor en kan zeer ulceratief en vasculair zijn waardoor het vaak op een niet genezende wonde lijkt. Ze moeten daarom gedifferentieerd worden van zelf toegebrachte wonden, chronische dermatitis, chemische of thermische verbranding, dermatitis geassocieerd met ectoparasieten of andere (Turrel et al., 1987). Diagnostische stappen zijn cytologisch en microscopisch onderzoek van bioptweefsel (Koski, 2002). RX-foto's van het gebied van de primaire tumor en de thorax moeten genomen worden om te controleren of het botweefsel betrokken is bij de tumorgroei en of er pulmonaire metastases aanwezig zijn (Turrel et al., 1987).

Er is geen optimale behandeling voor een plaveiselcelcarcinoom, onafhankelijk van de plaats. De therapeutische beslissing moet genomen worden op basis van de grootte en lokalisatie van de tumor. In de meeste gevallen wordt een wijde chirurgische excisie uitgevoerd in combinatie met amputatie als de tumor op een extremiteit gelokaliseerd is (Turrel et al., 1987). Tumoren op de romp komen vaak terug ten gevolge van onvoldoende chirurgische marges. Topicale toediening van 5-fluorouracil kan ook bij deze tumor gebruikt worden om teruggroei te voorkomen (Filippich, 2004). Radiotherapie met gamma stralen kan evenzeer aangewend worden voor de behandeling van deze subcutane tumor (Koski, 2002, Filippich, 2004). Fotodynamische therapie (PDT) is nog een ander alternatief. Het eradiceert neoplastisch weefsel met behulp van weefsel penetrerend licht. Dit gebeurt 24 tot 48u nadat de patiënt intraveneus een fotosensibiliserend agens ingespoten heeft gekregen. Wanneer dit agens geactiveerd wordt door licht van een bepaalde golflengte, zullen cytotoxische zuurstofradicalen gegenereerd worden. Deze zullen de celmembranen afbreken wat in celdood resulteert. Tumorweefsel zal preferentieel het agens vasthouden waardoor selectieve tumordestructie voorkomt. *In vivo* studies hebben uitgemaakt dat niet de tumorcellen zelf het grootste target zijn, maar wel het vasculaire bindweefsel dat de tumor ondersteunt. De tumor zal dus afsterven doordat de microcirculatie onderbroken wordt. Er zal echter wel enige necrose van het omliggende normale weefsel voorkomen (Filippich, 2004). Porfimeer natrium en een hexylether derivaat van pyropheophorbide zijn al gebruikt als fotosensibiliserende agens bij vogels zonder enige neveneffecten (Suedmeyer et al., 2001a). Als laatste kan intratumoraal carboplatine ingebracht worden na chirurgische excisie (Koski, 2002). Carboplatine is een wateroplosbare platinum bevattende stof die de DNA-synthese inhibeert. Het is niet cyclusspecifiek en het vrije platinum is verantwoordelijk voor de tumordodende activiteit en toxiciteit (Filippich, 2004).

Een plaveiselceltumor kwam minder in aanmerking bij de casus omdat de massa bij de valkparkiet redelijk goed afgelijnd was in tegenstelling tot een plaveiselcelcarcinoom. Ook bij de verdere beschrijving komen de tumoren niet overeen. Dit werd bevestigd door histopathologisch onderzoek.

2.1.6.4. Fibroma/fibrosarcoma

Een fibroma is een goedaardige tumor van het fibreuze bindweefsel. Het is een weinig voorkomende tumor en komt voornamelijk voor ter hoogte van de zachte weefsels van de vleugel, poot, kop en sternum. Op cytologisch onderzoek van een aspiratiebiopt van de tumor is weinig cellulariteit te zien.

Excisionele biopsie is zowel de diagnostische stap als de verkozen therapeutische behandeling (Turrel et al., 1987).

Een fibrosarcoma is de meest voorkomende externe kwaadaardige tumor van gezelschapsvogels. Het bestaat uit fibroblasten en andere mesenchymale cellen die collageen produceren (Turrel et al. 1987). Bij kippen wordt deze tumor geassocieerd met het voorkomen van een leukosevirus. Sommigen van deze tumoren zijn ongedifferentieerd en moeilijk te klasseren volgens het weefsel van oorsprong. Het komt het meest voor bij oudere gras- en valkparkieten en ara's (Turrel et al., 1987). Een fibrosarcoma is een vaste, immobiele tumor met een brede basis en een onregelmatige aflijning. De tumor is lokaal invasief maar metastasen komen niet vaak voor (Koski, 2002). Deze laatste zijn al gerapporteerd in de lever, long en botten. De cutane vorm wordt voornamelijk gezien op de vleugel, poot, bek, kop en romp. De tumor kan de vogel hinderen in het eten, vliegen of lopen. Een diagnose wordt het beste gemaakt door cytologisch onderzoek van cellen verkregen bij fijne naald aspiratie of door histologie van een incisieel biopt (Turrel et al., 1987). Ook immunohistochemie kan gebruikt worden om andere tumortypes, zoals een hemangiosarcoma, uit te sluiten (Palmieri et al., 2011).

Extremiteten met een fibrosarcoma kunnen best mee geamputeerd worden doordat de meeste tumoren te groot zijn voor een wijde excisie. Fibrosarcoma's op andere plaatsen zijn moeilijk te behandelen en komen vaak terug. Het gebruik van een combinatietherapie zoals chirurgie gevolgd door radiotherapie met gamma stralen kan hiervoor geïndiceerd zijn (Koski, 2002). Ook kan radiotherapie gecombineerd worden met chemotherapie. Cisplatine is net zoals carboplatine een wateroplosbare platinum bevattende stof die de DNA-synthese inhibeert. Ook is het bekend dat intratumorale injectie van cisplatine de effecten van de radiatie versterkt. De combinatie van cisplatine en radiotherapie is al succesvol gebruikt bij de behandeling van een fibrosarcoma op de vleugel van een blauwgele ara (Lamberski en Théon, 2002). Verder kan immunotherapie gebruikt worden bij deze tumor. Hierbij wordt het immuunsysteem van de vogel gestimuleerd tegen de tumorcellen. Tumoren zijn er om bekend immunosuppressie te veroorzaken en deze suppressie is afhankelijk van de graad en grootte van de tumor. Chirurgie zelf is al een vorm van immunotherapie doordat de grootte van de tumor verkleind wordt wat mogelijks de immunosuppressie ongedaan maakt (Filippich, 2004). Tumorspecifieke immunotherapie, waarbij de gastheer reageert tegen het tumorcelantigeen, is al gebruikt bij vogels in de vorm van een autoloog vaccin. Deze techniek is echter beperkt bij tumoren die veroorzaakt worden door virussen (Turrel et al, 1987). De laatste vorm is de niet-specifieke immunotherapie. Hierbij wordt een biologisch of chemisch agens gebruikt om niet-specifiek het immuunsysteem te stimuleren tegen tumorweefsel. Acemannan, een immunostimulerend geneesmiddel komende van de aloë vera plant, is al succesvol gebruikt in combinatie met chirurgie bij een witte kaketoë (Filippich, 2004).

Het fibrosarcoma kwam in aanmerking bij de valkparkiet omdat het ook een vaste tumor met een brede basis is. Het feit dat dit een van de meest voorkomende tumoren bij vogels is, zette deze tumor bovenaan in de differentiaaldiagnose. Op histologisch onderzoek werd een fibrosarcoma uitgesloten.

2.1.6.5. Hemangioma/hemangiosarcoma

Hemangioma's zijn goedaardige tumoren van endotheliale oorsprong die voorkomen als enkelvoudige of multipale nodules van enkele centimeters op de huid. Ze bloeden zeer gemakkelijk waardoor de vogel anemisch kan worden. Ze bestaan uit dunwandige, onregelmatige bloedvaten of minder gedifferentieerde endotheliale cellen. De overliggende huid kan oedemateus en hemorrhagisch zijn (Pass, 2007).

Hemangiosarcoma's zijn kwaadaardige tumoren die een endotheliale oorsprong hebben. Ze worden gekarakteriseerd als bloedvatenvormende tumoren die ontstaan uit proliferatieve endotheelcellen, welke onregelmatige vasculaire kanalen en caverneuze holtes gevuld met bloed vormen. Bij pluimvee en fazanten worden hemangioma's en hemangiosarcoma's vaak geïnduceerd door verschillende leukosevirussen, vooral door het aviaire hemangiomavirus (Suedmeyer et al., 2001b). De oorzaak bij andere vogels is onbekend. De tumor bij gezelschapsvogels is beschreven bij grasparkieten, een valkparkiet, amazonepapegaaien en een rijstvogel (Sledge et al., 2006). Macroscopisch is een hemangiosarcoma een rood-zwarte tumor die kan verschillen in grootte (Koski, 2002). In de subcutis is de tumor zacht of sponzig, slecht afgelijnd en infiltrerend. De bloedvaten van deze tumor zijn broos en ruptureren frequent, resulterend in bloedingen. Ook inflammatie en necrose komt vaak voor. Bij vogels kan een hemangiosarcoma enkelvoudig voorkomen of in een multicentrisch patroon. Het kan gevonden worden in de huid, lever, long, milt, spier, mesenterum, nier, hart, oviduct, bot of synovium. Metastasen komen vaak vroeg voor omdat de tumorcellen gemakkelijk toegang hebben tot de bloedvaten. De long is het meeste voorkomende gebied voor metastasen maar ze kunnen ook gevonden worden in bijna elk ander weefsel (Freeman et al., 1999). Hemangiosarcoma's zijn zeer zeldzaam bij vogels. Cytologisch onderzoek van hemangiosarcoma's is problematisch omdat de tumor profuus kan beginnen bloeden bij het aanprikken. Stalen kunnen pleomorfe polyhedrale tot spoelvormige endotheliale cellen bevatten met ronde tot ovale kernen en een donkerblauw, meestal gevacuoliseerd cytoplasma.

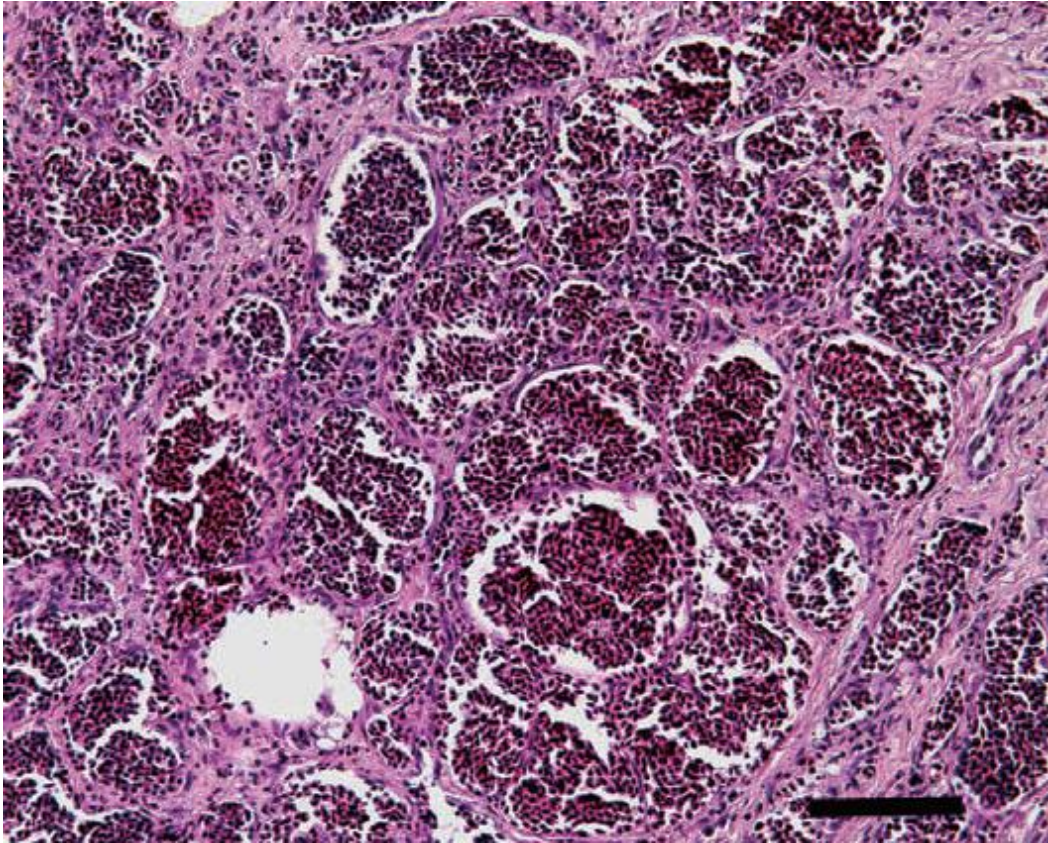


Fig. 8: HE kleuring van een hemangiosarcoma bij een rijstvogel (*Lonchura oryzivora*), scale bar = 100µm. De neoplastische bloedvaten hebben een onregelmatige vorm. Spoelvormige tot ronde tumorcellen prolifereren rond de bloedvaten (uit Nakano en Une, 2012).

Histopathologisch onderzoek is nodig voor het bekomen van een definitieve diagnose omdat deze tumoren moeten onderscheiden worden van niet-neoplastische aandoeningen zoals vasculaire malformaties, hematoma's, sterk gevasculeerd granulatieweefsel of andere neoplasmen met een sterke bloedtoevoer (Freeman et al., 1999, Suedmeyer et al., 2001b). Op histologie kan men een tumor gevormd uit slecht georganiseerde vasculaire ruimtes afgelijnd door immature endotheliale cellen met een hyperchromatische, pleomorfische kern zien (Fig. 8). Soms kunnen mitotische figuren gezien worden (Nakano en Une, 2012).

Immunohistochemie wordt bij zoogdieren gebruikt bij het classificeren van tumoren. Bij een hemangiosarcoma wordt factor VIII als immunohistochemische merker gebruikt voor het detecteren van vasculaire endotheliale cellen (Fig. 9). Bij vogels kunnen deze merkers ook toegepast worden, alleen zijn deze niet altijd even betrouwbaar (Sledge et al., 2006).

