

# **IMMUNITEITSOPBOUW BIJ HONDEN** **TEGEN *GIARDIA DUODENALIS*** **INFECTIE**

Aantal woorden: 8101

Vera Odekerken

Studentennummer: 01403886

Promotor: Prof. dr. Peter Geldhof

Promotor: Prof. dr. Edwin Claerebout

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2020 – 2021

*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.*

## Voorwoord

Allereerst wil ik graag mijn begeleidend promotor professor Geldhof bedanken om mij zo goed te begeleiden in het uitvoeren van dit onderzoek en het schrijven van deze masterproef. Daarnaast ook bedankt aan alle andere werknemers van de afdeling Parasitologie aan de universiteit Gent voor de hulp bij het onderzoeken van de feces- en bloedstalen, met een speciale dank aan Bregt Decorte, Laurens Zwanenburg en Nathalie De Wilde. Bedankt aan de dierverzorgsters voor hun hulp bij de staalname van de feces en de bloedafname bij de honden. Tot slot bedankt aan mijn familie, vrienden en partner voor hun steun gedurende het laatste jaar van mijn studie, inclusief de hulp tijdens het schrijven van deze masterproef.

# Inhoudsopgave

<b>1</b>	<b>Samenvatting</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>Inleiding</b> .....	<b>6</b>
2.1	<i>Achtergrond</i> .....	6
2.2	<i>Levenscyclus</i> .....	8
2.3	<i>Symptomen</i> .....	8
2.4	<i>Diagnose</i> .....	8
2.5	<i>Behandeling</i> .....	8
2.6	<i>Prognose</i> .....	9
2.7	<i>Prevalentie</i> .....	9
2.8	<i>Andere diersoorten</i> .....	9
<b>3</b>	<b>Probleemstelling en doelstelling</b> .....	<b>10</b>
<b>4</b>	<b>Materiaal en methoden</b> .....	<b>11</b>
4.1	<i>Proefhonden</i> .....	11
4.2	<i>Fecesonderzoek – IFT</i> .....	11
4.3	<i>Bloedonderzoek</i> .....	13
<b>5</b>	<b>Resultaten</b> .....	<b>19</b>
5.1	<i>Resultaten fecesonderzoek</i> .....	19
5.2	<i>Resultaten bloedonderzoek</i> .....	21
<b>6</b>	<b>Discussie</b> .....	<b>25</b>
<b>7</b>	<b>Conclusie</b> .....	<b>28</b>
<b>8</b>	<b>Referentielijst</b> .....	<b>29</b>
<b>9</b>	<b>Bijlagen</b> .....	<b>31</b>
9.1	<i>Bijlage 1</i> .....	31
9.2	<i>Bijlage 2</i> .....	32
9.3	<i>Bijlage 3</i> .....	34
9.4	<i>Bijlage 4</i> .....	35

# 1 Samenvatting

*Giardia duodenalis* is een parasiet voorkomend bij honden en andere zoogdieren welke subklinisch aanwezig kan zijn in de dunne darm, maar in sommige gevallen wel symptomen kan geven zoals braken en diarree. De parasiet kan in de feces gedetecteerd worden met verschillende methodes, waaronder de directe immunofluorescentietest en de SNAP-test. De parasiet kan bestreden worden door te behandelen met de anti-parasitaire middelen fenbendazole of metronidazole.

In de literatuur staat beschreven dat er een vermoeden bestaat dat sommige honden gevoelig blijven voor een herinfectie met *G. duodenalis* en zo *Giardia* cysten blijven uitscheiden via de feces, terwijl andere honden een beschermende immuniteit opbouwen na een infectie. Er wordt met name beweerd dat honden jonger dan één jaar gevoeliger zijn voor het ontwikkelen van symptomen dan volwassen honden. In deze studie werd een cohorte van honden gedurende een aantal maanden via fecesonderzoek opgevolgd om zo verduidelijking te krijgen in het infectieverloop bij een natuurlijke infectie met *G. duodenalis*. Daarnaast werd een bloedonderzoek uitgevoerd om dit infectieverloop te kunnen linken aan een specifieke IL-17A respons, aangezien bij andere dieren, zoals onder andere muizen, reeds bewezen is dat een deficiëntie in IL-17A een verstoring geeft in de immuniteitsopbouw tegenover *Giardia spp.*

Een opvallende uitkomst in dit onderzoek is dat twee verschillende groepen honden een ander patroon vertonen wat betreft cystenuitscheiding in de feces. Buiten dat de twee groepen op een andere locatie gehuisvest zijn, verschillen de groepen ook qua leeftijdssamenstelling. Zo lijkt het dat de groep met enkel jongvolwassen honden (2 jaar) zich vaker herbesmetten dan de groep met honden met een overwegend oudere leeftijd (2 jaar t/m 8 jaar). Echter vertoont geen enkele hond symptomen, waardoor er in deze groepen van honden gesproken kan worden van een subklinische infectie.

De bloedresultaten van de verschillende groepen honden in deze proef hebben geen significante verschillen aangetoond wat betreft proliferatie van lymfocyten en wat betreft een IL-17A respons na *in vitro* blootstelling aan *G. duodenalis* eiwitextract en levende *G. duodenalis* trofozoïeten. Het verschil in langdurigheid van cystenuitscheiding bij de twee verschillende groepen is dus nog niet verklaard.

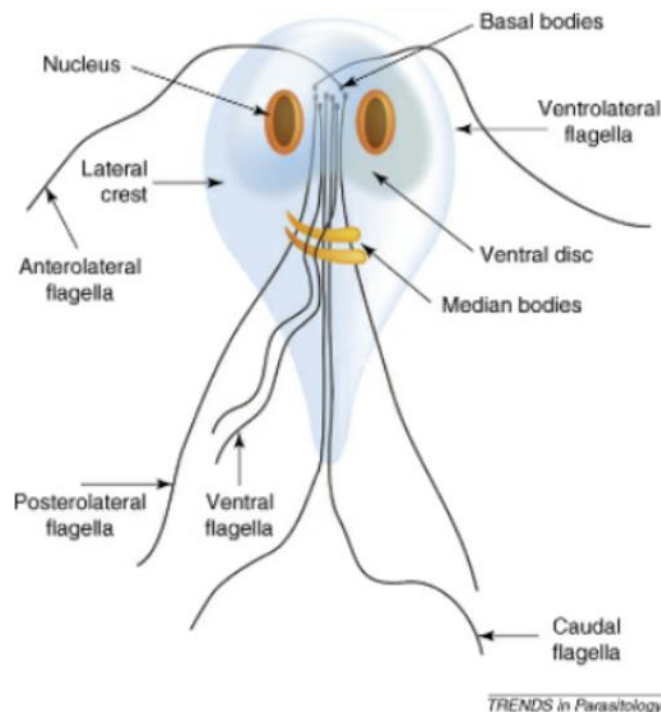
## 2 Inleiding

### 2.1 Achtergrond

*Giardia duodenalis* (syn. *Giardia lamblia* en *Giardia intestinalis*) is een vaak voorkomende protozoaire darmparasiet. Deze parasiet is wereldwijd verspreid en komt zowel voor bij de mens als bij andere zoogdieren, zoals ook gezelschapsdieren en nutsdieren (Feng en Xiao, 2011; Grit et al., 2013; Ryan en Cacciò, 2013; Kooyman et al., 2019). *G. duodenalis* wordt verder onderverdeeld in verschillende assemblages (A t/m H), welke genetisch van elkaar verschillen. Assemblage A, B, C en D komen voor bij de hond, waarbij assemblage A en B zoönotisch potentieel hebben en assemblage C en D gastheerspecifiek zijn voor de hond (Monis et al., 2009; Ballweber et al., 2010; Ryan en Cacciò, 2013; Kooyman et al., 2019; Mravcová et al., 2019; Perrucci et al., 2019).

*G. duodenalis* behoort tot de orde van de Diplomonadida (Monis et al., 2009). *G. duodenalis* kan twee morfologische/metabolische vormen aannemen gedurende de levenscyclus, namelijk de vorm van trofozoïet en de vorm van een omgevingsresistente cyste. De parasiet vormt zich om tot trofozoïet in de dunne darm van de gastheer wanneer zich de replicatie fase voordoet. Dit is de fase waarin de trofozoïet zich vermenigvuldigt door middel van asexuele binaire deling. De morfologische vorm als cyste wordt aangenomen in de infectieuze fase (Monis et al., 2009; Ryan en Cacciò, 2013; Cacciò et al., 2017). Tijdens deze fase wordt de infectieuze cyste uitgescheiden via de feces, waardoor ze in de buitenwereld terecht komt. De filamenteuze cystewand zorgt ervoor dat de cyste resistent is tegenover slechte omgevingsfactoren, wat de verspreiding van deze parasiet vergemakkelijkt (Midlej en Benchimol, 2009).

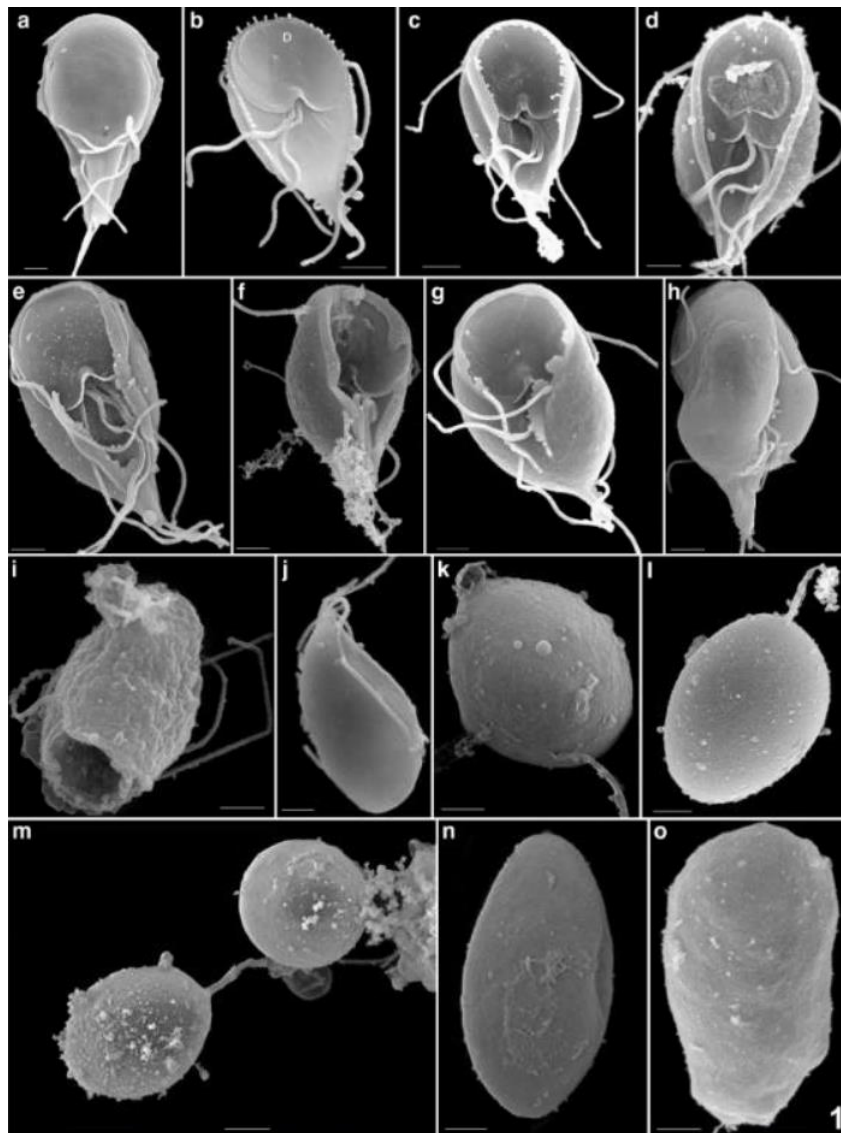
Als de parasiet zich in de trofozoïet fase bevindt, kan deze herkend worden aan haar symmetrische morfologie (Figuur 1; Monis et al., 2009). De trofozoïet is peervormig en is 12-15 µm lang en 5-9 µm breed (Adam, 2001). De parasiet heeft bilaterale, diploïde nucleï en een typische ventrale zuignap, wat zorgt voor vasthechting aan de dunne darm mucosa van de gastheer. Daarnaast heeft deze parasiet 4 paar flagellen met verschillende locaties en zo ook verschillende functies. De parasiet bezit echter géén mitochondriën of peroxisomen (Nohýnkóva et al., 2006; Monis et al., 2009).