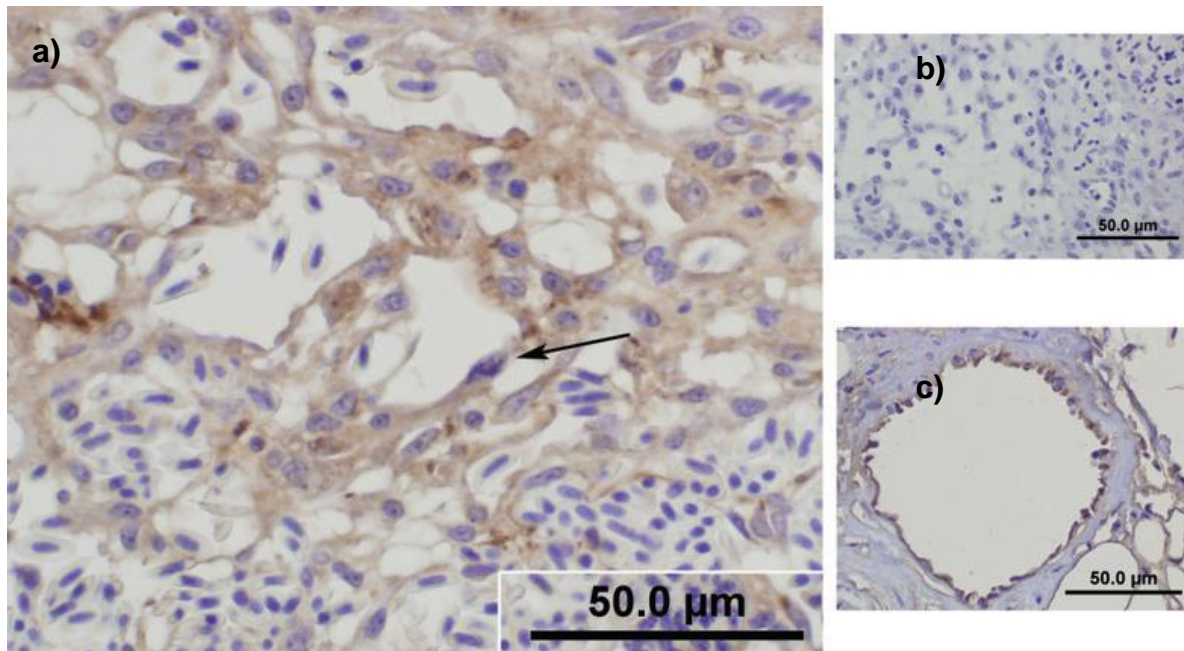


Fig. 9: Immunohistochemie met gebruik van factor VIII. a) Preparaat van een subcutaan hemangiosarcoma bij een mannelijke valkparkiet (*Nymphicus hollandicus*): onregelmatige bloedvaten zijn te zien samen met een mitotische cel (pijl) en een positieve immunohistochemische kleuring van de tumorcellen voor factor VIII b) Negatieve controle c) Positieve controle op het endotheel van een normaal bloedvat van de valkparkiet (uit Sledge et al., 2006).

Als behandeling voor deze tumor kan men kiezen voor chirurgische excisie. Dit kan gevolgd worden door radiotherapie. Bij een grasparkiet met een hemangiosarcoma aan de vleugel werden redelijk goede resultaten beschreven bij de behandeling met gamma straal radiotherapie. Er was geen gehele genezing maar de primaire tumor op de vleugel kromp waardoor de vogel er minder last van had. Ook werd de radiotherapie goed getolereerd door de vogel. De tumor groeide echter wel weer terug (Freeman et al., 1999). Ook chemotherapie kan gebruikt worden bij deze tumor. Hiervoor komt doxorubicine in aanmerking. Dit is een antibiotica dat stabiele complexen vormt met DNA, waardoor DNA- en RNA-synthese wordt geïnhibeerd. Men meent echter dat zijn anti-neoplastische activiteit voortkomt uit de inductie van vrije radicalen vorming en van topoisomerase II-afhankelijke DNA-splitsing. Het is niet cyclusspecifiek en heeft een breed spectrum anti-tumorale activiteit. De farmacokinetica van dit antibiotica zijn echter nog niet volledig gekend bij vogels (Filippich, 2004).

Een hemangioma of hemangiosarcoma komt minder in aanmerking bij de casus. Deze tumoren komen slechts weinig voor en zijn slecht afgelijnd. Ook hebben ze een meer roodachtig en bloederig aspect, wat niet het geval is bij de tumor bij de valkparkiet. Histologisch onderzoek bevestigde dit.

2.2. Diagnostische benadering van een massa ter hoogte van de vleugel

2.2.1. Anamnese

Een complete anamnese is zeer belangrijk bij het vaststellen van een massa bij een vogel. Het kan helpen om te weten te komen hoe de massa er initieel uitzag en hoe het zich ontwikkeld heeft in de tijd. Er moet steeds gedacht worden aan genetische en soortgebonden predispositie. Men kan vragen naar blootstelling aan chemicaliën, virussen en trauma, evenals naar het dieet (Turrel et al., 1987, Tully et al., 2009). Ook is het nuttig om te weten of er al een behandeling ingezet is door de eigenaar of een andere dierenarts en of de massa hierop gereageerd heeft (Turrel et al., 1987).

2.2.2. Klinisch onderzoek

Vooraleer men zijn aandacht op de massa richt moet er een grondig klinisch onderzoek gedaan worden om de algemene toestand van de vogel te kunnen beoordelen. Men kan ondermeer de voedingstoestand controleren. Bij obesitas kan men bijvoorbeeld denken aan een lipoma (Tully et al., 2009). Op plaatsen van vederplukken of een andere vorm van chronische irritatie, kan men meer in de richting van een plaveiselcarcinoom denken (Koski, 2002). Daarna moet de massa voorzichtig gepalpeerd worden. Hierbij kan men controleren of de massa gefixeerd is aan de onderliggende structuren of vrij beweegbaar is. Ook kan men de consistentie voelen, welke vast, zacht of fluctuerend kan zijn. De grootte van de massa moet gemeten worden in drie dimensies en de lokalisatie moet zorgvuldig gecontroleerd worden. Aan de hand van de anamnese en het lichamelijk onderzoek kan men een lijst van differentiaaldiagnoses opstellen die nodig is om verdere diagnostische testen en behandelingsmogelijkheden in te plannen (Turrel et al., 1987).

2.2.3. Hematologisch en biochemisch onderzoek

Evaluatie van het bloedonderzoek van een vogel met een massa kan abnormaliteiten aan het licht brengen die de diagnostische en therapeutische aanpak zouden kunnen veranderen. Onder andere de erythrocyten en leukocyten kunnen bepaald worden. In ernstig anemische vogels moet de chirurgie uitgesteld worden of er moet voor de operatie een bloedtransfusie gegeven worden. Bij tumorcellen die het beenmerg infiltreren kan men op het bloedonderzoek een leukopenie detecteren (Turrel et al., 1987). Mycobacteriële granuloma's kunnen ontstaan ten gevolge van een systemische ziekte, waardoor een biochemisch onderzoek ook nuttig kan zijn (Koski, 2002). Bij steatitis veroorzaakt door een vitamine E-deficiëntie kan men op hematologisch onderzoek een heterofilaire leukocytose en anemie onderkennen, samen met lage plasma α -tocopherol waarden (Pollock, 1999). Op biochemisch onderzoek kan men verhoogde CK waarden vaststellen (Dierenfeld, 1989). De anemie bij steatitis wordt veroorzaakt door een combinatie van chronische inflammatie en hemolyse vanwege een verhoogde fragiliteit van de celmembraan van erythrocyten door oxidatie (Wong et al., 1999). De leukocytose is een gevolg van necrose van het vetweefsel (Niza et al., 2003). De verhoogde CK waarden zijn dan weer een resultaat van degeneratie van de hart- en skeletspiercellen.

2.2.4. Cytologie

Onderzoek van een fijne naald aspiraatsel van de massa kan helpen om de lijst van differentiaaldiagnosen te doen verkleinen. Het kan helpen om niet-neoplastische massa's te

onderscheiden van neoplastische massa's. Ook kan het goedaardige tumoren helpen differentiëren van kwaadaardige tumoren (Turrel et al., 1987).

2.2.5. Radiografie

Wanneer huidmassa's aangrenzend zijn aan botweefsel is radiografie van het aangetast gebied gepast. Er moeten foto's genomen worden vanuit minstens twee richtingen om de locatie en de graad van aantasting van de weke delen en het botweefsel te bepalen (Turrel et al., 1987). Ook is het geïndiceerd om foto's te nemen van het hele lichaam om eventuele metastasen op te sporen. Dit bepaalt grotendeels de prognose (Ramis et al., 1999).

2.2.6. Histologie

Door middel van histologie beschikt men over een maximale hoeveelheid aan informatie voordat er een therapeutische beslissing wordt genomen. Het onderscheid tussen sommige goed- en kwaadaardige tumoren, zoals een lipoma en een liposarcoma, kan enkel gemaakt worden via histologie (Koski, 2002). Excisionele biopsie van de hele massa met brede marges in het normale weefsel krijgt de voorkeur (Nischal et al., 2008). Het verlaagt niet alleen de kans op teruggroeien van de massa maar voorziet ook genoeg normaal weefsel voor vergelijkende histopathologie (Turrel et al., 1987). Wanneer de massa te groot of te invasief is, is een incisionele biopsie zoals een wedge of punch biopsie een betere benadering (Nischal et al., 2008). Bij het gebruik van een elektrocauter moet men voorzichtig zijn omdat hitte de cellulaire architectuur van de massa kan vernietigen (Turrel et al., 1987). Complicaties geassocieerd met een biopsie omvatten slechte wondheling, littekenvorming, iatrogene infectie, uitvoerige bloeding, puncteren van vitale structuren en lokale verspreiding van de tumor. De uitgesneden massa kan best in een formoloplossing gefixeerd worden. De overdracht van de biopsiewonde naar de formolcontainer moet zo voorzichtig en atraumatisch mogelijk gebeuren. Wanneer het weefsel wordt verpletterd door het pincet zal dit een compressieartefact geven (Nischal et al., 2008). Een slecht uitgevoerde biopsie kan leiden tot een verkeerd of niets uitwijzend resultaat. Wanneer excisionele biopsieën genomen zijn moet de massa in zijn geheel opgestuurd worden zodat er kan onderzocht worden of de massa volledig weggesneden is (Turrel et al., 1987). Soms moeten bepaalde kleuringen, zoals de Ziehl-Neelsen kleuring, gebruikt worden om mycobacterien te identificeren (Koski, 2002).

2.3. Therapeutische benadering steatitis bij vogels

Bij piscivore vogels is de behandeling van steatitis ten gevolge van een vitamine E-deficiëntie het toedienen van α -tocopherol. Ook is het nodig om het visdieet te veranderen naar een meer gevarieerd voeder, waarin voldoende vitamine E verwerkt zit (Pollock, 1999). Voor exotische vogels suggereert Dierenfeld (1989) een dieet met 100-250 IU vitamine E/kg voeder. Bij niet-visetende vogels, waarbij de etiologie nog niet bekend is, zal men bij een algemene steatitis voor een eerder ondersteunende behandeling kiezen. Vloeistofoediening, dwangvoederen en het hospitaliseren van de vogel in een warmtekooi is hier geïndiceerd (Wong et al, 1999).

Bij de besproken casus was de oorzaak voor het ontstaan van steatitis ter hoogte van de carpometacarpus niet gekend. Er konden dus geen preventieve maatregelen ingesteld worden om recidieven te voorkomen. Wel werd er aangeraden om over te schakelen naar een pelletvoeder

wegens een risico op het selectief eten van zonnebloempitten, welke een hoge concentratie aan PUFA's bevatten.

Steatitis is een ziekte die niet frequent voorkomt. Hierdoor zal de uiteindelijke diagnose soms pas laatstijdig komen. De therapie is echter het meest efficiënt wanneer de ziekte in een vroeg stadium wordt gediagnosticeerd. Het succes van de behandeling vermindert immers met de tijd. De prognose is hierdoor goed wanneer de symptomen vroeg opgemerkt worden en slechter bij vergevorderde gevallen (Niza et al., 2003).

CONCLUSIE

De etiologie van steatitis bij niet-piscivore vogels is nog niet volledig gekend. Het is mogelijk dat er bij de valkparkiet uit de casus een vitamine E-deficiëntie ontstaan is ten gevolge van een selectieve opname van de zonnebloempitten uit de zaadmengeling. Deze bevatten immers hoge gehalten aan onverzadigde vetzuren. Vitamine E-deficiëntie door een dieet dat grotendeels bestaat uit zonnebloempitten werd echter enkel bij ratten beschreven die op een dieet rijk aan zonnebloemolie stonden (Farwer et al., 1994).

Een tekort aan vitamine E kan ook degeneratie van de skelet- en hartspiercellen geven (Pandian et al., 2012). Op bloedonderzoek kan men hierdoor een verhoogde CK waarde te zien krijgen. Bij een nutritionele myopathie is deze waarde verhoogd met meer dan 40 units (Dierenfeld, 1989). Dit was ook te zien op het bloedonderzoek van de valkparkiet. Deficiëntie van vitamine E geeft ook een verminderde fertiliteit, wat de stopzetting van de leg bij de valkparkiet kan verklaren. Andere symptomen van vitamine E-deficiëntie, zoals zenuwsymptomen en exsudatieve diathese waren echter niet te zien (Pandian et al., 2012). Om zeker te zijn van een tekort had men α -tocopherol kunnen bepalen via bloedonderzoek. Het bloedvolume van een vogel bedraagt ongeveer 10% van het lichaamsgewicht. Bij bloedname kan men tot 10% van dit volume nemen om te analyseren. Deze hoeveelheid is voldoende om vitamine E te analyseren met behulp van high performance liquid chromatography (HPLC) (Blount et al., 2003). Vitamine E is in het serum gebonden aan een beta-lipoproteïne dat voornamelijk gesynthetiseerd wordt in de lever. Bij een verminderde synthese, zoals bijvoorbeeld bij levercirrose of leverfalen, zal er schijnbaar een lagere concentratie α -tocopherol gedetecteerd worden. Hierdoor zal een bloedonderzoek dus niet altijd betrouwbaar zijn (Kater et al., 1970).

Steatitis is een aandoening die niet vaak voorkomt bij valkparkieten. Hierdoor werd op basis van de anamnese, het uitzicht en de lokalisatie eerder gedacht aan een neoplastisch proces ter hoogte van de vleugel. Er werd onmiddellijk overgegaan tot het plannen van chirurgie zonder verdergaande onderzoeken zoals het uitvoeren van gerichte biopsieën. Histologisch onderzoek van de massa bracht steatitis aan het licht. De histologische coupes werden gemaakt uit een ruim deel van het weefsel en werden zowel ter hoogte van het centrum als aan de randen verzameld. Het risico om enkel secundaire histologische veranderingen op te merken in plaats van neoplastische kenmerken werd hierdoor verkleind.

Hoewel de massa een gelokaliseerde steatitis zonder neoplastische veranderingen bleek te zijn, was chirurgische wegname toch de meest geschikte therapeutische benadering. De vogel ondervond moeilijkheden met vliegen door de omvang en lokalisatie van de massa. Bovendien was een wegname van de massa met behoud van de carpometacarpus, rekening houdende met de omvang en anatomische lokalisatie, waarschijnlijk niet mogelijk zonder beschadiging van omliggende vitale structuren. Er zou daardoor een aanzienlijk risico op postoperatieve complicaties zijn. En bloc resectie was hierdoor zowel een goede diagnostische als therapeutische stap.

Omdat de oorzaak niet gekend was, konden geen preventieve maatregelen ingesteld worden om recidieven te voorkomen. Wel werd er aangeraden om over te schakelen naar een pelletvoeder wegens een risico op het selectief eten van zonnebloempitten.

REFERENTIES

- Awadhiya R.P., Vagad J.L., Kolte G.N. (1980). Studies on acute inflammation in the chicken using mesentery as a test system. *Research in veterinary science* 29, 172-180.
- Barry G.H. (1998). Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poultry science* 77, 972-977.
- Binev R.G., Valchev I., Groseva N., L'Azarov L., Hristov T., Uzunova K. (2012). Morphological investigations of experimental acute intoxication with the anticoagulant rodenticide bromadiolone in pheasants. *Istanbul üniversitesi veteriner fakültesi dergisi* 38, 161-173.
- Blount J.D., Metcalfe N.B., Arnold K.E., Surai P.F., Devevey G.L., Monaghan P. (2003). Neonatal nutrition, adult antioxidant defences and sexual attractiveness in the zebra finch. *Proceedings of the Royal society of london* 270, 1691-1696.
- Bollinger T., Wobeser G., Clark R.G., Nieman D.J., Smith J.R. (1989). Concentration of creatine kinase and aspartate aminotransferase in the blood of wild mallards following capture by three methods for banding. *Journal of wildlife diseases* 25, 225-231.
- Brown P.J., Mason K.V., Merrett D.J., Mirchandani S., Miller, R.I. (1994). Multifocal necrotising steatitis associated with pancreatic carcinoma in three dogs. *Journal of small animal practice* 35, 129-132.
- De Voe R. S. (2004). Preliminary assesment of the effect of diet and L-carnitine supplementation on lipoma size and bodyweight in Budgerigars. *Journal of avian medicine and surgery* 18, 12-18.
- Diaz-Figueroa O., Tully T.N., Williams J., Evans D. (2006) Squamous cell carcinoma of the infraorbital sinus with fungal tracheitis and ingluvitis in an adult solomon electus parrot. *Journal of avian medicine and surgery* 20, 113-119.
- Dierenfeld E.S. (1989). Vitamin E deficiency in zoo reptiles, birds and ungulates. *Journal of zoo and wildlife medicine* 20, 3-11.
- Farwer S.R., Der Boer B.C.J., Haddeman E., Kivits G.A.A., Wiersma A., Danse B.H.J.C. (1994). The vitamin E nutritional status of rats fed on diets high in fish oil, linseed oil or sunflower seed oil. *British journal of nutrition* 72, 127-145.
- Ferrer L., Ramis A., Fernandez J., Majo N. (1996). Granulomatous dermatitis caused by *Mycobacterium genavense* in two psittacine birds. *Veterinary dermatology* 8, 213-219.
- Filippich L.J. (2004). Tumor control in birds. *Seminars in avian and exotic pet medicine* 13, 25-43.
- Forbes N.A., Altman R.B. (1998). *Self-assessment colour review of avian medicine*. Manson publishing, London, p 66-142.
- Freeman K.P., Hahn K.A., Adams W.H., Jones M.P., Petersen M.G. (1999). Radiation therapy for hemangiosarcoma in a budgerigar. *Journal of avian medicine and surgery* 13, 40-44.

Frost D.B., Perdue H.S., Spruth H.C. (1956). Vitamin K activity of menadione sodium bisulfite in chickens. *The journal of nutrition* 59, 181-196.

Gershoff S.N., Norkin S.A. (1962). Vitamin E deficiency in cats. *Journal of nutrition* 77, 303-308.

Graham J.E., Werner J.A., Lowenstine L.J., Wallack S.T., Tell L.A. (2003). Periorbital liposarcoma in an African grey parrot. *Journal of avian medicine and surgery* 17, 147-153.

Hoekstra K.A., Nichols C.R., Garnett M.E., Godin D.V., Cheng K.M. (1998). Dietary cholesterol-induced xanthomatosis in atherosclerosis-susceptible japanese quail. *Journal of comparative pathology* 119, 419-427.

Huchzenmeyer F.W., Cooper J.E. (2000). Fibrin, not abscess, resulting from a localised inflammatory response to infection in reptiles and birds. *Veterinary record* 147, 515-517.

Kater R.M.H., Unterecker W.J., Kim C.Y., Davidson C.S. (1970). Relationship of serum tocopherol to beta-lipoprotein concentrations in liver diseases. *The american journal of clinical nutrition* 23, 913-918.

Koski M.A. (2002). Dermatologic diseases in psittacine birds: an investigational approach. *Seminars in avian and exotic pet medicine* 11, 105-124.

Koutinas A.F., Miller W.H., Kritsepi M., Lekkas S. (1993). Pansteatitis in the cat: a review article and report of four spontaneous cases. *Veterinary dermatology* 3, 101-106.

Lamberski N., Théon A.P. (2002). Concurrent irradiation and intratumoral chemotherapy with cisplatin for treatment of a fibrosarcoma in a blue and gold macaw. *Journal of avian medicine and surgery* 16, 234-238.

Luck M.R., Scanes C.G. (1979). Plasma levels of ionized calcium in the laying hen. *Comparative biochemistry and physiology* 63, 177-181.

Maxwell M.H., Robertson G.W. (1998). The avian heterophil leucocyte: a review. *World's poultry science journal* 54, 155-178.

Munson T.O., Holzworth J., Small E., Witzel S., Jones T.C., Luginbuhl H. (1958). Steatitis ('yellow fat') in cats fed canned red tuna. *Journal of the American veterinary medical association* 133, 563-568.

Mutinelli F., Corro M., Catania S., Melchiotti E. (2008). Multiple feather follicle cysts in a moroseta hen. *Avian diseases* 52, 345-357.

Nakano Y., Une Y. (2012). Hemangiosarcoma with widespread metastasis that originated on the metatarsal pad of a java sparrow. *Journal of veterinary medical science* 74, 621-623.

Neagari Y., Arai S., Udagawa M., Onuma M., Odaya Y., Kawasaki T., Tanpaku M., Hayama H., Hadara K., Mizukami M., Murata K. (2011). Steatitis in egrets and herons from Japan. *Wildlife disease association* 47, 49-55.

Nischal U, Nischal K.C., Khopkar U. (2008). Techniques of skin biopsy and practical considerations. *Journal of cutaneous and aesthetic surgery* 1, 107-111.

Niza M.M.R.E., Vilela C.L, Ferreira L.M.A. (2003). Feline pansteatitis revisited: hazards of unbalanced home-made diets. *Journal of feline medicine and surgery* 5, 271-277.

Ozaki K., Yamagami T., Nomura K., Haritani M., Tsutsumi Y., Narama I. (2003). Abscess-forming inflammatory granulation tissue with gram-positive cocci and prominent eosinophil infiltration in cats: possible infection of methicillin-resistant staphylococcus. *Veterinary pathology* 40, 283-287.

Palmieri C., Cusinato I., Avallone G., Shivaprasad L., Salda L.D. (2011). Cloacal fibrosarcoma in a canary. *Journal of avian medicine and surgery* 25, 277-280.

Pandian C., Sundaresan A., Murugan M. (2012). Vitamins and poultry nutrition. *The north-east veterinarian* 12, 23-24.

Paraschiv I., Tudor L., Condruț E., Tudor N, Militaru M. (2014). Case report: multiple investigations on a large feather cyst in a canary. *Lucrări științifice medicină veterinară* 47, 107-112.

Pass D.A. (2007). The pathology of the avian integument: a review. *Avian pathology* 18, 1-72.

Pollock C.G., Sleeman J.M., Houle C.D., Ramsay E.C. (1999). Vitamin E deficiency and pansteatitis in juvenile boat-billed herons. *Journal of zoo and wildlife medicine* 30, 297-300.

Ramis A., Gibert X., Majó N., Grifols J. (1999). Metastatic oral squamous cell carcinoma in a Montagu's harrier. *Journal of veterinary diagnostic investigation* 11, 191-194.

Sandercock D.A., Hunter R.R., Nute G.R., Mitchell M.A., Hocking P.M. (2001). Acute heat stress-induced alterations in blood acid-base status and skeletal muscle membrane integrity in broiler chickens at two ages: implications for meat quality. *Poultry science* 80, 418-425.

Sanger V.L., Lagace A. (1966). Avian xanthomatosis: etiology and pathogenesis. *Avian diseases* 10, 103-111.

Sledge D.G., Radi Z.A., Miller D.L., Lynn B.S. (2006). Subcutaneous haemangiosarcoma in a cockatiel. *Journal of veterinary medicine* 53, 293-295.

Souza M.J., Johnstone-McLean N.S., Ward D., Newkirk K. (2009). Conjunctival xanthoma in a blue and gold macaw. *Veterinary ophthalmology* 12, 53-55.

Suedmeyer W.K., McCaw D., Turnquist S. (2001a). Attempted photodynamic therapy of squamous cell carcinoma in the casque of a great hornbill. *Journal of avian medicine and surgery* 15, 44-49.

Suedmeyer W.K., Witter R.L., Bermudez A. (2001b). Hemangiosarcoma in a golden pheasant. *Journal of avian medicine and surgery* 15, 126-130.

Taylor F.G., Mair T.S., Brown, P.J. (1988). Generalised steatitis in an adult pony mare. *The Veterinary record* 122, 349-351.

Tell L.A., Woods L., Mathews K.G. (1997). Basal cell carcinoma in a blue-fronted amazon parrot. *Avian diseases* 41, 755-759.

Thomson A.E., Squires E.J., Gentry P.A. (2002). Assessment of factor V, VII and X activities, the key coagulant proteins of the tissue factor pathway in poultry plasma. *British poultry science* 43, 313-321.

Tully T.N., Dorrestein G.M., Jones A.K. (2009). Handbook of avian medicine. 2nd edition. Saunders elsevier, Philadelphia, p 53-325.

Turrel J.M., McMillan M.C., Paul-Murphy J. (1987). Diagnosis and treatment of tumors of companion birds I. AAV Today 1, 109-116.

Wagner J.E., Dietlein D.R. (1970) Steatitis in an American white pelican. International zoo yearbook 10, 174-175.

Watson T.D.G. (1998). Diet and skin disease in dogs and cats. The journal of nutrition 128, 2783-2789.

Wong E., Mikaelian I., Desnoyers M., Fitzgerald G. (1999). Pansteatitis in a free-ranging red-tailed hawk (*Buteo jamaicensis*). Journal of zoo and wildlife medicine 30, 584-586.

Zini E., Hauser B., Ossent P., Dennler R., Glaus T.M. (2007). Pansteatitis and severe hypocalcaemia in a cat. Journal of feline medicine and surgery 9, 168-171.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

INTRAVAGINALE KUNSTMATIGE INSEMINATIE BIJ EEN RAGDOLL

door

Astrid STROOBANTS

Promotor: Dr. Tom Rijsselaere

Copromotor: Dierenarts Féline Snoeck

Klinische casusbespreking in

het kader van de masterproef

© 2015 Astrid Stroobants

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

INTRAVAGINALE KUNSTMATIGE INSEMINATIE BIJ EEN RAGDOLL

door

Astrid STROOBANTS

Promotor: Dr. Tom Rijsselaere

Copromotor: Dierenarts Féline Snoeck

Klinische casusbespreking in

het kader van de masterproef

© 2015 Astrid Stroobants

VOORWOORD

Eerst en vooral zou ik graag mijn promotor, Dr. Tom Rijsselaere, willen bedanken voor de begeleiding tijdens deze masterproef. De delen tekst die ik doorstuurde werden altijd snel verbeterd. Het was aangenaam om telkens een opbouwende feedback te ontvangen. Verder zou ik dierenarts Féline Snoeck willen bedanken voor het verschaffen van informatie in verband met deze casus. Als laatste zou ik Hans Thaelen willen bedanken voor de hulp met de lay-out van deze masterproef.

INHOUD

SAMENVATTING	1
INLEIDING.....	2
LITERATUURSTUDIE	3
1. Cyclus bij de katin.....	3
2. Cyclusopvolging	5
2.1 Gedrag.....	5
2.2 Vaginale cytologie	6
3. Optimale inseminatietijdstip.....	8
4. Spermacollectie	10
4.1 Kunstvagina.....	10
4.2 Elektroejaculatie	11
4.3 Urethrale katheterisatie	13
4.4 Epididymaal sperma.....	13
5. Evaluatie van het sperma.....	14
6. Bewaring van sperma.....	17
6.1 Gekoeld sperma	17
6.1 Diepvriessperma.....	17
7. Kunstmatige inseminatie	18
7.1 Intravaginale inseminatie.....	18
7.2 Intra-uteriene inseminatie	19
7.2.1 Laparoscopische inseminatie	19
7.2.2 Transcervicale katheterisatie.....	20
CASUS	22
1. Signalement.....	22
2. Anamnese.....	22
3. Plan.....	22
3.1 Sperma-afname.....	22
3.2 Sperma-evaluatie	23
3.3 Inductie van de ovulatie.....	23
3.4 Kunstmatige inseminatie	23
4. Opvolging.....	23
BESPREKING	24
REFERENTIES.....	25

SAMENVATTING

Deze casus handelt over twee Ragdolls, een kattin en een kater, die aangeboden werden in de kliniek voortplanting en verloskunde van de gezelschapsdieren (faculteit diergeneeskunde, Merelbeke). Tijdens vorige krolsheden vertoonde de kattin alle tekenen van krolsheid maar was steeds agressief tegenover de kater wanneer deze wilde dekken. Er waren al verschillende dek pogingen ondernomen, echter zonder succes. Tussen twee krolsheden waren er telkens ongeveer drie weken bij deze kattin. De eigenaars besloten naar de faculteit te komen voor een intravaginale kunstmatige inseminatie (KI) met het sperma van hun eigen kater. Deze kater had reeds nestjes gehad, was nooit ziek geweest en had ook geen medicatie gekregen de afgelopen periode. Zijn sperma werd echter nog nooit onderzocht. Voor de sperma-afname werd gekozen voor urethrale katheterisatie. Het sperma werd verzameld met behulp van een urinaire katheter en in een voorverwarmd Eppendorfbuisje gebracht waarna het verdund werd met een verdunner bestaande uit eigeel, TRIS, fructose en citraat. Er werd enkel een kleine druppel van het sperma onderzocht onder een microscoop. De enige parameter die werd beoordeeld was de motiliteit die normaal was. De ovulatie werd geïnduceerd d.m.v. 150 IU hCG. Daarna werd de kattin intravaginaal geïnsemineerd. Na drie weken lieten de eigenaars d.m.v. echografie een drachtigheidsonderzoek uitvoeren bij hun eigen dierenarts waaruit bleek dat de kattin niet drachtig was.

Kernwoorden: Cyclus kattin - Kunstmatige inseminatie - Sperma-afname - Spermabewaring - Sperma-onderzoek

INLEIDING

Doordat er bij de kattenfokkers steeds meer interesse is voor KI en de huiskat ook gebruikt kan worden als model voor bedreigde wilde katachtigen, werd er de voorbije jaren veel onderzoek uitgevoerd naar de voortplanting bij de kat (Rijsselaere en Van Soom, 2010). De kattin is een geïnduceerde ovulator, wat het een uniek dier op gebied van voortplanting maakt (Concannon et al., 1980). In deze casus wordt daarom eerst een kort overzicht gegeven over de cyclus van de kat.

De kater ejaculeert slechts een klein volume aan sperma (Axnér en Forsberg, 2002), waardoor het belangrijk is om de cyclus bij de kattin goed op te volgen om zo het juiste inseminatietijdstip te bepalen. In deze casus wordt de cyclusopvolging aan de hand van het gedrag en de vaginale cytologie toegelicht. Ook wordt aan de hand van een onderzoek door Chatdarong et al. (2002) het optimale inseminatietijdstip voor intravaginale inseminatie besproken.

Men kan KI toepassen wanneer natuurlijke dekking onmogelijk is door anatomische-, fysiologische- of gedragsproblemen bij de kater of kattin (Rijsselaere en Van Soom, 2010). Alvorens men kan insemineren, moet er sperma afgenomen worden bij de kater wat kan gebeuren op verschillende manieren namelijk met behulp van een kunstvagina, elektro-ejaculatie en urethrale katheterisatie toegelicht. Ook wordt er kort wat informatie gegeven over het collecteren van epididymaal sperma bij de kater.

Een andere reden voor het gebruik van KI is dat het mogelijk wordt om genetisch materiaal van waardevolle dieren te bewaren en wereldwijd te transporteren (Rijsselaere en Van Soom, 2010). Om de kwaliteit van het sperma te beoordelen, worden macroscopische parameters zoals volume en uitzicht, en microscopische parameters zoals motiliteit, morfologie, concentratie en levensvatbaarheid beoordeeld (Zambelli en Cunto, 2006). Vervolgens kan het sperma gekoeld aan 4°C bewaard worden gedurende een korte periode (Chatdarong et al., 2009) of ingevroren worden in rietjes gedurende een zeer lange periode (Toyonaga et al., 2011). De evaluatie en enkele veel voorkomende abnormaliteiten van het sperma van de kat worden toegelicht. Ook worden twee methodes voor het invriezen van sperma in verschillende stappen besproken in deze casus.