Figuur 1 - *Giardia duodenalis* trofozoïet (Monis et al., 2009)

Wanneer de parasiet zich manifesteert in haar morfologische vorm als cyste, is deze te herkennen aan een afgerond uiterlijk met een staartachtig aanhangsel of als ovale structuur. De cyste is daarnaast te herkennen aan de immobiliteit tegenover de mobiliteit tijdens de fase van de trofozoïet (Midlej en Benchimol, 2009).

Een studie in 2009 van Midlej en Benchimol heeft reeds opgehelderd hoe de morfologie van de parasiet verandert gedurende de levenscyclus. Met scanning elektronenmicroscopie was te zien dat de *G. duodenalis* trofozoïet geleidelijke veranderingen ondergaat van de dorso-ventrale afgeplatte peer (figuur 2 a-b) naar een morfologie waarbij de parasiet een meer eivormig tot bolvorming uiterlijk krijgt (figuur 2 c-o). Gedurende de omvorming van trofozoïet naar cyste wordt er door de geleidelijke toename van het membraan het afronden van de cel bewerkstelligd. Er wordt daarnaast een concave verlaging gevormd in het ventrale gebied. De flagellen van de trofozoïet worden geleidelijk geïnternaliseerd. In figuur 2 hieronder is er een onrijpe cyste met staart te zien op afbeelding k, l en m. Op afbeelding n en o is er een rijpe cyste te zien (Midlej en Benchimol, 2009).



Figuur 2 - Scanning elektronenmicroscopie tijdens encytering van *Giardia duodenalis* gedurende de levenscyclus (Midlej en Benchimol, 2009)

## 2.2 Levenscyclus

De levenscyclus van *G. duodenalis* kent hetzelfde verloop bij de verschillende gastheren. Aangezien deze masterproef specifiek toegespitst is op het infectieverloop bij de hond, wordt hierbij de hond als gastheer besproken. De levenscyclus van *G. duodenalis* verloopt als volgt: de hond infecteert zichzelf direct via een fecaal-orale route of indirect door opname van voedsel of water besmet met *Giardia* cysten (Monis et al., 2009). Aangezien honden vaak aan coprofagie doen, is ingestie van de cysten in de feces een belangrijke transmissieroute bij honden. Dit zorgt ervoor dat *G. duodenalis* één van de meest gerapporteerde gastrointestinale parasieten is bij honden (Uiterwijk et al., 2019). Door de lage pH en de digestieve enzymen in de maag en het proximale duodenum van de hond zal de cyste excyteren waarbij 2 trofozoïeten worden vrijgesteld. De trofozoïeten zullen zich in de dunne darm vermenigvuldigen door middel van binaire deling. Met de ventrale zuignap zullen de trofozoïeten zich hechten aan het epitheel van de enterocyten in het proximale duodenum. Na loslating en onder invloed van de galzouten zullen de trofozoïeten zich opnieuw encyteren tot cysten. Via transit door het colon en rectum komen de infectieuze cysten in de feces van de hond terecht. Op deze manier kan door direct of indirect contact met feces een andere hond geïnfecteerd raken (Adam, 2011; Ballweber et al., 2010; Ryan en Cacciò, 2013; Mravcová et al., 2019).

## 2.3 Symptomen

Een infectie met *G. duodenalis* kan bij de hond asymptomatisch verlopen, maar kan in sommige gevallen ook aanleiding geven tot acute of chronische diarree, dehydratie, abdominale pijn, nausea, steatorree, braken en gewichtsverlies (Ryan en Cacciò, 2013). Deze symptomen ontstaan ongeveer twee weken na infectie met de infectieuze cysten. Soms wordt er een malabsorptie syndroom gezien, waarbij de microvilli dikker en korter geworden zijn ter hoogte van het duodenum (Fink et al., 2017; Mravcová et al., 2019). Fink et al. (2017) beschrijft dat jongere honden vaker symptomen vertonen dan honden ouder dan 1 jaar.

## 2.4 Diagnose

*G. duodenalis* kan met verschillende diagnostische tests vastgesteld worden. Vier veelgebruikte diagnostische methoden voor giardiasis zijn de directe immunofluorescentie test (Merifluor *Cryptosporidium/Giardia*®), de rapid enzyme immunochemigrafische test (IDEXX SNAP *Giardia*®), de kwantitatieve PCR (SSU rDNA) en de coproanalyse met CSF (centrifugatie, sedimentatie en flotatie). Uiterwijk et al. vergeleek in 2018 deze vier methoden en stelde vast dat alle vier de testen een hoge specificiteit gaven. Zo gaf de IDEXX SNAP *Giardia*® in hun onderzoek in 2018 de hoogste specificiteit met 99,6% en de kwantitatieve PCR de laagste specificiteit met een percentage van 85,6. De sensitiviteit van de verschillende methoden bleek variabeler. Zo gaf de kwantitatieve PCR de hoogste sensitiviteit van 97,0% en de CSF de laagste sensitiviteit met de waarde van 48,2%. De directe immunofluorescentie test was sensitiever dan de IDEXX SNAP *Giardia*®, maar iets minder specifiek.

## 2.5 Behandeling

Het vetcompendium raadt aan om *G. duodenalis* bij de hond te behandelen met fenbendazole of met metronidazole. Fenbendazole is in België onder andere verkrijgbaar onder de merknaam Panacur® met verschillende concentraties. Daarnaast is Panacur® verkrijgbaar in tabletvorm, maar ook in de vorm van een pasta. De posologie voor een behandeling bij honden met Panacur® is 50 milligram fenbendazole per kilogram lichaamsgewicht per dag, gedurende drie opeenvolgende dagen. Daarnaast is in België metronidazole verkrijgbaar onder verschillende merknamen. Voorbeelden hiervan zijn Metrocare®, Metrovis®, Eradia® en Metrobactin®. De posologie voor een behandeling tegen *G. duodenalis* bij honden met metronidazole is 50 milligram per kilogram lichaamsgewicht per dag voor vijf tot zeven opeenvolgende dagen. Een vezelrijk dieet kan helpen om klinische symptomen veroorzaakt door dysbacteriose in het maag-darmstelsel te verminderen. In sommige gevallen bleek het te helpen om de



hond op de laatste dag van de behandeling te wassen, om herinfectie te voorkomen door bevuilding van de vacht. Daarnaast wordt aangeraden om bij chronische recidiverende gevallen zonder therapie succes verder te onderzoeken op onderliggende ziekten (Tangtrongsup en Scorza, 2010).

## 2.6 Prognose

De prognose van een infectie met *G. duodenalis* is zowel bij gezonde als klinische zieke honden met giardiasis gunstig. De meeste infecties bij honden blijven namelijk subklinisch en de honden die wel giardiasis ontwikkelen zijn over het algemeen goed behandelbaar (Tangtrongsup en Scorza, 2010).

## 2.7 Prevalentie

Prevalentie studies van *G. duodenalis* in omstreken tonen aan dat in Noord-België 9.3% van de geteste huishonden en 43.9% van de geteste kennelhonden geïnfecteerd waren (Claerebout et al., 2009). In een andere prevalentie studie in Nederland bleek het aandeel geïnfecteerde huishonden 11.6% te zijn, maar het aandeel infecties lag nog hoger bij klinisch zieke honden, namelijk 23.4% (Uiterwijk et al., 2019). Daarnaast stelde Uiterwijk et al. (2019) dat de geteste honden met een leeftijd van meer dan 1 jaar minder kans maakten om positief te testen voor *G. duodenalis* dan jongere honden, maar dat er toch honden van oudere leeftijd geïnfecteerd waren. Hierbij kan men zich de vraag stellen of deze oudere honden pas op latere leeftijd geïnfecteerd zijn geraakt, of dat deze honden al geïnfecteerd waren op jongere leeftijd en chronisch cysten zijn blijven uitscheiden. Zo opperde Mravcová et al. (2019) dat een infectie latent aanwezig kan blijven voor een aantal maanden of zelfs jaren, waardoor giardiasis in sommige patiënten chronisch aanwezig kan blijven. Er zijn echter weinig studies die dit aantonen en daarnaast geven prevalentiestudies ons statische cijfers in plaats van dynamische cijfers.

## 2.8 Andere diersoorten

Studies uitgevoerd bij andere diersoorten hebben uitgewezen dat de beschermende immuunrespons tegen *Giardia spp.* gelinkt is aan een IL-17A respons. Dit werd duidelijk aangetoond bij runderen (Grit et al., 2013) en daarna ook bij muizen (Paerewijck et al., 2017). Grit et al. (2013) beschreef bijvoorbeeld dat er een IL-17A respons gedetecteerd kon worden in het bloed op het moment van maximale piekhoogte van cystenuitscheiding van *G. duodenalis* in de feces. Bovendien zag Paerewijck et al. (2019) dat er een leeftijdsafhankelijk effect was wat betreft de patent periode van een *G. muris* infectie bij muizen. Dit verschil was te zien tussen een groep neonatale/zogende muizen en een groep gespeende muizen, die beide geïnfecteerd werden met *G. muris*. De neonatale muizen bleken hierbij langer cysten uit te scheiden dan de gespeende muizen, die wel een IL-17A respons ontwikkelden 3-4 weken na de infectie. Uit deze studie bleek dat dergelijke IL-17A respons niet aanwezig was bij de zogende muizen, wat zou kunnen verklaren waarom de infectie langer aansleept bij deze neonatale muizen in vergelijking met de oudere, gespeende muizen. Of de ontwikkeling van immuniteit bij honden tegen *G. duodenalis* ook gepaard gaat met een IL-17A respons is momenteel nog onduidelijk.