De eerste succesvolle KI bij de kat werd veertig jaar geleden beschreven door Sojka et al. (1970). Hierna zijn er wereldwijd verschillende studies uitgevoerd om nieuwe en betere technieken te ontwikkelen. Enkele van deze inseminatietechnieken worden besproken in de literatuurstudie. Vaginale inseminatie, laparoscopische inseminatie en transcervicale inseminatie komen zullen hierbij aan bod komen.

LITERATUURSTUDIE

1. Cyclus bij de kattin

De poes is van nature een seizoensgebonden poly-oestrisch dier. Buitenkatten vertonen een seizoensgebonden anoestrus van oktober/november tot december/januari. In huis gehouden katten die onder kunstlicht leven, kunnen echter het hele jaar door cycleren (Van Soom en Rijsselaere, 2013-2014). Er zijn twee tijdsgebonden pieken waarin kattinnen in oestrus komen. De eerste in januari/februari wanneer het aantal uur licht in een dag toeneemt en een tweede in de zomer (Say et al., 2001). Een kattin in anoestrus zal een kater verjagen door haar agressief gedrag. Als een kater haar toch probeert te bespringen, zal ze agressief reageren en het perineum bedekken met haar staart (Beaver, 2003).

De fase die de oestrus vooraf gaat is de pro-oestrus die 0 tot 2 dagen duurt (Van Soom en Rijsselaere, 2013-2014). Het gedrag zal sterk variëren tussen verschillende individuen. Slechts 16,1% van de kattinnen vertoont veranderingen in gedrag tijdens de pro-oestrus (Beaver, 2003). Het begint met subtiele tekenen zoals verhoging in algemene activiteit en meer tegen voorwerpen aanwrijven, vooral met de kop en de nek. De kat is aanhankelijker naar de mens en de kater maar ze zal nog geen dekking toelaten (Beaver, 2003). Gedurende deze periode wordt er follikel stimulerend hormoon (FSH) uitgescheiden door de hypofysevoorkwab. FSH stimuleert de ontwikkeling van follikels in de ovaria. Wanneer de follikels groter worden is er een stijging van de oestradiol-17 β concentraties in het serum (Bristol-Gould en Woodruff, 2006). Oestradiol wordt gesecreteerd door de ovariële granulosa cellen en veroorzaakt vaginale verhoorning en oestrusgedrag (Shille et al., 1979). Wanneer de oestrus nadert, zullen drie tot zeven follikels dominant worden terwijl andere ontwikkelende follikels atresie ondergaan (Bristol-Gould en Woodruff, 2006).

Het gedrag tijdens de oestrus is bij de meeste katten vrij duidelijk te zien. De kattin wordt aanhankelijker, miauwt meer en verliest vaak haar eetlust. Ze zal niet langer agressief reageren wanneer de kater haar bespringt en zal lordosis vertonen (Fig. 1). Bij lordosis drukt de poes de ventrale thorax en het abdomen plat op de grond terwijl ze haar perineum omhoog houdt en op een ritmische manier met haar klauwen van de achterpoten de vloer grijpt. Ook kan er staartdeviatie en rollen uitgelokt worden door het aaien of aanraken van het perineum, de flank of de rug (Beaver, 2003). De gemiddelde lengte van de oestrus is 7 tot 9 dagen. Bij het begin van deze fase wordt binnen de 24u een sterke stijging van oestradiol-17 β gezien wat een abrupte seksuele bereidheid tot gevolg heeft (Shille et al., 1979). De progesteronconcentratie zal echter basaal blijven tot na de ovulatie (Van Soom en Rijsselaere, 2013-2014).

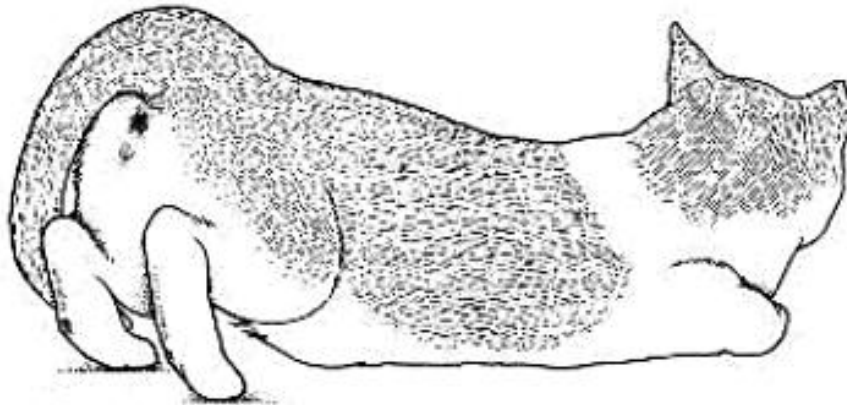


Fig. 1: Tijdens de oestrus zal de kattin vaak een lordosishouding aannemen (uit: Turner en Turner, 1994)

De kat is een geïnduceerde ovulator. Ze ovuleert in respons op een of meerdere copulaties maar ovulatie kan ook geïnduceerd worden door een fysieke stimulus, zoals prikkeling van de vagina met een wattenstaafje, of door feromonen in de omgeving (Bristol-Gould en Woodruff, 2006). Wanneer de kattin gedekt wordt, zal luteïniserend hormoon (LH) vrijgesteld worden uit de hypofyse na 10 minuten. Na een half uur tot twee uur kunnen piekconcentraties van 20- tot 30-maal de beginconcentratie waargenomen worden en na vier uur is LH nog steeds verhoogd (Concannon et al., 1980). Door deze LH-release zal ovulatie geïnduceerd worden waarna corpora lutea (CL) gevormd worden, die in het begin ook corpora rubra worden genoemd vanwege de rode kleur (Van Soom en Rijsselaere, 2013-2014). De ovulatie komt 25 tot 50u na de dekking tot stand (Concannon et al., 1980). Meestal is één enkele copulatie echter niet voldoende om een ovulatie te induceren. In een studie door Concannon et al. (1980) ovuleerden slechts 50% van de kattinnen wanneer deze eenmaal gedekt werden en 100% bij frequente dekkingen (drie- tot viermaal) in een korte tijd. Er was ook een hogere concentratie LH in het serum die langer aanwezig bleef bij kattinnen die frequent gepaard hadden (Fig. 2). Een optimale LH-piek wordt verkregen na vier natuurlijke dekkingen in een tijdsperiode van twee tot vier uur (Concannon et al., 1980).

Wanneer de poes ovuleert, volgt na de oestrus de metoestrus. Deze fase wordt ook wel de luteale fase genoemd omdat er functionele corpora lutea aanwezig zijn. Deze produceren progesteron waardoor er hoge concentraties in het bloed aanwezig zijn (Bristol-Gould en Woodruff, 2006). De metoestrus duurt 40 dagen bij het niet drachtige dier en wordt dan ook wel pseudograviditeit genoemd. Bij een drachtig dier duurt de luteale fase 65 dagen (Van Soom en Rijsselaere, 2013-2014). De kattin zal in deze fase opnieuw agressief reageren wanneer de kater haar probeert te dekken (Beaver, 2003).

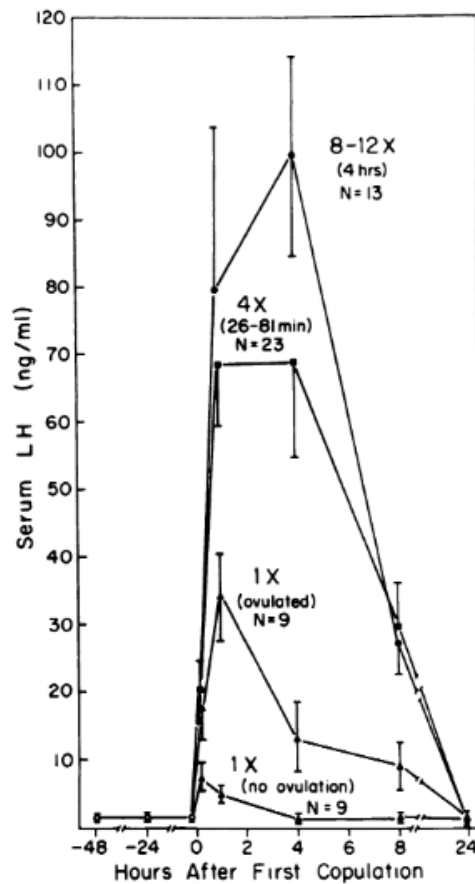


Fig. 2: Gemiddelde concentraties luteïniserend hormoon in het serum van katten die geovuleerd hebben na één copulatie en na 4 copulaties in een periode van 26-81 minuten of na 8-12 copulaties gedurende een periode van 4u. Alle dekkingen werden gedaan op de derde dag van de oestrus (uit: Concannon et al., 1980)

Wanneer de poes niet gedekt wordt of gedekt werd maar niet geovuleerd heeft, zal ze geen corpus luteum ontwikkelen en dus niet in metoestrus gaan. Deze fase wordt de post-oestrus genoemd, ook gekend als de interoestrus (Bristol-Gould en Woodruff, 2006). Deze duurt gemiddeld 8 tot 15 dagen en gaat vooraf aan de volgende oestrus. Het interval tussen twee krolsheden waarbij geen ovulatie optreedt, is dus gemiddeld 2 tot 3 weken maar kan sterk variëren (Van Soom en Rijsselaere, 2013-2014).

2. Cyclusopvolging

2.1 Gedrag

Aan de hand van het gedrag kan men het begin van de oestrus bij de katin redelijk gemakkelijk inschatten. De belangrijkste gedragsveranderingen tijdens de cyclus werden hierboven reeds besproken.

2.2 Vaginale cytologie

Via een vaginale swab kan men de cyclusveranderingen bij de kat opvolgen. Tijdens de verschillende oestrustadia zijn er veranderingen in de epitheliale cellen te zien. Bij een stijging van oestradiol-17 β zullen de vaginale epitheelcellen verhoornen (Chatdarong et al., 2002). Deze verhoorde superficiële cellen (Fig. 3) zijn de grootste cellen op vaginale cytologie en hebben een lage nucleus/cytoplasma ratio. Ze zijn ovaal en afgeplat, met een kleine en ovale tot pyknotische kern (Mills et al., 1979). Intermediaire cellen (Fig. 4) variëren in grootte en zijn kleiner dan de superficiële cellen. Kleine intermediaire cellen zijn rond tot ovaal terwijl grotere een onregelmatige of hoekige cytoplasmaraand hebben. Hun kern is rond en licht afgeplat (Mills et al., 1979, Van Soom en Rijsselaere, 2013-2014). Als laatste zijn er de parabasale epitheliale cellen (Fig. 5). Dit zijn de kleinste cellen en hebben een duidelijke, sferische kern. Ze bezitten de hoogste nucleus/cytoplasma ratio van alle cellen die gevonden worden bij vaginale cytologie (Mills et al., 1979). In tabel 1 zijn de dimensies van de verschillende vaginale epitheelcellen samengevat.

Tabel. 1: Dimensies van de vaginale epitheelcellen bij de kat (uit: Mills et al., 1979).

Cell Type	Cytoplasm		Nuclei		N/C Ratio
	length	width	length	width	
Superficial	68.5 (10.5)	41.8 (11.9)	7.9 (1.2)	5.6 (1.5)	0.02
Intermediate	44.7 (8.9)	37.5 (7.7)	10.0 (2.1)		0.06
Parabasal	18.6 (2.8)		8.3 (1.7)		0.20

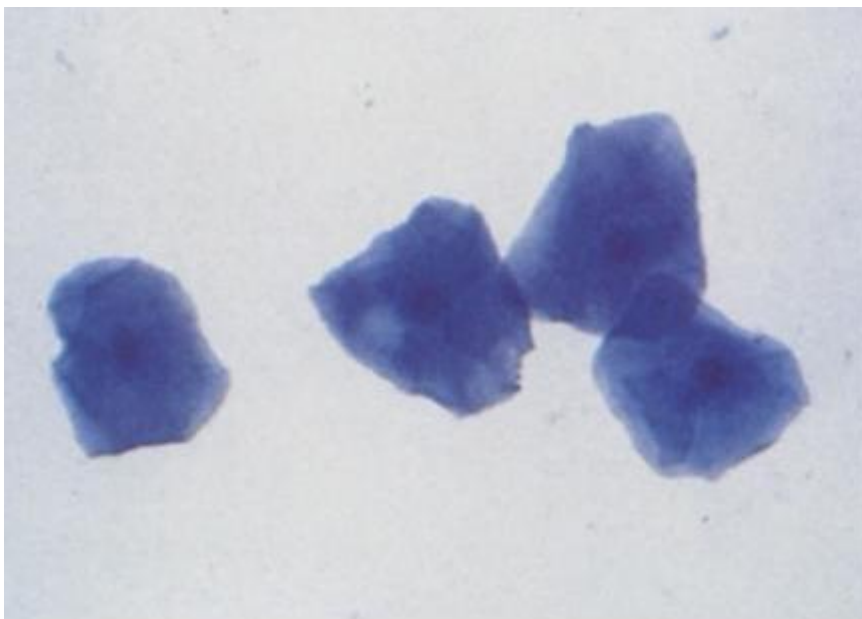


Fig. 3: Verhoorde superficiële cellen met pyknotische nuclei zijn te zien tijdens de oestrus (Wright kleuring, 100x vergroting) (uit: Cowell en Valanciano, 2013).

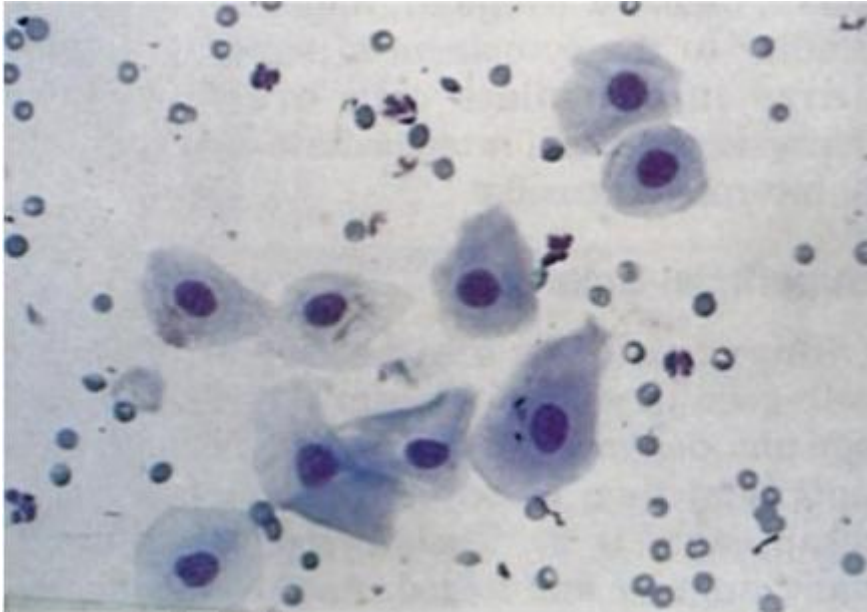


Fig. 4: Intermediaire epitheelcellen zijn te zien tijdens de proestrus. Er zijn ook enkele rode bloedcellen en neutrofielen zichtbaar (Wright kleuring, 100x vergroting) (uit Cowell en Valanciano, 2013).