### 3 Probleemstelling en doelstelling

Zoals eerder aangehaald zijn er weinig studies die daadwerkelijk aantonen dat honden latent besmet kunnen blijven met *G. duodenalis* en zo langdurig infectieuze cysten kunnen blijven uitscheiden. Daarom is de doelstelling van deze masterproef het opvolgen van het infectieverloop van een *G. duodenalis* infectie bij een cohorte van natuurlijk geïnfecteerde honden gedurende een aantal maanden.

Hierbij wordt er hopelijk allereerst een antwoord gegeven op de vraag wat de werkelijke proportie van honden is die langdurig *Giardia*-positief blijven. Aangezien de afgelopen prevalentiestudies ons alleen een momentopname geven van het aantal geïnfecteerde honden, maar niet van de duur van deze infecties, worden in deze masterproef de honden gedurende een aantal maanden opgevolgd door middel van fecesonderzoek.

In een latere fase van deze masterproef is het doel om de cellulaire immuunreactie van de geteste honden te onderzoeken en te vergelijken. Hierbij wordt de focus gelegd op een IL-17A respons. Zo is het doel om te weten te komen of een IL-17A respons ook een belangrijke bijdrage heeft in de beschermende immuunrespons tegen *G. duodenalis* bij honden, zoals eerder geobserveerd bij runderen en muizen.

## 4 Materiaal en methoden

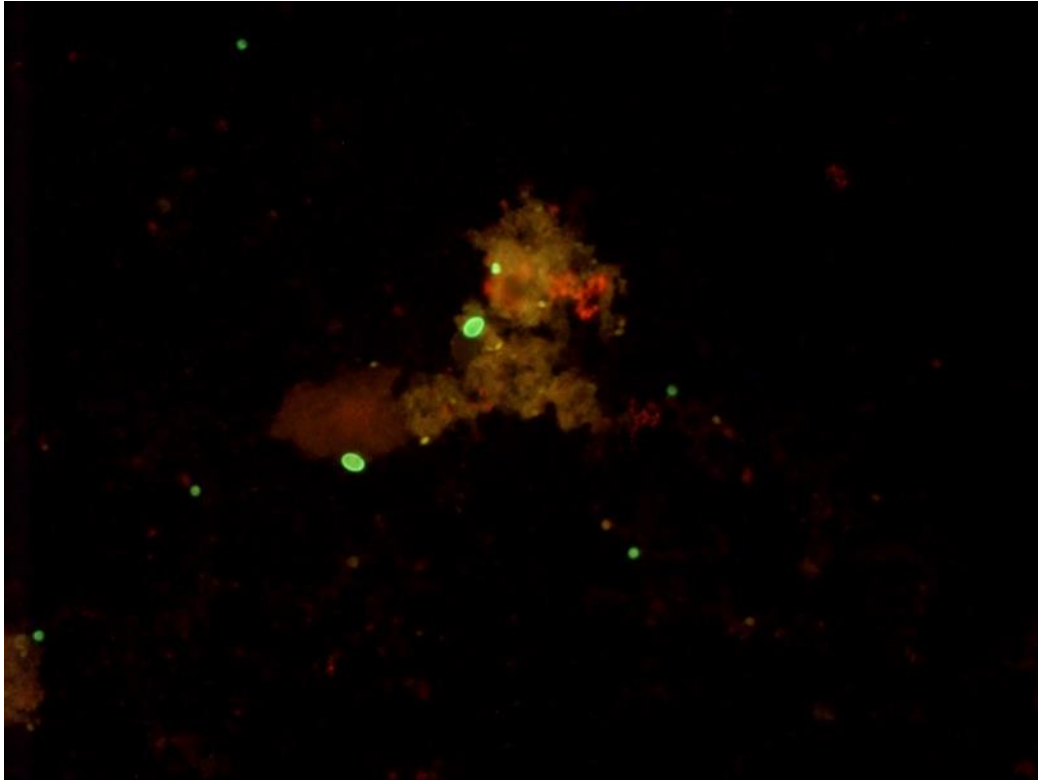
### 4.1 Proefhonden

Voor deze masterproef werden 59 proefhonden van de faculteit Diergeneeskunde aan de UGent onderzocht. Deze proefhonden zijn afkomstig van twee verschillende groepen. 45 proefhonden waren gehuisvest bij de Kliniek Kleine Huisdieren, deze zullen verder als Groep 1 omschreven worden. Groep 2 bevat 14 proefhonden, gehuisvest bij het laboratorium voor Diervoeding. Bij de Kliniek Kleine Huisdieren (Groep 1) werden de dieren verder onderverdeeld in tien groepen, waar deze dieren per groep gezamenlijk in een kennel zaten. Bij de het laboratorium voor Diervoeding (Groep 2) mochten de dieren gezamenlijk naar buiten, maar konden ze, waar nodig, ook individueel gehuisvest worden. De geteste honden hadden allemaal een leeftijd tussen de twee en negen jaar.

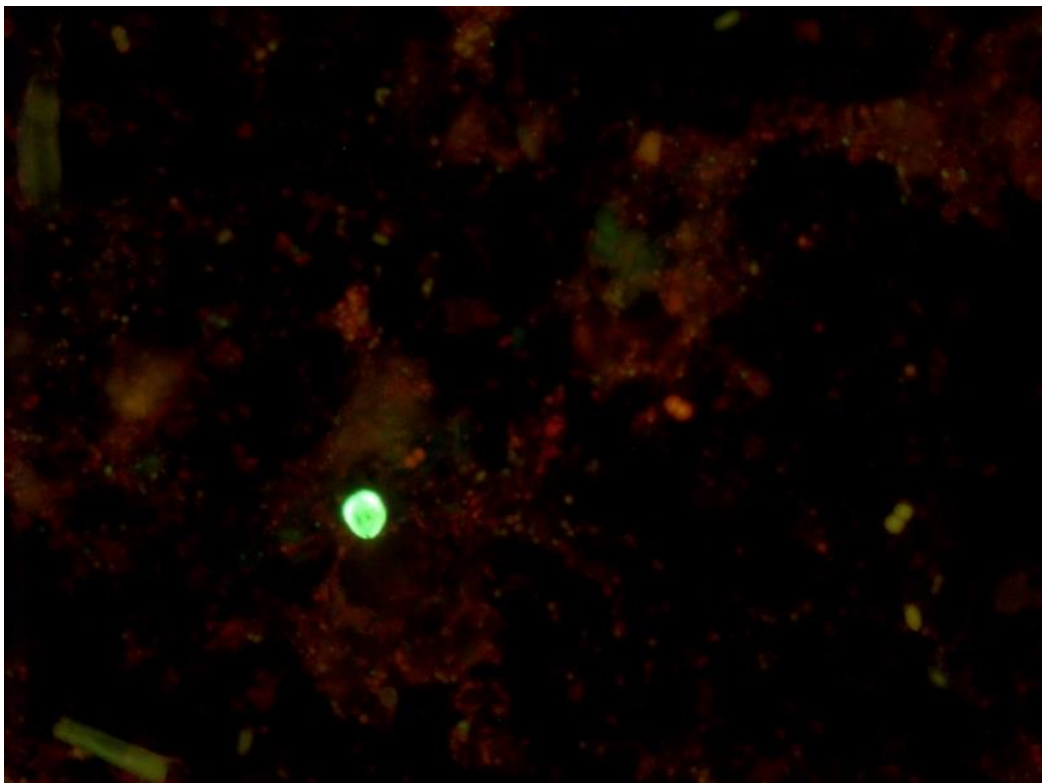
### 4.2 Fecesonderzoek – IFT

Bij aanvang van dit onderzoek zijn de honden in totaal achttien weken opgevolgd door middel van fecesonderzoek. Tussen de eerste twee feces-staalnamen van de honden bij Groep 2 zaten vier weken tijd, daarna zijn de stalen elke twee weken genomen. Bij Groep 1 is deze staalname om de twee weken pas gerealiseerd na de derde maandelijkse staalname. De feces werd onderzocht met behulp van een immunofluorescentietest (IFT) van Merifluor®. De feces zijn ofwel in mengstalen genomen en naderhand individueel per hond onderzocht wanneer het mengstaal positief getest werd, ofwel gelijk per individuele hond getest.

Voor de IFT test werd van elk (meng)staal 1 gram feces genomen, dit werd dan met water in suspensie gebracht, om daarna drie keer gezeefd te worden door chirurgisch gaas. Dit zeven dient om de grootste hoeveelheid debris uit de suspensie te filteren. Het filtraat bleef dan een uur staan om te kunnen sedimenteren. Dit filtraat werd afgegoten en het overgebleven sediment en supernatant werd in een 15 ml tube gecentrifugeerd gedurende 5 minuten op 3000 RPM. Hierna werd het supernatant afgegoten en werd het sediment aangevuld tot 1 ml met water. Van dit sediment werd opnieuw een suspensie gemaakt met behulp van vortexing. Van deze suspensie werd door middel van een handmatige pipet 20 µL op het welletje gebracht van een Merifluor® *Giardia* draagglasje, net als de positieve en negatieve controle. Deze IFT-welletjes werden eerst gedroogd en daarna bedruppeld met Merifluor® Detection Regent en Merifluor® Counterstain. De draagglasjes werden dan in een donkere, bevochtigde kamer bewaard voor 30 minuten. De welletjes werden gespoeld door middel van een speciale wasbuffer en daarna gedroogd door tapping van de draagglasjes op papieren tissues. Hierna werd er een druppel Merifluor® Mounting Medium toegevoegd en een dekglasje op de verschillende draagglasjes geplaatst. De welletjes konden hierna afgelezen worden met de immunofluorescentiemicroscop op een vergroting van 400x. Allereerst werd er gekeken naar oplichtende/groenfluorescerende cysten en mits deze gevonden werden, werden ze geteld en achteraf vermenigvuldigd met een factor 50 om de verdunning in rekening te kunnen brengen.



*Figuur 3 - Positieve controle IFT MeriFluor® Cryptosporidium/Giardia, vergroting 200x*



*Figuur 4 - IFT positief fecesstaal voor Giardia duodenalis, vergroting 400x*

### 4.3 Bloedonderzoek

Het doel van het bloedonderzoek was om de anti-*Giardia* immuunrespons te testen, waarbij de focus gelegd werd op een IL-17A respons. PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) werden daarvoor uit het bloed opgezuiverd om vervolgens *in vitro* blootgesteld te worden aan *G. duodenalis* materiaal om te achterhalen of er parasiet-specifieke immuuncellen aanwezig waren in het bloed van de honden. Daarnaast was het de bedoeling om te achterhalen of deze PBMCs na re-stimulatie IL-17A produceren. De werkwijze in dit onderzoek wordt hieronder beschreven. Voor aanvang van deze proef werd een ethische commissie aanvraag ingediend en goedgekeurd (EC 2020-085).

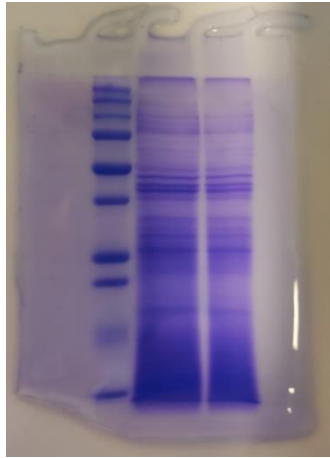
#### **BLOEDAFNAME**

Na statistische berekening van het aantal honden dat noodzakelijk zal zijn om een significant verschil aan te tonen (gebaseerd op gelijkaardig onderzoek bij runderen) werd bepaald dat er van 5 honden uit elke groep een bloedstaal genomen moest worden om een verschil in proliferatie van de PBMCs aan te tonen. Er werd per hond 10 mL bloed afgenomen uit de vena jugularis en kort bewaard in een heparine buisje voor verdere analyse.

#### **G. DUODENALIS TROFOZOÏETEN EXTRACT**

Om PMBCs van de honden te kunnen testen op hun immuunreactie tegen *G. duodenalis* werd besloten een eiwitextract uit *Giardia* trofozoïeten te verzamelen en te gebruiken om de cellen *in vitro* te re-stimuleren. Er werd vertrokken vanuit 6 buisjes met een reeds bestaande *G. duodenalis* assemblage B cultuur in GS/m-medium dat 2 dagen (log-fase) geïncubeerd werd op 37 °C. Omdat bekend is dat de trofozoïeten zich met hun ventrale disc hechten aan het oppervlak van het gebruikte buisje, werd het medium met de trofozoïeten allereerst gekoeld op ijs voor 30 minuten waardoor de trofozoïeten loslaten van het oppervlak. Dit werd gevolgd door een centrifugatie stap aan 500 g gedurende 10 minuten (4 °C). De gesedimenteerde trofozoïeten uit ieder buisje werden geresuspendeerd in 2 mL fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS). Deze oplossing werd overgebracht naar een nieuwe buis. De gepoolde trofozoïeten werden driemaal gewassen in steriele, koude PBS (pH 7,4). Om de trofozoïeten een pellet te laten vormen, werd gecentrifugeerd aan 2500 RPM gedurende 5 minuten (4 °C). De pellet van trofozoïeten werd dan opnieuw geresuspendeerd in 1 mL PBS en hierna tweemaal snel ingevroren in vloeibare stikstof en terug ontdooid. Vervolgens werden de trofozoïeten gesoniceerd voor een minuut op een amplitude van 2%. Hierna werd nogmaals gecentrifugeerd aan 13000 RPM voor 15 minuten (4 °C). Het sediment met celdebris en membranen werd verwijderd en het bovenstaande supernatant met de wateroplosbare proteïnen werd bewaard. Vervolgens werd de concentratie aan proteïnen bepaald door middel van een Pierce BCA protein assay, volgens protocol van de leverancier. De concentratie aan trofozoïet proteïnen was 1100 µg/mL.

Om te controleren of de extractie van de eiwitten afkomstig van de trofozoïeten gelukt was en om een kwalitatieve controle van het extract uit te voeren, werd er een SDS-page uitgevoerd. Er werd gebruik gemaakt van een Commassie briljant Blue kleuring volgens het protocol van de leverancier.



*Figuur 5 - SDS-page Commassie Brilliant Blue kleuring van Giardia extract*

### **PMBC ISOLATIE UIT HONDENBLOED**

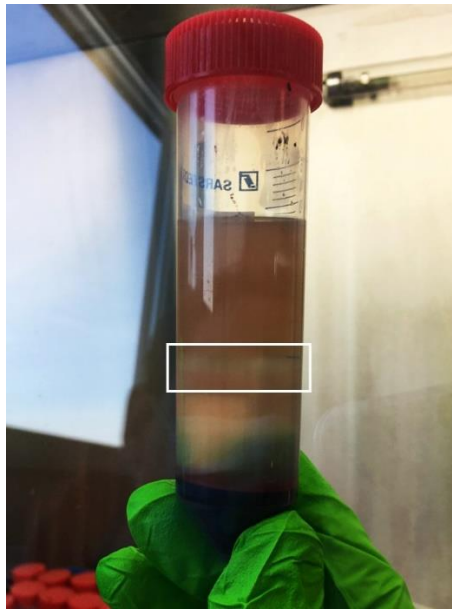
Om in de laatste stap van dit onderzoek de re-stimulatie van de immuuncellen te kunnen uitvoeren, is het nodig om een isolatie van de PBMCs uit het hondenbloed te realiseren. Bij de meeste diersoorten is dit mogelijk door enkel gebruik te maken van een Ficoll densiteit medium, maar aangezien de granulocyten en lymfocyten een soortgelijke densiteit hebben bij honden en de granulocyten de proliferatie van de lymfocyten tegengaan, is er een extra stap nodig in dit onderzoek om de lymfocyten te isoleren.

Eerst werd er een 10% carbonyl ijzer en een 10% arabische gom oplossing gemaakt in PBS, gesupplementeerd met 1% penicilline/streptomycine. Gelijke volumes van deze oplossingen werden gemengd en deze carbonyl ijzer/arabische gom oplossing werd bewaard aan -20 °C tot gebruik. Deze stap was noodzakelijk om de granulocyten te verzwaren, waardoor er een verschil in densiteit ontstaat tussen de granulocyten en de lymfocyten. In een volgende stap konden de lymfocyten zo geïsoleerd worden op basis van hun densiteit. Deze suspensie (2 mL) werd toegevoegd aan 10 mL van het verzamelde hondenbloed en werd geïncubeerd gedurende 60 minuten in een 5% CO<sub>2</sub> atmosfeer. Het bloed werd elke 10 minuten zachtjes gewenteld.

Hierna werd er 10 mL Dulbecco's PBS (DPBS) toegevoegd aan het bloed. Dit gesupplementeerde bloed werd langzaam gedruppeld bovenop 15 mL Ficoll densiteit medium. Het Ficoll densiteit medium werd eerder aangemaakt door 7.1g FicollPM400 en 9g natriumdiatrizaat in 100 mL gedestilleerd water op te lossen. Het geheel werd gecentrifugeerd aan 600 g voor 30 minuten (kamertemperatuur).

De interfase, waarin de lymfocyten verblijven, werd gecollecteerd in een 50 mL buisje en opgelost in cultuur medium, om vervolgens gecentrifugeerd te worden aan 800 g voor 5 minuten (kamertemperatuur). Het supernatant werd verwijderd en de cellen werden geresuspendeerd in 2 mL van RBC lysis-buffer. Deze buffer is nodig om de eventuele overgebleven rode bloedcellen te laten lyseren en zo te verwijderen. Deze oplossing werd voorzichtig gezwenkt. Na 5 minuten werd er 7 mL FACS buffer toegevoegd. Deze oplossing werd over een 40 µm cell strainer gegoten, om bacteriën en aan elkaar gehechte cellen te elimineren. De overgebleven oplossing werd opnieuw gecentrifugeerd aan 800 g voor 5 minuten (4 °C), het supernatant werd verwijderd en de cellen werden geresuspendeerd

in FACS buffer. 10  $\mu\text{L}$  van deze oplossing met cellen werd gekleurd met 90  $\mu\text{L}$  Turk's oplossing en de cellen werden geteld met behulp van een hemocytometer.



Figuur 6 – Interfase met lymfocyten

## RE-STIMULATIE ASSAY

Om de proliferatie van de PBMCs te bepalen is het nodig de immuuncellen te labelen. In dit onderzoek is dat gerealiseerd door het protocol van de leverancier voor de PKH26 labelling te volgen. Hiervoor zijn er per hond 4 miljoen immuuncellen gebruikt, waarvan éénmaal 1 miljoen cellen voor het initiële intensiteit signaal (PKH26) en driemaal 2 keer 500.000 cellen per conditie (positieve controle, negatieve controle en *Giardia* extract). Deze cellen werden voor 5 minuten gecentrifugeerd (800 g, 4 °C) om een pellet te laten vormen. Daarna werd het supernatant geaspireerd met een pipet en werd het protocol van de leverancier gevolgd om de cellen te labelen.

Na de kleuring met PKH26 werd 180  $\mu\text{L}$  van de oplossing met de cellen (waarin  $5 \times 10^5$  cellen zitten) en 20  $\mu\text{L}$  van het stimulant in elk te testen welletje gebracht. Het stimulant voor de condities is het volgende:

- Negatieve controle: enkel medium
- Positieve controle: medium met een mutageen ConA (1  $\mu\text{g}$ /welletje) in RPMI medium
- *G. duodenalis* extract (GDE 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) + medium

Het medium dat hierbij gebruikt werd, is samengesteld uit RPMI 1640 (Life technologies, Gibco®) met 10% hi-FCS (Life technologies), 1% Penicilline/Streptomycine (Sigma-Aldrich) 1% L-glutamine (Life technologies, Gibco®), 1% niet essentiële aminozuren (Life technologies, Gibco®), 1% sodium pyruvaat (Life technologies, Gibco®), 0.5% gentamycine (Life technologies, Gibco®) en 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol (Life technologies, Gibco®).

Tabel 1 - Restimulatie assay Groep 1

Wells		1	2	3	4	5	6	
<b>Hond 1</b>		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	
<b>Hond 2</b>		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	
<b>Hond 3</b>		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	
<b>Hond 4</b>		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	
<b>Hond 5</b>		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	

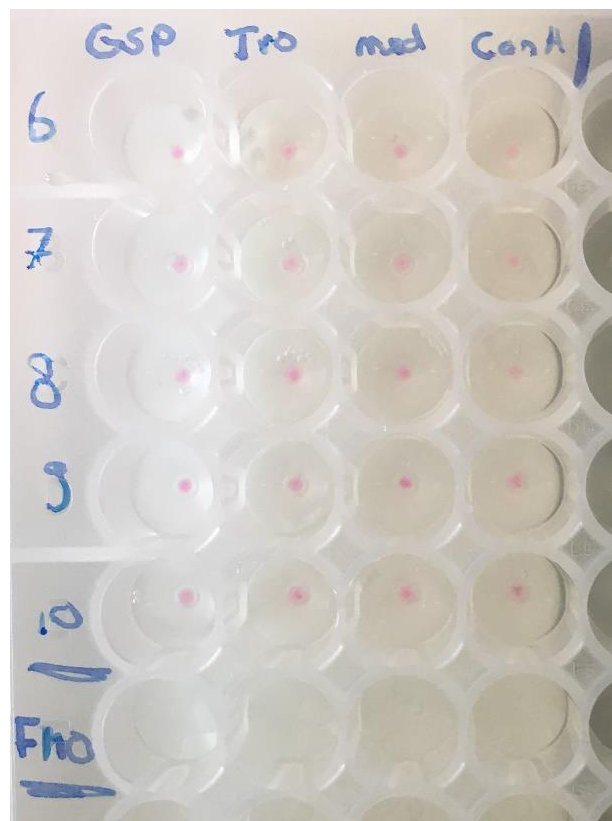
De lege wellletjes werden gevuld met cultuur medium om verdamping gedurende de 5 dagen incubatie op 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> te voorkomen. Om dezelfde reden zijn er per conditie twee wellletjes gevuld met 5 x 10<sup>5</sup> cellen en medium in plaats van per conditie één welletje met 1 x 10<sup>6</sup> cellen met medium.