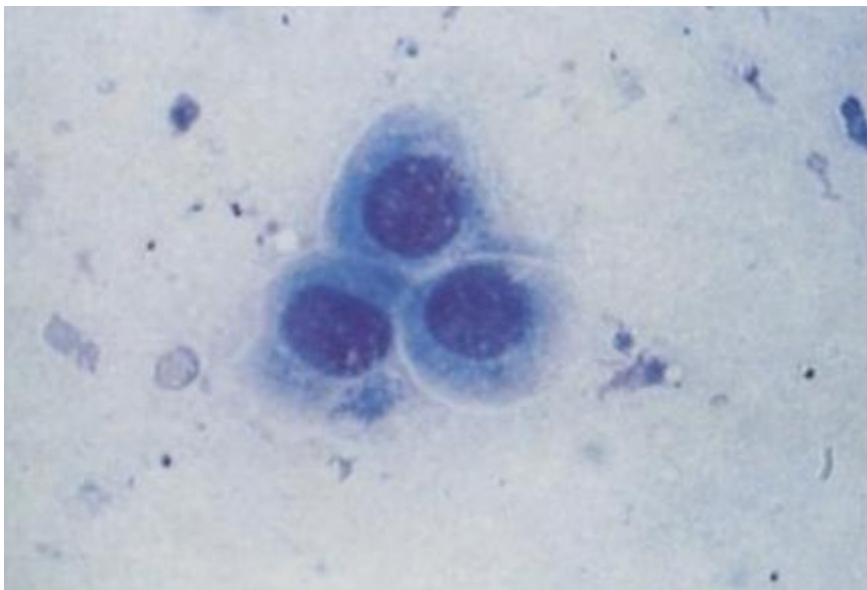


Fig. 5: Parabasale cellen te zien tijdens de anoestrus (Wright stain, 400x vergroting) (uit Cowell en Valanciano, 2013).

Mills et al. (1979) onderzochten de verschillende vaginale cellen gedurende de oestruscyclus door gebruik te maken van de Maturatie Index (MI). Deze index geeft het percentage parabasale, intermediaire cellen en superficiële epitheelcellen aan. Tijdens de pro-oestrus bevatten de uitstrijkjes grote aantallen middelgrote tot grote intermediaire cellen en een paar nucleaire superficiële cellen. Er waren 18% parabasale, 60% intermediaire en 22% superficiële cellen aanwezig tijdens de pro-oestrus (Mills et al., 1979). De gemiddelde MI van vier onderzochte kattinnen was dus 18:60:22. Neutrofielen zijn zelden aanwezig in dit stadium. Tijdens de oestrus waren de vaginale uitstrijkjes zeer celrijk met

grote aantallen nucleaire en anucleaire verhoorde superficiële epitheelcellen. Er waren geen parabasale cellen en neutrofielen aanwezig en slechts een klein aantal intermediaire cellen. De gemiddelde maturatieindex van acht onderzochte kattinnen was 0:12:88. Gedurende de vroege metoestrus bevatten de uitstrijkjes vooral intermediaire epitheelcellen en een laag aantal superficiële cellen. De gemiddelde MI van vijf kattinnen was twee dagen na de oestrus 9:76:15. Vier tot negen dagen na de oestrus verhoogde het aantal parabasale cellen waardoor de gemiddelde MI van acht kattinnen 48:50:2 was. Tijdens dit stadium waren er ook vaak bacteriën en neutrofielen te zien. In de anoestrus waren de uitstrijkjes weinig cellulair in vergelijking met de oestrus. Er waren vooral middelgrote intermediaire cellen aanwezig met een paar parabasale cellen. De gemiddelde MI van 34 katten in anoestrus was 10:87:3 (Tabel 2) (Mills et al., 1979).

Tabel 2: De gemiddelde percentages van parabasale, intermediaire en superficiële vaginale epitheelcellen en neutrofielen tijdens de verschillende stadia van de oestrus bij de katin (uit: Mills et al., 1979).

Cycle Stage	No. of Smears	Parabasal Cells	Intermediate Cells	Nucleated Superficial Cells	Anucleated Superficial Cells	Neutrophils per 100 Epithelial Cells
Estrus						
Mean	20	0.3	11.6	63.6	24.5	4.7 ^d
Range		0-3	0-25	5-90	3-95	0-10
Early Metestrus ^a						
Mean	8	8.9	75.7	13.2	1.9	32
Range		0-29	50-100	0-41	0-3	1-78
Late Metestrus ^b						
Mean	8	48	50	2	0	32
Range		10-85	10-85	0-5	0	0-97
Anestrus						
Mean	34	9.7	87.4	2.7	0.2	3
Range		0-50	50-100	0-22	0-2	0-50
Proestrus ^c						
Mean	4	17.8	60.3	19.6	2.2	8 ^e
Range		0-34	57-67	6-40	0-6	0-33

^a Twee dagen posteoestrus

^b Vier tot negen dagen posteoestrus op het tijdstip van een maximaal aantal parabasale cellen

^c Twee dagen voor de oestrus

^d Neutrofielen alleen aanwezig in oestrus bij drie katten waarbij ook bacteriën te zien waren op vaginale cytologie

^e Neutrofielen enkel aanwezig in pro-oestrus bij één kat waarbij ook bacteriën te zien waren op vaginale cytologie.

3. Optimale inseminatietijdstip

Intravaginale inseminatie is een niet-invasieve en technisch gemakkelijke procedure. Het moet echter wel op het juiste moment tijdens de oestrus uitgevoerd worden. De cervicale doorgang varieert immers met het stadium van de oestruscyclus en is een belangrijke factor die het succes van

intravaginale inseminatie beïnvloedt (Chatdarong et al., 2007). Chatdarong et al. (2002) onderzochten bij zes katten de doorgang van de cervix met behulp van het inspuiten van contrastmedium in de craniale vagina. Dit deden ze gedurende de vroege oestrus, de midoestrus, de late oestrus en de interoestrus. Bij drie kattinnen was er tijdens alle stadia van de oestrus transcervicaal transport van het contrastmedium (Fig. 6: Kat III, V en VI). Bij een andere katin alleen gedurende de mid-oestrus, late oestrus en één dag na de oestrus (Fig. 6: Kat IV). Bij de laatste twee kattinnen was er enkel doorgang gedurende de late oestrus (Fig. 6: Kat I en II).

Tijdens de interoestrus is er dus geen passage van het contrastmedium door de cervix. Uit de studie bleek ook dat de doorgankelijkheid van de cervix in relatie staat met de graad van verhoorning van de vaginale cellen. De cervix was open gedurende de aanwezigheid van maximale verhoorning (>80%). Deze verhoorning volgt de piek van de serumconcentraties van oestradiol-17 β . Het sluiten van de cervix werd gezien op het einde van het oestrusgedrag en wanneer de verhoorning van het vaginale epitheel terug afnam (Chatdarong et al., 2002).

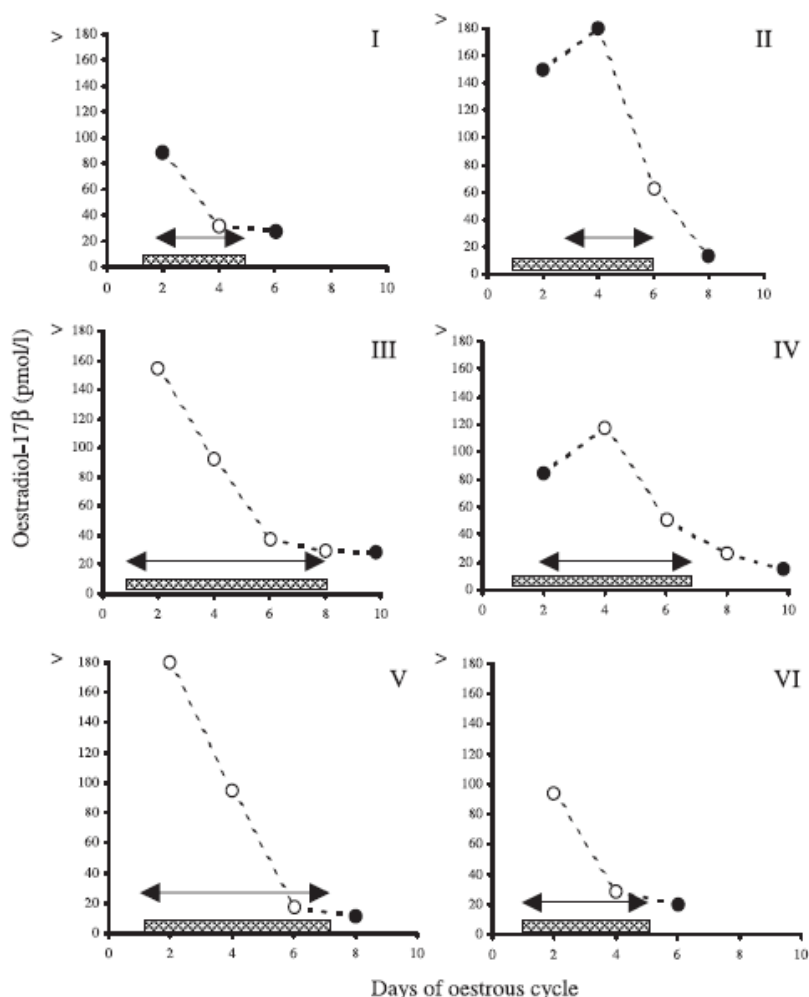


Fig. 6: Cervicale doorgankelijkheid voor contrastmedium bij zes kattinnen (I-VI) gedurende de oestrus in relatie met de serum oestradiol-17 β concentratie, de periode van oestrusgedrag (balk) en de cytologische oestrusperiode (pijlen). De witte cirkel illustreert een open cervix, de zwarte cirkel een gesloten cervix (uit: Chatdarong et al., 2002)

Bij de kattin is het begin van de finale groei van de follikels en de stijging van de oestradiol-17 β concentratie abrupt waardoor de kattin plots seksueel receptief wordt (Shille et al., 1979). Het oestrusgedrag start meestal $1,8 \pm 1,7$ dagen na een verhoging van de plasmaconcentraties van oestradiol-17 β (Chatdarong et al., 2002). De relatie van cervicale doorgankelijkheid, oestrusgedrag, vaginale verhoorning met de serumconcentratie van oestradiol-17 β (Fig. 6) in deze studie suggereert dat intravaginale inseminatie het best kan uitgevoerd worden op de tweede dag van de oestrus wanneer de cervix open is, de serumconcentratie van oestradiol-17 β een piek bereikt en de kattin dekking toelaat. Twee dagen later is een tweede inseminatie nodig bij kattinnen waarvan de cervix slechts open is gedurende de late oestrus (Chatdarong et al., 2002).

4. Spermacollectie

4.1 Kunstvagina

Sperma-afname met behulp van een kunstvagina werd als eerste beschreven door Sojka et al. (1970). De kunstvagina kan gemaakt worden uit een 2 ml rubberen peer van een pipet en een klein Eppendorfbuisje (Fig. 7). Dit wordt in een polyethyleen fles gevuld met water met een temperatuur van 37°C (Rijsselaere en Van Soom, 2010) of 52°C (Zambelli en Cunto, 2006) geplaatst. Deze kunstvagina wordt over de penis in erectie geplaatst wanneer de kater de kattin bespringt.



Fig. 7: Kunstvagina gemaakt uit een plastieken Eppendorfbuisje en een rubberen peer van een Pasteur pipet (uit Zambelli en Cunto, 2006).

De sperma-afname is voltooid na één tot vier minuten (Zambelli en Cunto, 2006). Wanneer de afnames drie keer per week gedaan worden, bleek het sperma een constant volume te hebben. Ook na afname om de dag bleek de spermakwaliteit stabiel te blijven gedurende tien dagen. Dagelijkse

afname zorgt voor een vermindering in het volume en het aantal spermatozoa zal vanaf dag vier tot minder dan de helft van het aantal op de eerste dag zakken (Zambelli en Cunto, 2006). De motiliteit en leefbaarheid, het aantal abnormale vormen en het seksueel libido van de kater veranderen niet in functie van het aantal afnames. Het aantal immature spermacellen verhoogt dan weer bij dagelijkse afname (Tanaka et al., 2000a). De voordelen van een kunstvagina zijn dat deze niet duur is, er geen fysieke of chemische middelen nodig zijn om de kat in bedwang te houden en dat er maar één persoon nodig is voor de afname. Bij het gebruik van een kunstvagina heeft men echter een getrainde kater nodig en in de meeste gevallen ook een 'teaser' kattin. Deze kattin is een vrouwelijke kat die in oestrus is of een gesteriliseerde kattin die behandeld werd met oestrogenen (Zambelli en Cunto, 2006). Deze methode is moeilijk uit te voeren en gaat bij ongetrainde katers vaak gepaard met stress. Voor katers die slechts een enkele keer in de praktijk komen is deze techniek dus niet aan te raden en praktisch vaak niet uit te voeren.

4.2 Elektroejaculatie

Elektroejaculatie is een andere methode voor sperma-afname bij de kat. Anesthetica zijn essentieel bij elektroejaculatie omdat reacties bij wakkere dieren aantonen dat de procedure geassocieerd is met pijn (Platz en Seager, 1978). Het meest gebruikt anestheticum bij elektroejaculatie is ketamine, ofwel alleen ofwel in combinatie met medetomidine, xylazine, diazepam, phenotiazine derivaten of inhalatieanesthetica zoals isofluraan (Zambelli et al., 2007). Ook propofol kan gebruikt worden en wordt best als een bolus (10 mg/kg IV) toegediend (Chatdarong et al., 2006). Een protocol dat gebruikt kan worden is een combinatie van medetomidine (80 µg/kg SC/IM) en ketamine-HCl (5 mg/kg IM) (Axnér et al., 1998). Medetomidine geeft een hogere spermaconcentratie dan ketamine. Dit is een gevolg van de werking van medetomidine op de α_2 -adrenoreceptoren. Deze adrenerge werking zorgt voor contractie van de vas deferens en het trigonum en sfincter van de blaas gedurende de ejaculatie, wat zorgt voor een hogere sperma-output (Zambelli et al., 2007).

Wanneer de kater geanestheseerd is, worden de faeces verwijderd uit het rectum waarna een probe met drie elektroden 6 tot 8 cm wordt ingebracht (Fig. 8). Hierna wordt een serie van elektrische stimuli gebruikt die de kater doet ejaculeren. Het sperma wordt opgevangen in een Eppendorfbuisje (Fig. 9) (Howard et al., 1990, Rijsselaere en Van Soom, 2010). In de literatuur zijn verschillende protocols voor elektroejaculatie beschreven. Een voorbeeld van een protocol door Howard et al. (1990) wordt afgebeeld in tabel 3. Deze procedure bestaat uit 80 elektrische stimuli van 2 tot 5 volt die in drie series worden toegediend. Elke stimulus wordt 2 tot 3 seconden aangehouden. Tussen elke serie krijgt de kater een pauze van een twee- tot drietal minuten.

Tabel 3: Protocol voor elektroejaculatie bij de kat (naar Howard et al., 1990)

	Set 1			Set 2			Set 3		
Stimulations (<i>n</i>)	10	10	10	10	10	10	10	10	
Voltage (<i>V</i>)	2	3	4	3	4	5	4	5	

Het aantal spermatozoa verkregen bij elektroejaculatie is afhankelijk van het aantal volt dat gebruikt wordt bij de stimulatie en het aantal elektrische stimuli. Bij 4 en 8 volt zijn er grotere aantallen spermatozoa in het ejaculaat aanwezig dan bij 1 of 2 volt. Bij stimulatie met 8 volt wordt er echter wel soms urinecontaminatie gezien bij sommige ejaculaten. Het volume en het percentage levende spermatozoa in het ejaculaat wordt niet beïnvloed door het aantal volt of stimuli (Pineda en Dooley, 1984).