Op dag 0 werd per hond het initiële fluorescentie-intensiteitssignaal van de 1 miljoen immuuncellen gemeten (PKH26) met de Cytoflex® flow cytometer. Er werd eerst een Live/Dead eFluor506 kleuring uitgevoerd om de levende cellen van de dode cellen te kunnen onderscheiden. De dode cellen kunnen op die manier het intensiteitssignaal niet verstoren.

Op dag 5 werd de fluorescentie intensiteit opnieuw per hond bepaald, maar ditmaal van de cellen die wel in cultuur gezet zijn gedurende 5 dagen in de verschillende condities. Hierbij was het doel om te meten wat het verschil zou zijn tussen het fluorescentie-intensiteitssignaal van de 1 miljoen immuuncellen geteld op dag 0 tegenover het intensiteitssignaal dat het aantal immuuncellen op dag 5 zou aangeven. Doordat de cellen op dag 0 nog niet gestimuleerd werden tot proliferatie, verwachtte men een intensiteitssignaal dat aan zijn maximum zou zitten. Het is namelijk zo dat wanneer de met fluorochroom-gekleurde startpopulatie aan immuuncellen prolifereren dat het fluorescentie-intensiteitssignaal zal afnemen door verdunning van de kleuring bij celdeling. Zo verwacht men bij de conditie waarin ConA (mutageen) toegevoegd werd een hoge proliferatiegraad en dus een lager fluorescentie-intensiteitssignaal dan het startsignaal. Een mutageen zorgt er immers voor dat cellen zich meervoudig zullen delen. Bij de conditie die enkel medium bevatte, verwachtte men juist een lage proliferatiegraad en dus een gelijkwaardige fluorescentie intensiteit ten opzichte van het resultaat op dag 0. Het doel bij de derde conditie is om na te gaan of de immuuncellen prolifereren bij blootstelling aan *Giardia* extract. Wanneer de immuuncellen onder deze conditie zich inderdaad prolifereren, zal het fluorescentie-intensiteitssignaal eerder de waarde van de conditie met ConA evenaren. Als de immuuncellen niet prolifereren, zal dit eerder gelijk blijven aan de waarde van de conditie waar enkel medium werd toegevoegd.



De procedure wordt hier nader uitgelegd: vooraleer de kleuringen uit te voeren, werden er eerst een aantal wasstappen uitgevoerd. Zo werden de welletjes gedurende 5 minuten gecentrifugeerd (800 g, 4 °C) en daarna werd per welletje het supernatant verwijderd met behulp van een pipet. Dan werd er geresuspendeerd met 200 µL FACS buffer. Deze suspensie werd opnieuw door een cell strainer (40 µm) gedruppeld, om daarna in een Eppendorf buisje opgevangen te worden. De cell strainer werd nagespoeld met 300 µL FACS buffer en dit filtraat werd ook opgevangen in het Eppendorf buisje. Deze buisjes werden gecentrifugeerd (800 g, 5 minuten, 4 °C) en het supernatant werd wederom verwijderd met behulp van een pipet. Er werd opnieuw een resuspensie gemaakt in 150 µL FACS buffer en de suspensie werd in een '96 well V-bottom microplate' gebracht. Daarna werden de Eppendorf buisjes gespoeld met 100 µL FACS buffer om de restanten vervolgens toe te voegen aan de bijbehorende welletjes. De welletjes werden gedurende 5 minuten gecentrifugeerd (800 g, 4 °C). Hierna werd er voorzichtig geklopt op een papieren tissue om het supernatant te verwijderen. Dan werd er nog een laatste keer 200 µL van FACS buffer toegediend in elk welletje. De welletjes werden opnieuw gecentrifugeerd gedurende 5 minuten (800 g, 4 °C) en ontdaan van supernatant door voorzichtig kloppen op een papieren tissue. Hierbij bleef er wederom een pellet achter (zie figuur 7).



*Figuur 7 – Pelletvorming van de gekleurde immuuncellen na centrifugatie*

Er werd 50 µL FcBlock toegevoegd per welletje. Het geheel werd in suspensie gebracht met een pipet en geïncubeerd gedurende 5 minuten. Daarna werd 50 µL van de antistoffen mix in PBS of FACS buffer toegediend. Deze antistoffen mix bestaat uit muis-anti-hond CD3-FITC9 (1:100) en rat-anti-hond CD4-Pacific Blue (1:100). Deze suspensie werd geïncubeerd gedurende 30 minuten in het donker (4 °C). Daarna werd er gewassen met 200 µL FACS buffer en werd er gecentrifugeerd gedurende 5 minuten (800 g, 4 °C). Er werd 50 µL Live/Dead marker toegediend (eFluor506 in PBS) in elk welletje en geïncubeerd gedurende 20 minuten in het donker (4 °C). Daarna werd er tweemaal een wasstap uitgevoerd met 200 µL FACS buffer en centrifugatie gedurende 5 minuten (800 g, 4 °C). Er werd 100 µL Fixatie/Permeabilisatie oplossing toegevoegd per welletje, geresuspendeerd en geïncubeerd

gedurende 20 minuten (4 °C). De cellen werden tweemaal gewassen in 250 µL BD Perm/Wash buffer en gecentrifugeerd gedurende 5 minuten (800 g, 4 °C). Het geheel werd in suspensie gebracht in 50 µL BD Perm/Wash buffer en een vooraf bepaalde concentratie van fluorochrome-geconjugeerde anticytokine antistof, ofwel Interleukine 17 (1/100). Daarna werd er geïncubeerd gedurende 30 minuten in het donker (4 °C). De cellen werden wederom tweemaal gewassen met 250 µL BD Perm/Wash buffer en gecentrifugeerd gedurende 5 minuten (800 g, 4 °C). Het geheel werd geresuspendeerd in 150 µL FACS buffer.

Er werd een extra rij welletjes gebruikt met 'Fluorescence Minus One Controls' (FMO) die op dezelfde manier gekleurd werd als hierboven beschreven, met uitzondering van de stap waar 'fluorochrome-geconjugeerde anticytokine antistof' (Interleukine 17) werd toegevoegd. Dit is een controle om na te gaan of de test gelukt is. Aangezien de kleuring hetzelfde verlopen is buiten de Interleukine 17 kleuring, kan men de cut off waarde bepalen voor een significante IL-17A respons in de andere condities.

Als laatste stap werd de Cytoflex® flow cytometer gebruikt om de resultaten te bekomen. De resultaten werden geanalyseerd met behulp van ModFit LT software (Verity Software House®) en FlowJo/Cytoflex®.

Een extra kanttekening is dat er na het eerste bloedonderzoek van de eerste groep honden weinig proliferatie te zien was bij de re-stimulatie met het trofozoïeten eiwitextract. Daarom is er voor de zekerheid een extra conditie toegevoegd voor het bloedonderzoek bij de honden van Groep 2. Deze extra conditie bevatte levende *G. duodenalis* trofozoïeten (LGDT), die voor 6 uur levend bleken te zijn na toevoeging aan de PMBCs van de verschillende honden. Hiermee werd geacht de kans te verkleinen dat de proliferatie minimaal bleek te zijn doordat het trofozoïeten extract de immuuncellen niet tot nauwelijks stimuleert. In tabel 2 een illustratie van de opstelling bij het onderzoek op de honden van Groep 2.

Tabel 2 - Restimulatie assay Groep 2

Wells		1	2	3	4	5	6	7	7	
Hond 1		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	10 µg/mL LGDT	10 µg/mL LGDT	
Hond 2		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	10 µg/mL LGDT	10 µg/mL LGDT	
Hond 3		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	10 µg/mL LGDT	10 µg/mL LGDT	
Hond 4		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	10 µg/mL LGDT	10 µg/mL LGDT	
Hond 5		10 µg/mL GDE	10 µg/mL GDE	Negatieve controle	Negatieve controle	Positieve controle	Positieve controle	10 µg/mL LGDT	10 µg/mL LGDT	

## 5 Resultaten

### 5.1 Resultaten fecesonderzoek

#### GROEP 1 – KLINIEK KLEINE HUISDIEREN

Aangezien Groep 1 uit een relatief grote groep honden bestond, zijn er allereerst mengstalen genomen van verschillende subgroepen. Deze subgroepen bestaan uit honden die in één hok bij elkaar gehuisvest zijn. In bijlage 1 zijn de resultaten hiervan beschreven in cysten per gram feces (cpg). Daarna zijn de subgroepen die positief testten voor *G. duodenalis* verder onderzocht door middel van individuele stalen. Deze resultaten zijn beschreven in bijlage 2. Uiteindelijk is subgroep 6A gekozen om verder op te volgen wat betreft de cystenuitscheiding in het aantal cysten per gram feces (zie tabel 3). In deze tabel is het verloop van cystenuitscheiding gedurende de achttien opeenvolgende weken weergegeven door middel van kleurcodes. De kleur groen toont hier een negatief staal aan, geel en rood tonen respectievelijk een milde en een hoge cystenuitscheiding aan.

Zoals in tabel 3 te zien is, testten de meeste dieren positief voor cystenuitscheiding van *G. duodenalis* op meerdere tijdstippen. Enkel op het eerste tijdstip testten de fecesstalen van de meeste dieren negatief voor *G. duodenalis*. Honden 6A1, 6A2 en 6A8 bleken daarentegen op elk getest tijdstip positief te zijn wat betreft cystenuitscheiding, weliswaar in een verschillende mate van het aantal cysten per gram feces gedurende de opvolgperiode. De andere honden bleken pas vanaf het tweede testmoment positief te testen voor *G. duodenalis*. De meeste honden bleven daarna positief, met uitzondering van drie honden die éénmaal negatief testten (honden 6A4, 6A7 en 6A9) en een hond die twee keer negatief testten, namelijk hond 6A3.

Gedurende deze opvolgperiode heeft geen enkele hond van Groep 1 klinische symptomen vertoond.

Tabel 3 – Resultaten fecesonderzoek bij groep 1 (Kliniek Kleine Huisdieren) – subgroep 6A: cysten per gram feces

GROEP 1 (6A)	Week 35	Week 39	Week 43	Week 45	Week 47	Week 49	Week 51
6A1	200	6000	250	500	3350	4400	200
6A2	100	1400	400	1400	1250	300	900
6A3	0	2500	0	0	850	1100	1900
6A4	0	7800	0	800	100	1200	11400
6A5	0	1500	1700	200	50	900	1150
6A6	0	160	200	400	1600	7500	15300
6A7	0	5300	350	100	1800	100	0
6A8	100	2300	3650	250	300	3900	2700
6A9	0	300	0	1050	900	150	200

## GROEP 2 – LABORATORIUM DIERVOEDING

In Groep 2 zijn de honden in een periode van achttien weken opgevolgd door middel van individuele fecesstalen (Zie tabel 4). In deze tabel is het verloop van cystenuitscheiding waar te nemen door middel van dezelfde kleurcodes die eerder gebruikt werden bij Groep 1 in tabel 3.

In tabel 4 komt duidelijk naar voren dat de honden van Groep 2 over het algemeen negatief getest zijn voor *G. duodenalis* gedurende de opeenvolgende testmomenten. Een aantal honden testten gedurende de gehele opvolging negatief voor *G. duodenalis* (honden A, B, D en L). Vier honden waren éénmaal positief (honden C, E, F en G). Honden H, I, J, K, M en N testten tweemaal positief voor *G. duodenalis* cysten in de feces gedurende deze periode.

Ook in Groep 2 heeft geen enkele hond een klinische giardiasis vertoond.

Tabel 4 – Resultaten fecesonderzoek bij de honden van Groep 2 (laboratorium voor Diervoeding): cysten per gram feces

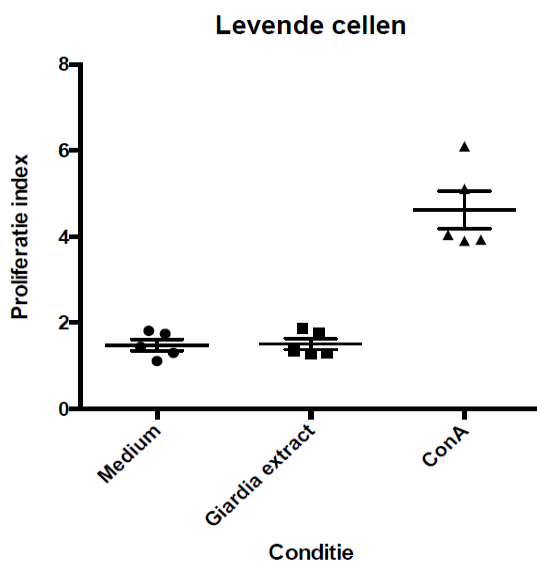
GROEP 2	Week 35	Week 39	Week 41	Week 43	Week 45	Week 47	Week 49	Week 51
A	0	0	0	0	0	0	0	0
B	0	0	0	0	0	0	0	0
C	0	0	0	0	0	0	0	3400
D	0	0	0	0	0	0	0	0
E	0	0	0	0	0	0	0	350
F	0	1000	0	0	0	0	0	0
G	0	800	0	0	0	0	0	0
H	0	0	0	1400	0	0	100	0
I	0	300	0	0	0	0	2200	0
J	0	0	2900	0	0	0	51250	0
K	0	0	4950	0	0	0	6750	0
L	0	0	0	0	0	0	0	0
M	0	0	0	0	0	0	150	800
N	0	0	0	200	0	0	14450	0

## 5.2 Resultaten bloedonderzoek

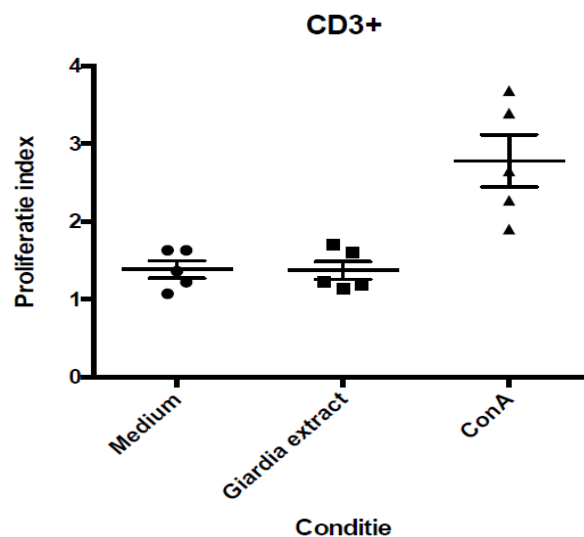
### GROEP 1 – KLINIEK KLEINE HUISDIEREN

Uit subgroep 6A werden vijf honden gekozen om bloedonderzoek bij uit te voeren. De desbetreffende honden zijn hierboven reeds weergegeven als hond 6A1, 6A2, 6A5, 6A7 en 6A8. De honden uit deze groep hebben allen overwegend positief getest wat betreft *G. duodenalis* cystenuitscheiding gedurende de eerder besproken fecesopvolging. Met dit bloedonderzoek werd getracht de immunreactie tegen *G. duodenalis* te onderzoeken bij deze honden. De resultaten van het bloedonderzoek zijn weergegeven in bijlage 3. Deze bijlage bevat de concrete uitslag wat betreft de proliferatie van de immuuncellen afkomstig uit het bloed van de gekozen honden, wanneer deze in verschillende condities gestimuleerd werden, zoals eerder beschreven bij Hoofdstuk 4 Materiaal en methoden. Hierbij is er gebruik gemaakt van het fluorescentie intensiteitssignaal gemeten door de Cytoflex® flow cytometer. Dit fluorescentie intensiteitssignaal is per conditie omgerekend in proliferatie indices.

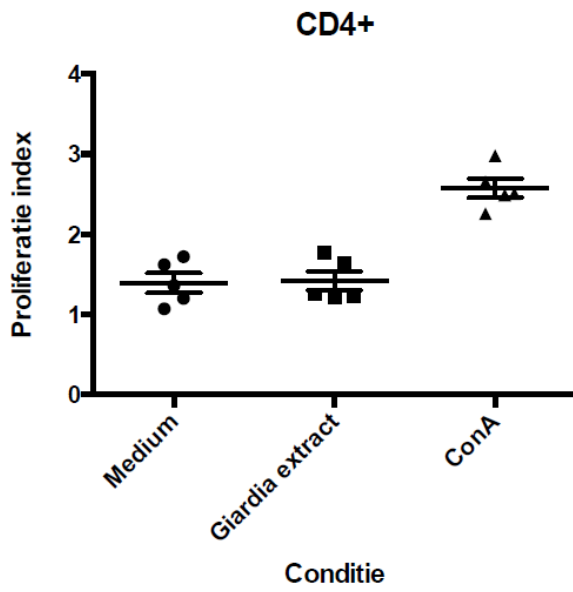
De proliferatie indices van de honden van Groep 1 (subgroep 6A) zijn weergegeven in de grafieken in figuur 8 t/m figuur 12. In deze figuren zijn de proliferaties van de lymfocyten die gelabeld zijn op basis van hun receptorexpressie weergegeven, namelijk CD3+, CD4+, CD3+CD4+ en CD3+CD4+IL-17A+. In elk van deze grafieken is te zien dat de verschillende immuuncellen van alle honden van Groep 1 enkel gestimuleerd werden tot proliferatie na blootstelling aan ConA (positieve controle). De immuuncellen die blootgesteld werden aan het *G. duodenalis* extract vertoonden eenzelfde proliferatie als de conditie waarin de immuuncellen enkel in voedingsmedium geïncubeerd werden. De conditie waarin enkel medium werd toegevoegd diende hierin als een negatieve controle. Uit de grafieken kan worden opgemaakt dat de conditie met *G. duodenalis* extract geen duidelijke *in vitro* proliferatie van de immuuncellen van deze honden heeft veroorzaakt. Bij een *in vitro* proliferatie van de immuuncellen door de blootstelling aan de conditie met *G. duodenalis* extract zou men een proliferatiewaarde verwachten die de proliferatiewaarde van het mutageen ConA benaderd, of in ieder geval duidelijk hoger ligt dan de proliferatiewaarde bij de blootstelling van de immuuncellen aan enkel voedingsmedium (negatieve controle). Bij deze groep honden kan dus niet gesproken worden van een duidelijke *in vitro* immunrespons op basis van het uitblijven van proliferatie van de immuuncellen na blootstelling aan de parasiet.



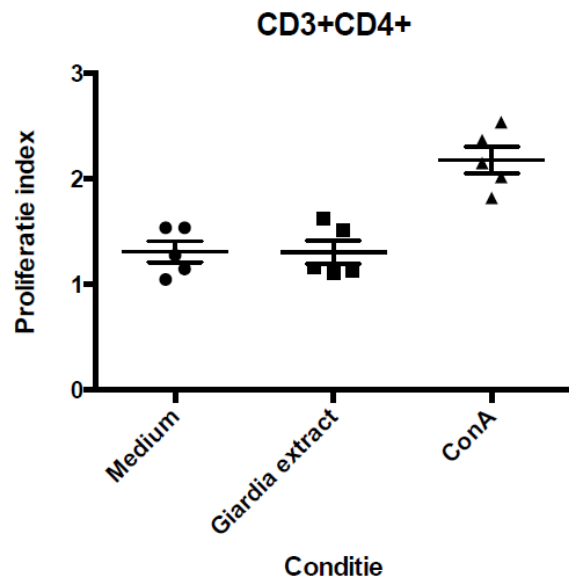
Figuur 8 - Proliferatie index levende cellen Groep 1



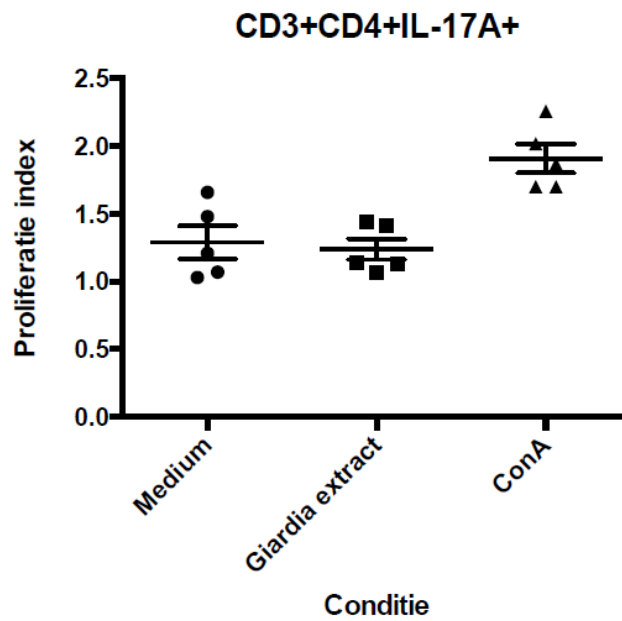
Figuur 9 - Proliferatie index CD3+ Groep 1