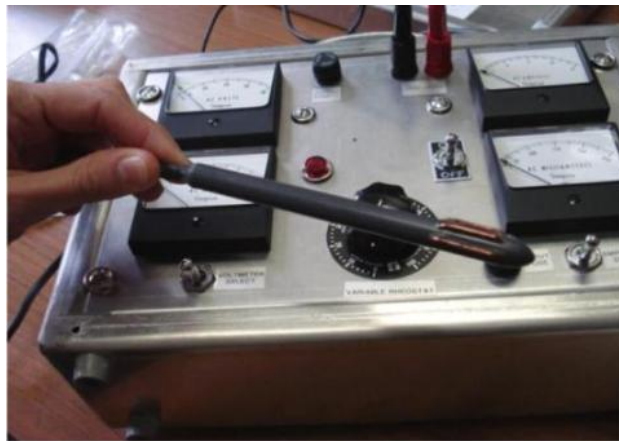


Fig. 8: Elektroejaculator met een rectale probe die drie longitudinale elektroden bevat (uit: Rijsselaere en Van Soom, 2010).

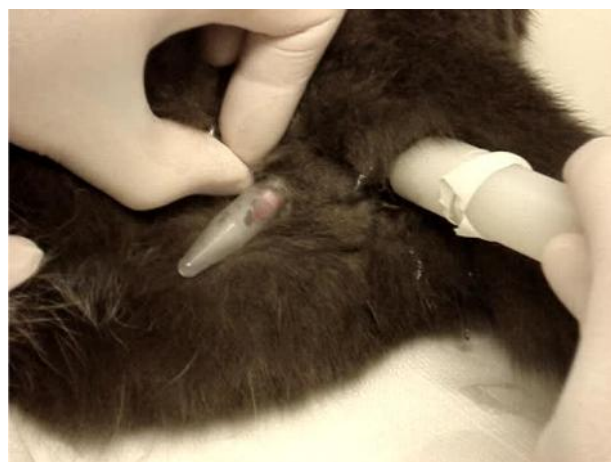


Fig. 9: Techniek voor elektroejaculatie bij de kat. De probe wordt in het rectum ingebracht en een Eppendorfbuisje wordt over de penistop gehouden om het sperma op te vangen (uit: Rijsselaere en Van Soom, 2010)

Bij deze methode is het niet noodzakelijk om te beschikken over een getrainde kater of een kattin in oestrus en deze methode kan gebruikt worden bij alle katers die veilig geanestheiseerd kunnen worden (Zambelli en Cunto, 2006). Elektroejaculatie kan echter ethisch in vraag gesteld worden en is verboden in verschillende landen. Ook is het materiaal duur en vele eigenaars en kwekers willen deze methode liever niet laten toepassen op hun dier (Rijsselaere en Van Soom, 2010).

4.3 Urethrale katheterisatie

Bij urethrale katheterisatie wordt de kater gesedeerd met behulp van medetomidine (100-150 µg/kg), wat, zoals hierboven reeds besproken, de α_2 adrenerge receptoren stimuleert en het vrijkomen van een klein volume hoog geconcentreerd sperma uit de cauda epididymis in de urethra veroorzaakt (Zambelli et al., 2007). Het sperma wordt hierna verzameld met behulp van een urinaire katheter waarvan de tip wordt afgeknipt om een kortere katheter met een open einde te bekomen. Deze wordt ongeveer 9 cm in de urethra, tot aan de prostaat, ingebracht. Men moet ervoor zorgen dat men niet in de blaas terecht komt waardoor urinecontaminatie mogelijk is (Rijsselaere en Van Soom, 2010). Door het preputium naar achter te trekken gedurende de katheterisatie kan men dit gedeeltelijk voorkomen (Zambelli et al., 2008). Hierna wordt de katheter verwijderd uit de urethra en het spermastaal wordt verzameld in een voorverwarmd Eppendorfbuisje dat een verdunner bevat (Rijsselaere en Van Soom, 2010). Bij deze methode is er geen duur materiaal nodig, het is gemakkelijk uit te voeren en er is geen training van de kater noodzakelijk. Dit alles maakt het de meest praktische en de minst invasieve procedure voor spermacollectie bij katers (Zambelli et al., 2008).

4.4 Epididymaal sperma

Spermatozoa kunnen ook verzameld worden uit de epididymis na castratie van de kater (Zambelli en Cunto, 2006). Er zijn twee verschillende technieken voor het verzamelen van spermatozoa uit de epididymis. Bij de eerste techniek wordt de cauda epididymis samen met de ductus deferens in een petrischaaltje gelegd gevuld met warme paraffine olie. De spermatozoa worden verzameld door het flushen van de epididymis door de ductus deferens met medium, wat kan uitgevoerd worden met een 30 gauge naald (Niwa et al., 1985). Een tweede methode is het insnijden van de epididymi in een petrischaal gevuld met medium. Als medium kan Hepes-TALP (*Tyrode's Albumin Lactate Pyruvate*) of een fysiologische zoutoplossing gebruikt worden. De petrischaal wordt hierna gedurende 20 minuten in een incubator geplaatst aan 39°C zodat de beweging van de spermatozoa bevorderd wordt. De spermatozoa zullen in het omgevende medium uitzwemmen en kunnen zo verzameld worden. Uiteindelijk wordt het medium met de spermatozoa gezuiverd door dichtheitsgradiëntcentrifugatie (Percoll®) (Filliers et al., 2008, Rijsselaere en Van Soom, 2010). Deze procedure is gemakkelijk uit te voeren en wordt vaak gebruikt in laboratoria voor experimenten in het kader van *in vitro* fertilisatie. Het kan ook gebruikt worden bij genetisch waardevolle katers die onverwachts gestorven zijn. Deze

techniek wordt echter weinig gebruikt in de praktijk omdat het slechts éénmaal bij dezelfde kater kan uitgevoerd worden (Zambelli en Cunto, 2006).

5. Evaluatie van het sperma

Na de afname kan men best het sperma beoordelen alvorens het gebruikt wordt voor KI. Bij katten is er echter slechts een klein volume sperma dat opgevangen kan worden waardoor sommige diagnostische procedures, frequent gebruikt bij andere diersoorten, moeilijk of onmogelijk uit te voeren zijn. Men zou op zijn minst de macroscopische parameters zoals volume en uitzicht, en microscopische parameters zoals motiliteit, morfologie, concentratie en levensvatbaarheid moeten onderzoeken (Zambelli en Cunto, 2006). Enkele parameters zijn in tabel 4 weergegeven. De kleur van het sperma moet grijswit van kleur zijn met een homogeen uitzicht (Zambelli en Cunto, 2006). Het volume kan bepaald worden door gebruik te maken van een volume gecalibreerde pipet (Zambelli et al., 2010). Met behulp van een fase-contrast microscoop met een warmteplaat kan men het percentage van motiele spermatozoa (van 0 tot 100%) en voorwaartse progressieve motiliteit (score van 0 tot 5: 0 = geen voorwaartse beweging en 5 = snelle, lineaire voorwaartse progressie) bepalen op een 100 tot 400x vergroting (Howard et al., 1993, Zambelli et al., 2010). Ook kan een sperma motiliteits index (SMI) bepaald worden om een algemene schatting te krijgen over zowel het percentage motiele spermatozoa als de voorwaartse progressieve motiliteit. Deze SMI kan berekend worden met de formule $SMI = (\% \text{ spermamotiliteit} + (\text{voorwaartse progressieve motiliteit} \times 20)) / 2$ (Howard et al., 1993).

Tabel 4: Parameters voor de spermakwaliteit bij de kater (uit: Axné en Forsberg, 2002).

Parameter	Value
Volume	0.03-0.3 ml
Concentration	100-5000 x 10 ⁶ /ml
Sperm/ejaculate	3-160 x 10 ⁶
Motility	56-85%
Normal morphology	38-95%

Er zijn verschillende mogelijkheden om spermatozoa te kleuren en elke kleuring heeft zijn voor- en nadelen. Om de verschillende spermastructuren te differentiëren wordt bijvoorbeeld best de fast green FCF-rose Bengal kleuring gebruikt. Hierbij wordt ook het acrosom aangekleurd, waar andere kleuringen vaak niet in slagen (Pope et al., 1991). Wanneer echter eigeel of glycerol wordt toegevoegd, zal dit de kleuring negatief beïnvloeden. Het eigeel veroorzaakt agglutinatie en glycerol zorgt voor minder duidelijke spermastructuren (Zambelli et al., 2008). De Hancock en Gledhill oplossing is dan weer de beste kleuring om sommige spermadefecten zoals protoplasmatische

druppels te behouden die bij andere kleuringen vaak worden geëlimineerd. Ook hier is er agglutinatie bij toevoeging van eigeel (Zambelli en Cunto, 2006). De meest voorkomende sperma-abnormaliteiten bij de kat zijn pyriform sperma, micro- en macrocephalie, een abnormaal acrosoom, bicephalen, biflagellaten, een opgerold middenstuk, een abnormale vorm van het middenstuk, immatuur sperma, proximale en distale cytoplasmadruppels en een geplooide staart of nek (Fig. 10) (Zambelli en Cunto, 2006).

De levensvatbaarheid van sperma kan bepaald worden door gebruik te maken van een eosine-nigrosinekleuring. Bij deze kleuring zullen de dode spermacellen aankleuren doordat ze eosine opnemen en de levende spermacellen met een intacte membraan blijven ongekleurd. Als laatste kan de concentratie van het sperma bepaald worden met een hemocytenmeter zoals een Bürker telkamer (Zambelli et al., 2010). Een meer gedetailleerde sperma-evaluatie kan uitgevoerd worden met behulp van computer geassisteerde sperma-analyse (CASA) (Filliers et al., 2008).

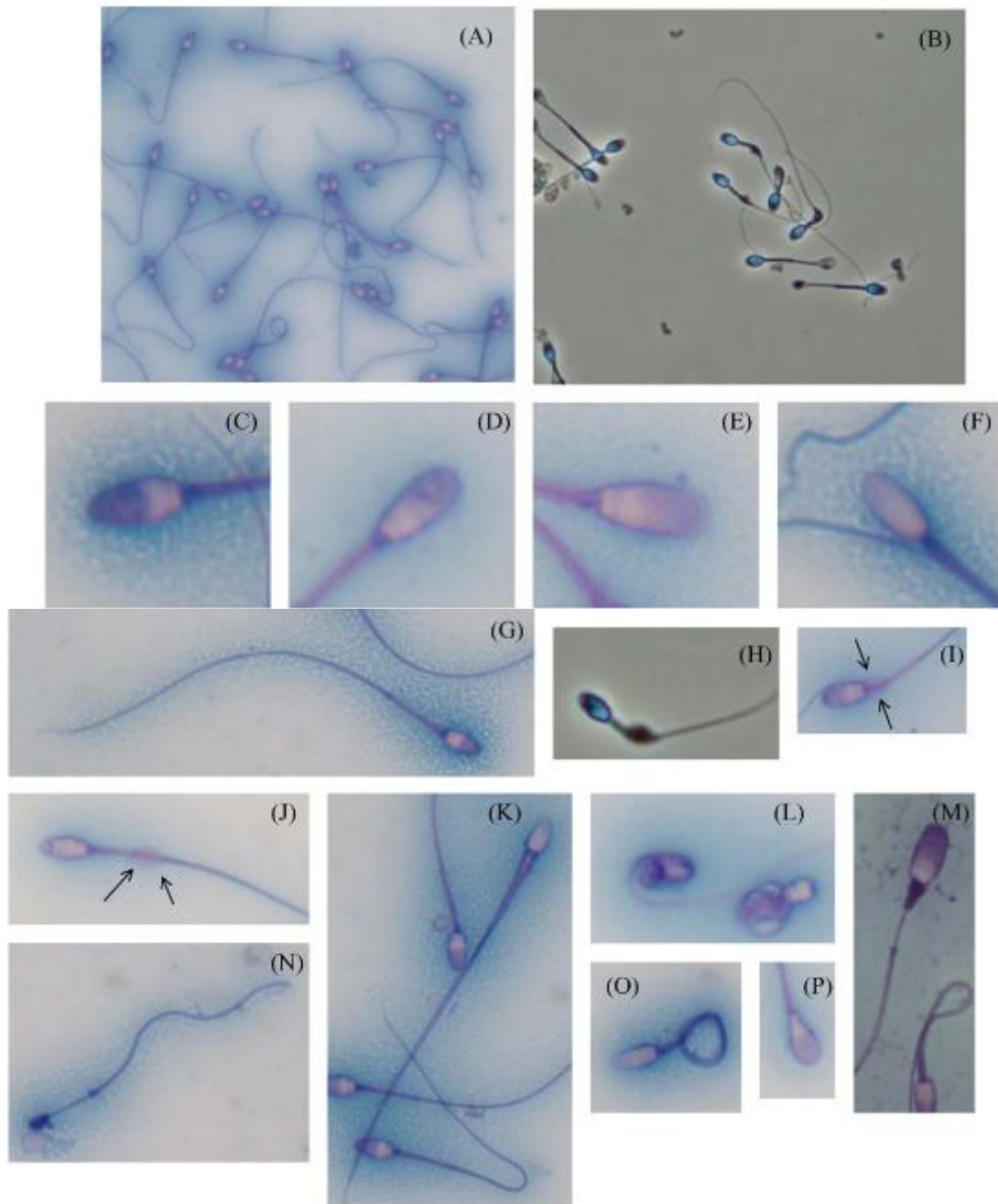


Fig. 10: A: Ejaculaat van een normale kater B: Ejaculaat van een teratospermische kat C: Normaal acrosoom D: Beschadigd acrosoom E: Gezwollen acrosoom F: Gelost acrosoom G: Normale spermacel H: Distale cytoplasmatische druppel met een gebogen middenstuk I: Proximale cytoplasmatische druppel zonder gebogen middenstuk en J: Distale cytoplasmatische druppel zonder gebogen middenstuk K: Gebogen staart L: Sterk opgerolde staart M: Macrocephaal met partiële mitochondriale aplasie N: Microcephaal met totale mitochondriale aplasie O: Opgerolde staart P: Piriform hoofd. Kleuring met fast green FCF-rose Bengal, 400-1000x vergroting (*uit: Zambelli en Cunto, 2006*).

6. Bewaring van sperma

6.1 Gekoeld sperma

Het koelen van sperma laat het bewaren van sperma op korte termijn (d.i. enkele dagen) toe. Het afkoelen verhoogt de levensduur van de spermatozoa door het verlagen van hun metabolisme. Het kan echter ook resulteren in een koude shock waardoor het sperma beschadigd wordt. De gevoeligheid voor deze koude shock is afhankelijk van de compositie van het plasmamembraan en verschilt niet alleen tussen verschillende soorten maar verschilt ook van individu tot individu (Hermansson en Axnér, 2007). Chatdarong et al. (2009) vergeleken de kwaliteit van epididymaal sperma na bewaring gedurende twee en vier dagen aan 4°C. Ze vonden dat de spermamotiliteit na bewaring van twee dagen significant hoger was dan na bewaring gedurende vier dagen. Filliers et al. (2008) onderzochten de effecten van koelen en verlengde bewaring aan 4°C. Ze observeerden dat de kwaliteit van het sperma verzameld uit de epididymis die eerst bewaard werd in een fysiologische oplossing gedurende 24 uur aan 5°C nog goed was. Na 10 dagen in een spermaverdunner waren de meeste motiliteit- en snelheidparameters aangetast en verlaagde het percentage van morfologische normale spermatozoa. Deze bewaring beïnvloedde echter niet de membraanintegriteit, acrosomale status of de DNA fragmentatie (Filliers et al., 2008). Uit een onderzoek door Toyonaga et al. (2011) bleek dat sperma dat eerst 24 uur bewaard werd aan 4°C en daarna pas gecryopreserveerd werd, even vruchtbaar is als sperma dat onmiddellijk na afname ingevroren werd. Hieruit werd ook besloten dat bewaring aan een temperatuur van 4°C gedurende 24 uur geen effect heeft op de spermakwaliteit.