Figuur 10 - Proliferatie index CD4+ Groep 1



Figuur 11 - Proliferatie index CD3+CD4+ Groep 1

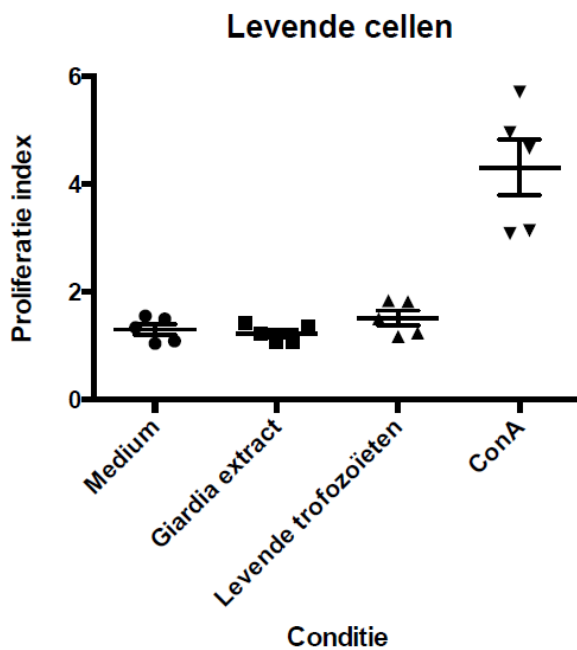


Figuur 12 - Proliferatie index CD3+CD4+IL-17A+ Groep 1

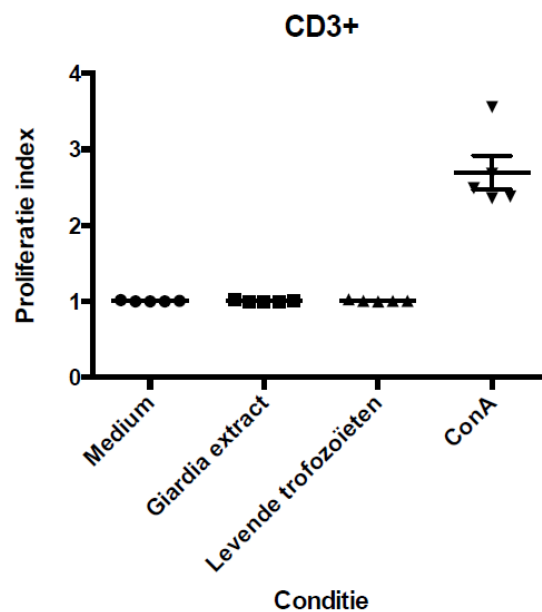
## GROEP 2 – LABORATORIUM DIERVOEDING

Uit Groep 2 werden de honden F, G, H, I en K geselecteerd voor verder bloedonderzoek. Deze groep honden testte over het algemeen negatief voor *G. duodenalis* cystenuitscheiding gedurende de eerder besproken fecesopvolging. Dit bloedonderzoek is op dezelfde manier en met hetzelfde doel uitgevoerd als het bloedonderzoek bij Groep 1. De uitslag van het bloedonderzoek van Groep 2 is weergegeven in bijlage 4. Ook deze bijlage bevat, net als bij Groep 1 in bijlage 3, de concrete uitslag wat betreft de proliferatie van de immuuncellen afkomstig uit het bloed van de gekozen honden onder invloed van verschillende condities. Bij deze groep werd er een extra conditie toegevoegd, namelijk de conditie met levende trofozoïeten. Ook hier is gebruik gemaakt van het fluorescentie intensiteitssignaal gemeten door de Cytoflex® flow cytometer, welke daarna is omgerekend in proliferatie indices.

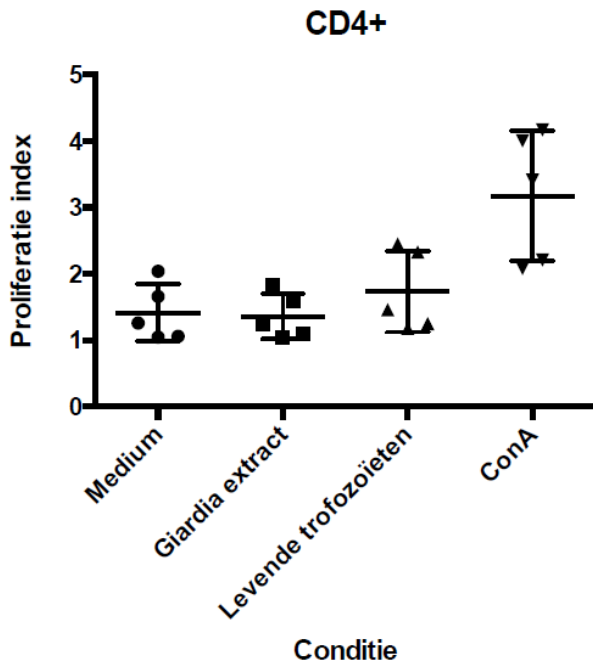
De proliferatie indices van de honden van Groep 2 zijn weergegeven in figuur 13 tot en met figuur 17. Net als in de grafieken horende bij Groep 1 werd geen duidelijke proliferatie gezien van de immuuncellen blootgesteld aan zowel *G. duodenalis* extract als de levende *G. duodenalis* trofozoïeten tegenover de conditie waarin de immuuncellen in enkel medium geïncubeerd werden (negatieve controle). Wel is wederom te zien dat de verschillende immuuncellen van de honden proliferereerden bij de positieve controle (conditie met mutageen ConA). Net als bij Groep 1 kan er hier dus niet gesproken worden over een duidelijke stimulans tot *in vitro* proliferatie van de immuuncellen en dus een duidelijke immuunrespons bij het blootstellen aan de parasiet.



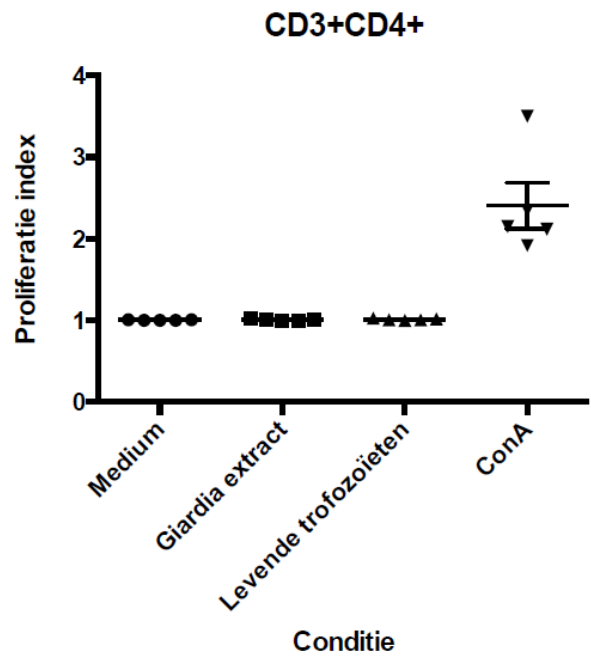
Figuur 13 - Proliferatie index levende cellen Groep 2



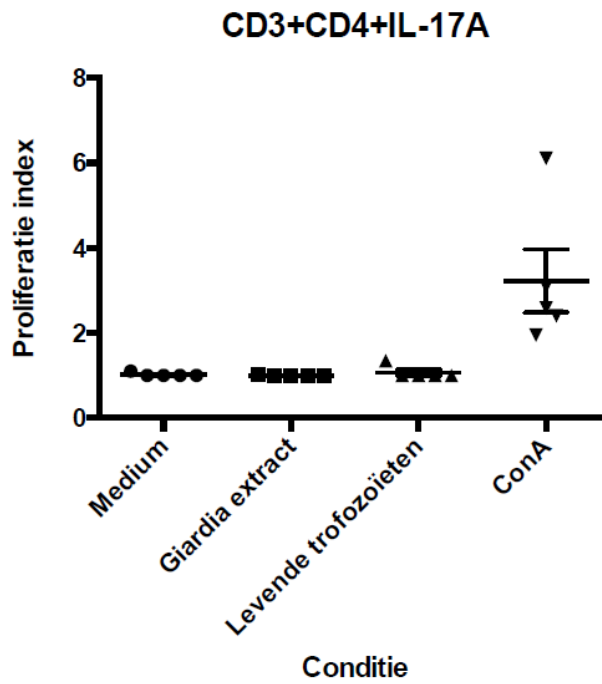
Figuur 14 - Proliferatie index CD3+ Groep 2



Figuur 15 - Proliferatie index CD4+ Groep 2



Figuur 16 - Proliferatie index CD3+CD4+ Groep 2



Figuur 17 - Proliferatie index CD3+CD4+IL-17A+ Groep 2



## 6 Discussie

Initieel was het doel van deze masterproef om te achterhalen of er verschillende fenotypes te onderscheiden zouden zijn aan de hand van cystenuitscheiding van honden die natuurlijk besmet zijn met *G. duodenalis*. Hierbij was de verwachting om drie fenotypes te kunnen onderscheiden, namelijk één fenotype waarin de honden negatief zouden blijven ondanks een omgevingsbesmetting, één fenotype waarin de honden positief zouden testen, maar erna immuniteit zouden opbouwen en dus een steeds lagere tot geen cystenuitscheiding meer zouden vertonen en als laatste een fenotype waarbij de honden cysten blijven uitscheiden en dus geen beschermende immuniteit opbouwen.

In Groep 1 zijn er een aantal honden die *G. duodenalis* cysten bleven uitscheiden in de feces en een aantal honden die twee- tot driemaal intermitterend negatief testten voor cystenuitscheiding in de feces gedurende deze opvolging. In deze Groep 1 leek de cystenuitscheiding voornamelijk van mild tot hoge cystenuitscheiding te gaan wanneer men kijkt naar kwantitatieve cystenuitscheiding. In Groep 2 testten de honden over het algemeen negatief voor *G. duodenalis* cysten uitscheiding in de feces, met uitzondering van een paar honden die één- of tweemaal mild positief testten voor cystenuitscheiding gedurende deze opvolgperiode. Toch zou het niet geheel correct zijn om hier te spreken van drie duidelijk verschillende fenotypes op basis van het aantal cysten per gram feces. De *G. duodenalis* cystenuitscheiding mag niet louter kwantitatief bekeken worden, aangezien de verschillen in hoeveelheid cystenuitscheiding en het tijdstip van piekvorming van de cystenuitscheiding wellicht te wijten kan zijn aan het feit dat de fecesverzameling steeds een momentopname was. Zo kan het zijn dat de ene hond niet op zijn maximale piekhoogte qua cystenuitscheiding bemonsterd is, terwijl dat bij een andere hond wel het geval kan zijn geweest. Het feit dat er een aantal honden uit Groep 1 negatief zijn getest voor *G. duodenalis* cystenuitscheiding tussen tijdstippen waarop positieve resultaten voor cystenuitscheiding werden bekomen bij eenzelfde hond, kan veroorzaakt worden door een intermitterende uitscheiding van de parasiet of door vals negatieve resultaten van de test.