6.1 Diepvriessperma

De meest gebruikte methode om sperma te bewaren is cryopreservatie waarbij het sperma ingevroren wordt aan -196°C. Voordat sperma kan ingevroren worden, wordt het eerst gecentrifugeerd (1200 x g gedurende 5 minuten) waarna het supernatans wordt verwijderd. Het sperma wordt vervolgens voor een eerste keer verdund met een verdunner die samengesteld is uit eigeel, TRIS, fructose en citraat. Hierna gebeurt er een initiële koeling in een waterbad van 4°C gedurende 1 uur. Vervolgens voegt men eenzelfde hoeveelheid verdunner toe (eigeel, TRIS, fructose en citraat) gesupplementeerd met glycerol en 'orvus es pasta'. Het sperma wordt daarna in rietjes van 250 µl gebracht en 10 minuten boven vloeibare stikstofdamp gehouden. Na deze 10 minuten worden de rietjes helemaal in de vloeibare stikstof gelegd voor het voltooien van het invriesproces (Toyonaga et al., 2011). Er zijn echter nog verschillende andere methoden voor het invriezen beschreven. Zambelli et al. (2002) verdunden bijvoorbeeld het sperma op kamertemperatuur (20°C) en koelden het daarna pas af naar 5°C met een snelheid van 0,2°C/s. Doordat de glycerol toegevoegd werd op kamertemperatuur kon het beter penetreren in de spermatozoa gedurende het afkoelen.

Het ontdooien na cryopreservatie gebeurt meestal door het rietje in een waterbad te brengen van 37°C gedurende 30 seconden waarna de inhoud in een Eppendorfbuisje wordt gebracht. Vervolgens wordt 300 µl voorverwarmde TALP-oplossing toegevoegd om glycerol en verdunner te kunnen verwijderen met behulp van centrifugatie (300 x g gedurende 8 minuten). Hierna wordt opnieuw 50 µl TALP toegevoegd en wordt de motiliteit en de voorwaartse progressieve motiliteit opnieuw beoordeeld. Van deze oplossing kan 5 µl gebruikt worden voor de verschillende kleuringen (Zambelli et al., 2008). Een hoog percentage sperma verliest motiliteit en andere functies na het ontdooien door schade aangebracht door het invriesproces. Hierdoor is de motiliteit na het ontdooien minder dan 50% bij de meeste zoogdieren (Watson, 2000).

7. Kunstmatige inseminatie

7.1 Intravaginale inseminatie

Voor intravaginale inseminatie is algemene anesthesie of sedatie noodzakelijk. Er zijn vele verschillende anesthesieprotocollen voor het uitvoeren van KI. Een voorbeeld is het gebruik van atropinesulfaat (0,05 mg/kg) en acepromazine maleraat (0,025 mg/kg) als premedicatie, ketamine (5 mg/kg) als inductie en halothaan als onderhoud voor de anesthesie (Tanaka et al., 2000). Een andere mogelijkheid is een combinatie van xylazine HCl (3 mg/kg IM) en ketamine HCl (10 mg/kg IM) (Chatdarong et al., 2007).

Ook zijn er verschillende inseminatiekatheters bruikbaar om het sperma intravaginaal te injecteren bij de kat. Een eerste optie is het gebruik van een 9 cm lange 20 Gauge (G) naald met een afgerond uiteinde die bevestigd is aan een 0,25 ml spuit (Sojka et al., 1970). Als alternatief kan men met een 9 cm lange sonde, uit roestvrij staal met een diameter van 2 mm, het voorste deel van het smalle en niet uittrekbare deel van de vaginale regio dilateren. Vervolgens gebruikt men een 9 cm lange nylon sonde met een diameter van 1,5 mm die bevestigd is aan een 1,0 ml spuit om het sperma 3 tot 4 cm in de vagina te injecteren (Tanaka et al., 2000b). Hierna wordt het lumbale gedeelte van de katin omhoog gehouden gedurende 15 minuten om te voorkomen dat het sperma terug naar buiten vloeit (Tanaka et al., 2000b).

Bij intravaginale inseminatie hebben de spermatozoa een extra anatomische barrière om te overwinnen, namelijk de cervix. De cervix is verantwoordelijk voor het tegenhouden van een groot aantal spermacellen (Chatdrong et al., 2004) en voornamelijk ook voor het voorkomen dat morfologisch abnormale spermatozoa kunnen doordringen naar de plaats van bevruchting (Villaverde et al., 2009). In een studie door Tanaka et al. (2000b) werd 6,6 % van de kattinnen drachtig bij gebruik van vers sperma met 20×10^6 spermatozoa, 33,3 % bij 40×10^6 en 77,8% bij 80×10^6 . Er is dus een groot aantal spermatozoa noodzakelijk voor een aanvaardbaar drachtpercentage bij intravaginale inseminatie.

7.2 Intra-uteriene inseminatie

Chatdarong et al. (2007) onderzochten het verschil bij vaginale inseminatie tussen vers en ingevroren sperma. Uit de resultaten bleek dat de resultaten met vers sperma beter waren dan met diepvriessperma. Intravaginale inseminatie met 20×10^6 ingevroren spermacellen met een motiliteit van 70% na het ontdooien resulteerde bij geen enkele van de twaalf bestudeerde kattinnen in dracht. Transcervicale intra-uteriene inseminatie met ingevroren sperma zorgde voor een drachtpercentage van 42%. Intra-uteriene inseminatie is dus belangrijk wanneer men gebruik maakt van ingevroren sperma. Er zijn twee mogelijke methoden voor intra-uteriene inseminatie: via laparoscopie of transcervicale inseminatie.

7.2.1 Laparoscopische inseminatie

Ook bij laparoscopische inseminatie zijn er verschillende anesthesieprotocollen mogelijk. Howard et al. (1992) gebruikten een combinatie van ketamine HCl (20 mg/kg IM) en acepromazine (0,18 mg/kg IM) waarbij halothaan gebruikt werd als onderhoud. Nadat het dier geanestheesd is, worden de laparoscopen (Fig. 11a) en een bijkomende hulptang ingebracht in het abdomen van de katin (Fig. 11b). De uterushoorn wordt opgelicht naar de wand van het ventrale abdomen. Vervolgens wordt een katheter percutaan in het proximale derde van het uteruslumen gebracht (Fig. 11c). Nadat het lumen is aangeprikt, wordt de naald een paar millimeter teruggetrokken en het voorste deel van de katheter verder in de uterus gebracht. Hierna wordt de naald helemaal teruggetrokken en vervangen door een steriele polyethyleen sonde die verbonden is met een naald van 30G en een spuit van 1 ml die 100 μ l sperma bevat (Fig. 11d). Deze sonde wordt in het uteriene lumen gebracht waarna het sperma geïnsemineerd kan worden. Bij de contralaterale hoorn wordt dezelfde procedure herhaald (Howard et al., 1992).

Een andere methode is deze van Tsutsui et al. (2000). Deze onderzoekers gebruikten een gelijkaardig anesthesieprotocol maar insemineerden zowel vers (Tsutsui et al., 2000a) als ingevroren (Tsutsui et al., 2000b) sperma enkel ter hoogte van de uterushoorn met het grootste aantal ovariële follikels of ovulaties. Ze gebruikten een 18G naald en plaatsten deze percutaan ter hoogte van de centrale regio van de uterushoorn en het sperma werd ter hoogte van de top van de uterus afgezet (Tanaka et al., 2000). Ook hier waren er goede drachtigheidspercentages. Bij vers sperma met 8×10^6 spermatozoa was 80,0% van de kattinnen drachtig, bij 4×10^6 was het percentage slechts 31,3% (Tsutsui, 2000a). In vergelijking met de 80×10^6 spermatozoa die nodig zijn voor intravaginale inseminatie zijn er dus veel minder spermatozoa noodzakelijk voor het tot stand komen van dracht. Bij het ingevroren sperma lagen de drachtigheidspercentages echter lager en waren er ook meer spermatozoa noodzakelijk. Spermastalen met $12,5 \times 10^6$ levende spermatozoa zorgden voor een drachtigheidspercentage van 57,1% (Tsutsui, 2000b). Laparoscopische inseminatie is relatief gemakkelijk maar wordt gezien als invasief en onethisch en is daardoor verboden in verschillende landen.

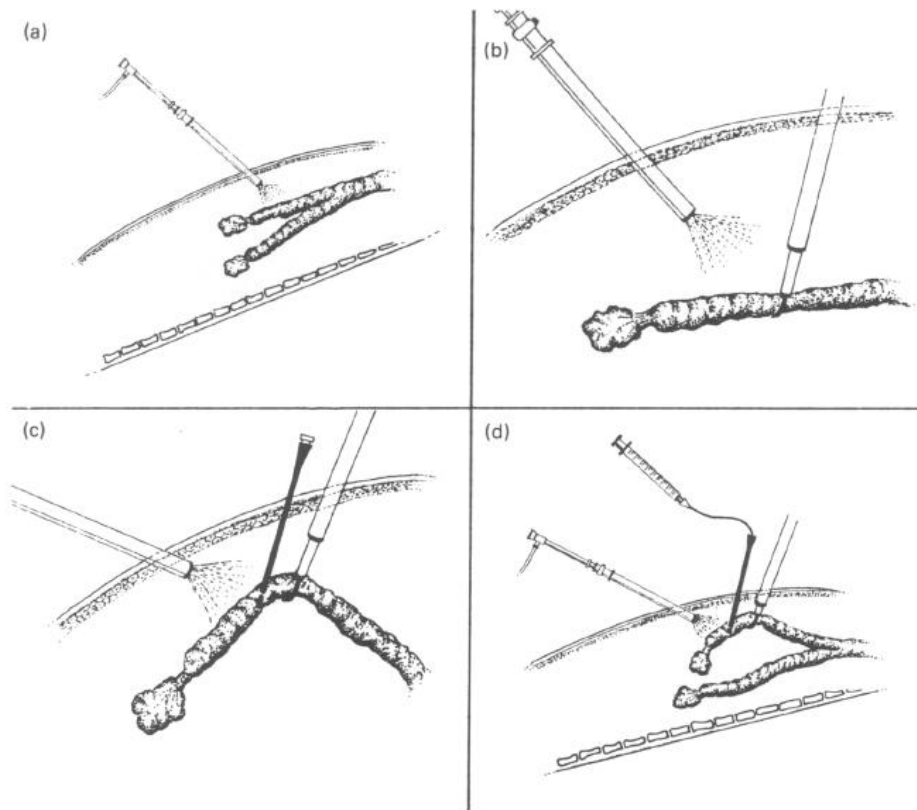
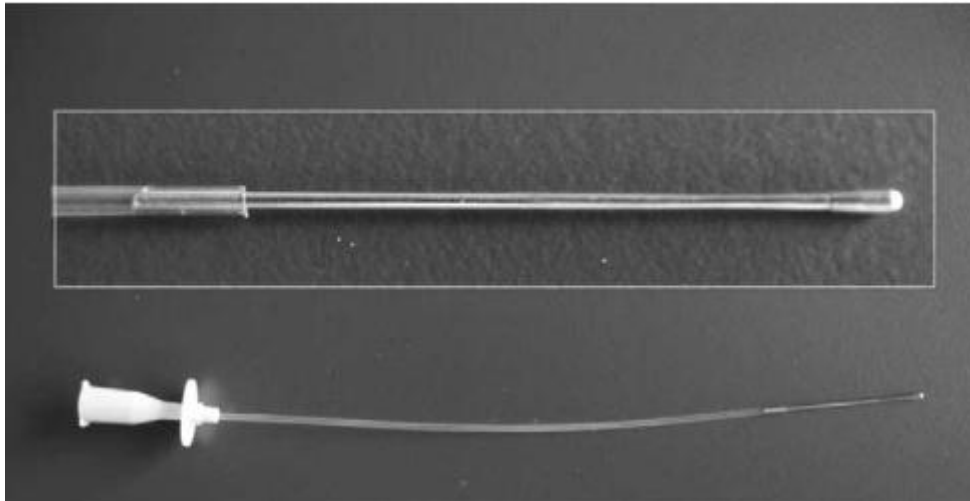


Fig. 11: Laparoscopische inseminatie bij de kat. (a) De laparoscoop wordt gebruikt voor het opsporen van de uterushoornen en de ovaria. (b) Een hulptang wordt gebruikt om de uteriene hoorn te manipuleren. (c) De uterushoorn wordt opgelicht naar ventaal en een katheter wordt percutaan in het lumen ingebracht. (d) De naald wordt uit de katheter teruggetrokken en een sonde gevuld met spermatozoa wordt via de katheter in het uteriene lumen gebracht (*uit Howard et al., 1992*).

7.2.2 Transcervicale katheterisatie

In de literatuur zijn er verschillende technieken beschreven voor transcervicale katheterisatie bij katten. Moeilijkheden bij de katheterisatie zijn geassocieerd met een dorsomediale plooï die de katheter verhindert om de cervix binnen te gaan. Zambelli et al. (2005) beschreven echter de meest succesvolle techniek met vers of ingevroren sperma. Zij gebruikten een 3 French (F) katheter met een naald van 0,65 mm diameter en 30 mm lengte met een afgeronde tip (Fig. 12).



**Fig. 12: Katheter die gebruikt wordt bij de techniek beschreven door Zambelli et al. (2005).
Bovenaan wordt een close-up van de tip van de katheter afgebeeld.**

De katheter wordt ingebracht door het vestibulum tot in de craniale vagina tot dat deze niet meer verder geschoven kan worden. De tip van de katheter, die zich dan in de vaginale fornix bevindt, en de cervix zijn te palperen met behulp van de wijsvinger in het rectum. De katheter wordt dan een paar millimeter teruggetrokken om de cervicale opening te kunnen bereiken. Met behulp van de vinger in het rectum wordt de katheter in de cervix gebracht en verder verschoven naar het uteruslumen (Fig. 13). Door middel van echografie wordt bevestigd of de katheter daadwerkelijk in de uterus zit. Het sperma wordt vervolgens 2 cm craniaal van de cervix ingebracht (Zambelli et al., 2005). De voordelen van deze techniek zijn dat er geen chirurgie vereist is, het goedkoper is en sneller uit te voeren is dan laparoscopische inseminatie. Er is veel ervaring nodig voor het correct en snel uitvoeren van deze techniek.

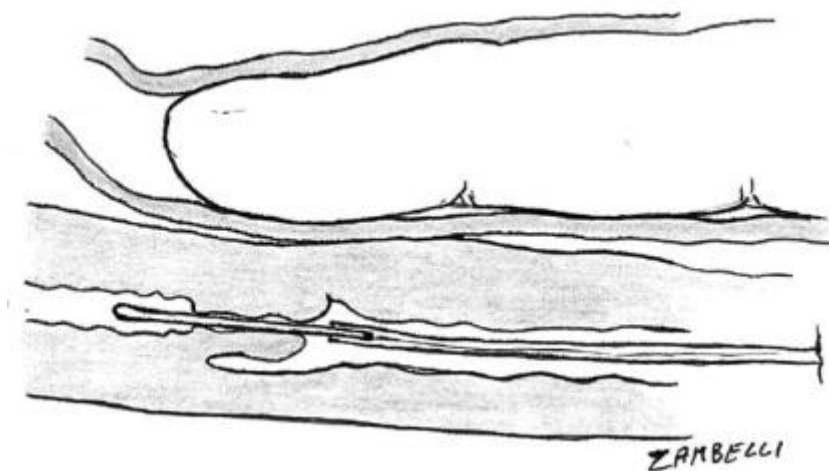


Fig. 13: Techniek voor transcervicale inseminatie voorgesteld door Zambelli et al. (2005). De katheter wordt met behulp van transrectale digitale manipulatie in de cervixopening gebracht en naar craniaal in het uteruslumen geduwd.

CASUS

1. Signalement

Deze casus handelt over een kattin genaamd Oneida Aiyana en een kater die werden aangeboden in de kliniek voortplanting en verloskunde van de gezelschapsdieren (vakgroep voortplanting, verloskunde en bedrijfsdiergeneeskunde) van de faculteit diergeneeskunde (Universiteit Gent) te Merelbeke. Beide katten zijn Ragdolls. Op het moment van aanbieden op 12 maart 2015 was de kattin 2 jaar en de kater 1,5 jaar. Het gewicht van de kattin was 3,8 kg en van de kater 4,8 kg.

2. Anamnese

Tijdens vorige krolsheden vertoonde de kattin alle tekenen van krolsheid maar was toch steeds agressief tegenover de kater wanneer deze wilde dekken. Er waren reeds verschillende dek pogingen ondernomen in december 2014 en januari en februari 2015, echter zonder succes. Tussen de twee krolsheden waren er telkens ongeveer drie weken. De kattin was, volgens de eigenaars, op de dag van de consultatie op dag twee van de krolsheid.

De kater had reeds een nestje voortgebracht van zes kittens en er waren nog twee andere katinnen drachtig na dekking met deze kater. Hij was nooit ziek geweest en had ook geen medicatie gekregen gedurende de afgelopen periode. Zijn sperma was echter nog nooit onderzocht. Vijf dagen voor de consultatie had hij nog driemaal gedekt en daarna niet meer.

3. Plan

3.1 Sperma-afname

Voor de sperma-afname werd gekozen voor urethrale katheterisatie. De kater werd gesedeerd met 0,48 ml (100 µg/kg) Domitor® en 0,48 ml (5 mg/kg) ketamine. Het sperma werd hierna verzameld met behulp van een urinaire katheter. Na afname was de katheter ongeveer 1,5 cm gevuld met sperma. Daarna werd het spermastaal in een voorverwarmd Eppendorfbuisje gebracht en verdund met 100 µl verdunner bestaande uit eigeel, TRIS, fructose en citraat.

3.2 Sperma-evaluatie

Aangezien er slechts een kleine hoeveelheid sperma verzameld kon worden en ervoor gekozen werd om zoveel mogelijk sperma te insemineren, werd er enkel een kleine druppel van het sperma onderzocht onder een lichtmicroscop. De enige parameter die werd beoordeeld was de motiliteit, die ongeveer 70% was. Dit is echter zeer subjectief vermits het met de microscoop werd beoordeeld en niet met behulp van CASA.

3.3 Inductie van de ovulatie

In afwezigheid van stimuli door de dekking, moet bij KI ovulatie geïnduceerd worden. Daarom werd bij deze kattin de ovulatie geïnduceerd met 150 IU hCG (Chorulon®). Aangezien de eigenaars ver van de faculteit wonen, werd de kattin op dezelfde dag van de ovulatie-inductie geïnsemineerd.

3.4 Kunstmatige inseminatie

Er werd gekozen voor intravaginale inseminatie. Doordat de kater aanwezig was, was het mogelijk om vers sperma te gebruiken. Hierdoor kon men intravaginaal insemineren met een aanvaardbare kans op bevruchting. De kattin werd gesedeerd met 0,38 ml Domitor® waarna het sperma intravaginaal ingebracht werd met een urinaire katheter die 4 cm ingekort werd. De achterhand werd vervolgens 10 minuten omhoog gehouden om terugvloeien van het sperma te voorkomen. Er werd 0,19 ml Antisedan® toegediend om de kattin te laten ontwaken.

4. Opvolging

De eigenaars lieten een drachtigheidsonderzoek d.m.v. echografie uitvoeren bij hun eigen dierenarts maar de kattin bleek niet drachtig te zijn.

BESPREKING

De kattin uit bovenstaande casus bleek niet drachtig te zijn geworden na intravaginale KI met sperma van een kater van 1,5 jaar oud. Er zijn verschillende mogelijkheden om dit te verklaren. De KI bij deze kattin werd op de tweede dag van de oestrus uitgevoerd. Volgens de studie door Chatdarong et al. (2002) was dit inderdaad het optimale tijdstip omdat bij de gemiddelde kat de cervix open is, de serumconcentratie van oestradiol-17 β een piek bereikt en de kattin dekking toelaat. In deze studie werd echter ook aangetoond dat de cervix bij bepaalde kattinnen enkel tijdens de late oestrus doorgankelijk was. Het is mogelijk dat dit ook het geval was bij de kattin uit de casus waardoor de spermacellen geen doorgang hadden tot de uterus. Om dit te vermijden had men eventueel twee dagen later opnieuw een tweede inseminatie kunnen uitvoeren om zo de kans op passage door de cervix te vergroten. Ook had er eventueel een vaginale cytologie kunnen gebeuren om de graad van verhoorning te beoordelen, die samen hangt met een verhoogde serumconcentraties oestradiol-17 β . Wanneer de oestradiol-17 β concentraties hoog zijn, is er immers ook een grotere kans dat de cervix doorgankelijk is.

Er is een grote variatie in de vrouwelijke cyclus bij de kattin en spontane ovulaties kunnen het moeilijk maken om het optimale tijdstip voor ovulatie-inductie te bepalen. Men kan echografie gebruiken om de folliculaire groei op te volgen maar dit was bij de kattin onmogelijk vermits ze maar één dag aanwezig was op de faculteit. Het optimale protocol en het tijdstip voor ovulatie-inductie is nog niet volledig opgehelderd. Ook is het geschikte tijdstip voor KI in relatie met de ovulatie nog niet opgeklaard. Uit de studie van Chatdarong et al. (2007) bleek dat de drachtigheidspercentages bij vaginale inseminatie met vers sperma op de dag van hCG inspuiting niet significant verschilden met inseminatie 28 uur na hCG injectie. De resultaten bij inseminatie na 28 uur waren wel iets beter. De kattin uit deze casus zou dus een even grote kans op drachtigheid moeten gehad hebben. Verschillende studies beschrijven echter andere tijdstippen voor KI met soms tegenstrijdige resultaten. Dit kan verklaard worden door de mogelijkheid dat pre-ovulatoire anesthetica een negatief effect hebben op de ovulatie (Howard et al., 1992, Chatdarong et al., 2007).

Het is belangrijk om de reproductie bij de kat verder te blijven bestuderen en meer efficiënte technieken te ontwikkelen voor cyclusopvolging, sperma-afname, sperma-evaluatie, spermabewaring, ovulatie-inductie en inseminatie bij de kat. De kat wordt vaak gebruikt als model voor de bedreigde wilde katachtigen en onderzoek naar de reproductie ervan is van groot belang voor het behoud van bedreigde soorten.

REFERENTIES

- Axnér E. (2008). Updates on reproductive physiology, genital diseases and artificial insemination in the domestic cat. *Reproduction in Domestic Animals* 43, 144-149.
- Axnér E., Holst B. S., Linde-Forsberg C. (1998). Morphology of spermatozoa in the cauda epididymidis before and after electroejaculation and a comparison with ejaculated spermatozoa in the domestic cat. *Theriogenology* 50, 973-979.
- Axnér E., Forsberg L. (2002). Semen collection and assessment, and artificial insemination in the cat. In: Concannon et al. (Editors). *Recent Advances in Small Animal Reproduction*. International Veterinary Information Service (www.ivis.org), Ithaca, New York, p.1-9.
- Beaver B. V. (2003). *Feline behaviour: a guide for veterinarians*. 2nd edition. Saunders, St. Louis, Missouri, p.165-171.
- Bristol-Gould S., Woodruff T. K. (2006). Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology* 66, 5-13.
- Chatdarong K., Kampa N., Axnér E., Linde-Forsberg C. (2002). Investigation of cervical patency and uterine appearance in domestic cats by fluoroscopy and scintigraphy. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 275-281.
- Chatdarong K., Lohachit C., Linde-Forsberg C. (2004). Distribution of spermatozoa in the female reproductive tract of the domestic cat in relation to ovulation induced by natural mating. *Theriogenology* 62, 1027-1041.
- Chatdarong K., Ponglowhapan S., Manee-in S., Pongphet K. (2006). The use of propofol for electroejaculation in domestic cats. *Theriogenology*, 66, 1615-1617.
- Chatdarong K., Axnér E., Manee-In S., Thuwanut P., Linde-Forsberg C. (2007). Pregnancy in the domestic cat after vaginal or transcervical insemination with fresh and frozen semen. *Theriogenology* 68, 1326-1333.
- Chatdarong K., Thuwanut P., Suksamai P., Patanatiradaj S., Sangwornrachasup A. (2009). Survival of frozen-thawed cat spermatozoa pre-cooled in the epididymides. *Reproduction of Domestic Animals* 44, 377-380.
- Concannon P., Hodgson B., Lein D. (1980). Reflex LH release in estrous cats following single and multiple copulations. *Biology of Reproduction*, 23, 111-117.
- Cowell R.L., Valanciano A.C. (2013). *Cowell and Tyler's diagnostic cytology and hematology of the dog and the cat*. 4th edition. Elsevier Health Sciences, St. Louis, Mosby, p. 446-448.
- Filliers M., Rijsselaere T., Bossaert P., De Causmaecker V., Dewulf J., Pope C.E., Van Soom A. (2008). Computer-assisted sperm analysis of fresh epididymal cat spermatozoa and the impact of cool storage (4°C) on sperm quality. *Theriogenology* 70, 1550-1559.

- Hermansson U., Axner E. (2007). Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4°C. *Theriogenology* 67, 1239-1248.
- Howard J.G., Brown J.L., Bush M., Wildt D.E. (1990). Teratospermic and normospermic domestic cats: ejaculate traits, pituitary-gonadal hormones, and improvement of spermatozoa motility and morphology after swim up processing. *Journal of Andrology* 11, 204-215.
- Howard J. G., Barone M. A., Donoghue A. M., & Wildt D. E. (1992). The effect of pre-ovulatory anaesthesia on ovulation in laparoscopically inseminated domestic cats. *Journal of Reproduction and Fertility* 96, 175-186.
- Howard J. G., Donoghue A. M., Johnston L. A., Wildt D. E. (1993). Zona pellucida filtration of structurally abnormal spermatozoa and reduced fertilization in teratospermic cats. *Biology of reproduction* 49, 131-139.
- Mills J. N., Valli V. E., Lumsden J. H. (1979). Cyclical changes of vaginal cytology in the cat. *The Canadian Veterinary Journal* 20, 95-101.
- Niwa K., Ōhara K., Hosoi Y., Iritani A. (1985). Early events of in-vitro fertilization of cat eggs by epididymal spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility* 74, 657-660.
- Pineda M. H., Dooley, M. P. (1984). Effects of voltage and order of voltage application on seminal characteristics of electroejaculates of the domestic cat. *American Journal of Veterinary Research* 45, 1520-1525.
- Pope C. E., Zhang Y. Z., Dresser B. L. (1991). A simple staining method for evaluating acrosomal status of cat spermatozoa. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 22, 87-95.
- Rijsselaere T., Van Soom A. (2010). Semen collection, assessment and artificial insemination in the cat. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 79, 467-470.
- Say L., Pontier D., Natoli E. (2001). Influence of oestrus synchronization on male reproductive success in the domestic cat (*Felis catus* L.). *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 268, 1049-1053.
- Shille V. M., Lundström K. E., Stabenfeldt G. H. (1979). Follicular function in the domestic cat as determined by estradiol-17 β concentrations in plasma: relation to estrous behavior and cornification of exfoliated vaginal epithelium. *Biology of Reproduction*, 21, 953-963.
- Sojka N. J., Jennings L. L., Hamner C. E. (1970). Artificial insemination in the cat (*Felis catus* L.). *Laboratory Animal Care* 20, 198-204.
- Tanaka A., Kuwabara S., Takagi Y., Nakagawa K., Fujimoto Y., Murai M., Tsutsui T. (2000a). Effect of ejaculation intervals on semen quality in cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 1157-1161.
- Tanaka A., Takagi Y., Nakagawa K., Fujimoto Y., Hori T., Tsutsui T. (2000b). Artificial intravaginal insemination using fresh semen in cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 1163-1167.

Toyonaga M., Sato Y., Sasaki A., Kaihara A., Tsutsui T. (2011). Artificial insemination with cryopreserved sperm from feline epididymides stored at 4° C. *Theriogenology* 76, 532-537.

Tsutsui T., Tanaka A., Takagi Y., Nakagawa K., Fujimoto Y., Murai M., Anzai M. and Hori T. (2000a). Unilateral intrauterine horn insemination of fresh semen in cats. *Journal of Veterinary Medicine Science* 62, 1241–1245.

Tsutsui T., Tanaka A., Takagi Y., Nakagawa K., Fujimoto Y., Murai M., Hori T. (2000b). Unilateral intrauterine horn insemination of frozen semen in cats. *Journal of Veterinary Medical Science* 62, 1247-1251.

Turner T., Turner J. (1994). *Veterinary notes for cat owners*. 1st edition. Random House, London, p. 62.

Van Soom A., Rijsselaere T. (2013-2014). Aanvullingen in de voortplanting en verloskunde van de gezelschapsdieren. *Cursus Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent*, p 226-229.

Villaverde A. I. S. B., Melo C. M., Martin I., Ferreira T. H., Papa F. O., Taconeli C. A., Lopes M. D. (2009). Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen–thawed semen in domestic cat (*Felis catus*): Artificial insemination in domestic cats. *Animal Reproduction Science* 114, 434-442.

Watson P. F. (2000). The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. *Animal reproduction science* 60, 481-492.

Zambelli D., Caneppele B., Castagnetti C., Belluzzi S. (2002). Cryopreservation of cat semen in straws: comparison of five different freezing rates. *Reproduction in Domestic Animals* 37, 310-313.

Zambelli D., Cunto M. (2006). Semen collection in cats: techniques and analysis. *Theriogenology* 66, 159-165.

Zambelli D., Cunto M., Prati F., Merlo, B. (2007). Effects of ketamine or medetomidine administration on quality of electroejaculated sperm and on sperm flow in the domestic cat. *Theriogenology* 68, 796-803.

Zambelli D., Prati F., Cunto M., Iacono E., Merlo, B. (2008). Quality and in vitro fertilizing ability of cryopreserved cat spermatozoa obtained by urethral catheterization after medetomidine administration. *Theriogenology* 69, 485-490.

Zambelli D., Raccagni R., Cunto M., Andreani G., Isani G. (2010). Sperm evaluation and biochemical characterization of cat seminal plasma collected by electroejaculation and urethral catheterization. *Theriogenology* 74, 1396-1402.