Wanneer eerder kwalitatief gekeken wordt naar de data bekomen uit het fecesonderzoek, kan men stellen dat de honden in Groep 1 quasi continu positief getest hebben voor *G. duodenalis* cystenuitscheiding en dat de honden van Groep 2 bijna altijd negatief getest hebben voor *G. duodenalis* cystenuitscheiding gedurende de achttien weken fecesopvolging. Hierbij is het een opvallende bevinding dat beide groepen wel degelijk blootgesteld zijn geweest aan een natuurlijk infectie met *G. duodenalis*, aangezien zich in beide groepen meerdere positieve gevallen hebben voorgedaan. Echter werd hier een verschil waargenomen wat betreft gevoeligheid met betrekking tot langdurige cystenuitscheiding van de parasiet in beide groepen honden. Zo bleek dat de honden in Groep 1 langdurig cysten bleven uitscheiden en zo quasi elke keer positief testten voor *G. duodenalis*, maar dat de honden in Groep 2 dit in een veel mindere mate tot zelfs niet deden. In Groep 2 overheerst duidelijk het aantal negatieve resultaten. Twee mogelijke redenen dat deze groepen verschillen in gevoeligheid wat betreft langdurige cystenuitscheiding kunnen zijn dat de groepen verschillen qua leeftijdssamenstelling en dat de omgevingsblootstelling verschillend kan zijn voor beide groepen aangezien de honden immers op verschillende locaties gehuisvest zijn. Betreffende het leeftijdsverschil, in Groep 1 zijn de honden allen 2 jaar oud en in Groep 2 hebben de honden een leeftijd tussen de 2 en 8 jaar. Het merendeel van de honden in Groep 2 zijn echter 3 jaar of ouder. Hieruit zou men kunnen concluderen dat het mogelijk is dat er een leeftijdsgebonden factor speelt bij het besmetten van de omgeving met *G. duodenalis* cysten. De omgevings-besmetting bij Groep 1 is mogelijks hoger doordat er jongere, eventueel gevoeliger, honden aanwezig zijn en dat deze jonge honden dus een hogere cystenuitscheiding veroorzaken en zo ook een hogere omgevingsbesmetting veroorzaken. Echter moet er ook rekening gehouden worden met het feit dat deze honden op aparte locaties gehuisvest zijn en dat er mogelijks ook andere redenen kunnen zijn waarom een omgevingsbesmetting hoger is bij de ene locatie tegenover de andere locatie. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan verschillende hygiëneprotocollen en maatregelen, zoals bijvoorbeeld het gebruik van verschillende schoonmaakmiddelen of een verschil in frequentie van reinigen van de hokken. Daarnaast kan de omgeving op de ene locatie makkelijker te reinigen zijn dan

op de andere locatie, hierbij kan gedacht worden aan een verschil in vloertextuur, het gebruik van verschillend beddingmateriaal etcetera. Een extra gegeven wat in rekening gebracht moet worden is dat er hier sprake was van een beperking van de beschikbare tijd voor deze proef, aangezien de honden van Groep 1 geadopteerd werden na een aantal weken, waardoor geen langere opvolging mogelijk was voor deze dieren. In een ideale situatie zou de proef langer lopen, weliswaar onder dezelfde groepssamenstelling, om deze dieren te kunnen opvolgen tot op oudere leeftijd. Als men deze honden namelijk zou opvolgen bij hun nieuwe thuis, zou de omgevingsbesmetting een stuk lager kunnen liggen dan wanneer deze honden in een groep gehuisvest zijn. Wanneer de honden langer opgevolgd hadden kunnen worden in dezelfde groepssamenstelling en er daadwerkelijk een leeftijdsgebonden factor aanwezig zou zijn in de gevoeligheid voor besmetting van *G. duodenalis* zou men ook in Groep 1 een shift verwachten naar een minder langdurige cystenuitscheiding van de parasiet wanneer de dieren op oudere leeftijd besmet worden. Om de omgevingsfactor te kunnen elimineren zou een proef gestart kunnen worden waar de dieren in dezelfde omgeving gehuisvest worden. Ideaal gezien zouden dan alle factoren, buiten de leeftijdscategorie, gelijk moeten zijn voor alle dieren.

Het langdurig uitscheiden van de *G. duodenalis* cysten bij bepaalde honden kan wijzen op een tragere opbouw van een beschermende immuniteit. Dit zou hypothetisch gezien te wijten kunnen zijn een meer uitgebreid en ontwikkeld immuunsysteem bij bijvoorbeeld oudere honden. Zo werd er eerder bij muizen en runderen bewezen dat de IL-17A respons hier een grote rol in speelt. Zo leken jonge, niet-gespeende muizen een deficiëntie te hebben in hun IL-17A respons, wanneer men deze vergeleek met oudere, gespeende muizen. Hierdoor kon het verschil in gevoeligheid voor *G. muris* verklaard worden. Gezien deze observaties bij andere diersoorten is er in deze masterproef gefocust op de IL-17A respons in het bloed van de honden na restimulatie met *G. duodenalis* eiwitextract *in vitro*. Zowel uit Groep 1 als uit Groep 2 zijn een aantal honden gekozen om onderzoek op te doen.

Zowel bij de honden in Groep 1 als in Groep 2 werd er geen proliferatie van de lymfocyten gezien bij blootstelling aan *G. duodenalis* eiwitextract of levende trofozoïeten wanneer men dit vergeleek met de negatieve controle, namelijk de conditie waarin de lymfocyten in enkel voedingsmedium geïncubeerd werden. De positieve controle conditie waarin het mutageen ConA is toegevoegd gaf wel een duidelijke proliferatie weer. Aangezien zowel Groep 1 als Groep 2 negatief testten wat betreft proliferatie, is hiermee dus geen duidelijk verschil tussen immuunrespons van de jongere en oudere honden gevonden. Bij deze onderzochte honden kon het leeftijdsgebonden verschil in IL-17A respons die eerder bij muizen en runderen gezien werd dus niet vastgesteld worden.

Er kunnen verschillende redenen zijn waarom er bij deze honden geen IL-17A respons gedetecteerd wordt na *in vitro* restimulatie met de parasiet. Zo kan het zijn dat er effectief geen verband is tussen de specifieke IL-17A respons en het opbouwen van immuniteit tegenover *G. duodenalis* bij honden zoals deze wel eerder gezien is bij runderen en muizen. Een andere mogelijkheid is dat er weinig parasiet-specifieke immuuncellen circuleren in het bloed bij een besmetting op het moment dat deze nog niet op haar piek van cystenuitscheiding in de feces zit. Bij runderen was er bijvoorbeeld enkel proliferatie te zien van de immuuncellen in het bloed wanneer deze runderen een piek in cystenuitscheiding bij fecesonderzoek vertoonden. Als dit fenomeen zich ook zo zou voordoen bij honden, kan het zijn dat deze immuuncellen pas gedetecteerd worden tijdens een klinische episode van giardiasis. Echter is het daarnaast ook mogelijk dat er technische fouten zijn voorgevallen tijdens het onderzoek die niet opgepikt zijn door de verschillende controles die zijn uitgevoerd. Het kan ook mogelijk zijn dat het trofozoïeten extract of de levende trofozoïeten niet de gewenste reactie uitoefenen op de immuuncellen *in vitro*. Dit zou te wijten kunnen zijn aan de gebruikte *G. duodenalis* trofozoïeten die voor te weinig re-stimulatie zorgen of aan het soort voedingsmedium dat er gebruikt werd.

Een andere zeer opvallende bevinding in deze proef is dat geen enkele hond klinische klachten heeft gehad, ondanks dat de dieren regelmatig positief testten voor *G. duodenalis* in het fecesonderzoek. Aangezien dat er in deze proef geen honden aanwezig waren met een leeftijd jonger dan 1 jaar, kunnen er geen uitspraken gedaan worden over hetgeen dat er in de literatuur beweerd is, dat honden jonger

dan 1 jaar vaker symptomen vertonen dan dieren met een leeftijd ouder dan 1 jaar. Wat men wel kan concluderen is dat infecties inderdaad subklinisch kunnen verlopen, zoals eerder in literatuur is aangehaald. Er ontstaat daardoor het vermoeden dat er een hogere prevalentie van *G. duodenalis* voorkomt in de gehele hondenpopulatie in België dan dat er nu in de literatuur bekend is. Daarnaast is het mogelijk dat de parasiet niet altijd de oorzaak is van de gastro-intestinale klachten wanneer er een besmetting met *G. duodenalis* wordt vastgesteld via fecesonderzoek bij de hond.

## 7 Conclusie

Dit onderzoek wekt het vermoeden dat *G. duodenalis* cysten langduriger worden uitgescheiden bij jonge honden in tegenstelling tot oudere honden. Om echter een betrouwbare conclusie te kunnen trekken wat betreft *G. duodenalis* cystenuitscheiding bij honden en de leeftijdsgebonden factor hierbij, is er in de toekomst meer en langduriger onderzoek nodig. Hierbij zou de voorkeur uitgaan naar een onderzoek waarbij alle factoren gelijk gesteld worden voor alle honden, uitgezonderd van de leeftijdscategorie.

Er is daarnaast nog geen duidelijke link vastgesteld tussen een IL-17A respons en de duur van cystenuitscheiding na besmetting met *G. duodenalis* bij honden. Echter om met meer zekerheid te kunnen zeggen dat er geen verband is, is er meer onderzoek nodig.

Een duidelijke conclusie in dit onderzoek is echter wel dat *G. duodenalis* infecties bij honden niet altijd een giardiasis zullen veroorzaken. Aangezien deze infectie subklinisch kan voorkomen, is het aannemelijk dat het aantal geïnfecteerde honden in de populatie in België hoger ligt dan op dit moment beschreven wordt. Ook kan het zijn dat wanneer er een besmetting met *G. duodenalis* wordt vastgesteld via fecesonderzoek bij gastro-intestinale klachten bij de hond, dat de parasiet mogelijk niet de oorzaak is van de klachten.

## 8 Referentielijst

1. Adam, R.D., 2001. Biology of *Giardia lamblia*. Clinical Microbiology Reviews July 2001, 447-475.
2. Alves, J., Santos, A., 2016. Prevalence of *Giardia* spp. in young dogs using a combination of two diagnostic methods. Acta Parasitologica 2016, 261-266.
3. Ballweber, L.R., Xiao, L., Bowman, D.D., Kahn, G., Cama, V.A., 2010. Giardiasis in dogs and cats: update on epidemiology and public health significance. Trends in Parasitology 2010, 180-189.
4. Bouzid, M., Halai, K., Jeffreys, D., Hunter, P.R., 2015. The prevalence of *Giardia* infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. Veterinary Parasitology 157, 181-202.
5. Cacciò, S.M., Lalle, M., Svärd, S.G., 2017. Host specificity in the *Giardia duodenalis* species complex. Infection, Genetics and Evolution 66, 335-345.
6. Claerebout, E., Casaert, S., Dalemans, A.C., De Wilde, N., Levecke, B., Vercruysse, J., Geurden, T., 2009. *Giardia* and other intestinal parasites in different dog populations in Northern Belgium. Veterinary Parasitology 161, 41-46.
7. Dreesen L., De Bosscher K, Grit, G., Staels, B., Lubberts, E., Bauge, E., Geldhof, P., 2014. *Giardia muris* Infection in Mice is Associated with a Protective Interleukin 17A Response and Induction of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Alpha. Infection and Immunity 2014, 3333-3340.
8. Dupont, S., Butaye, P., Claerebout, E., Theuns, S., Duchateau, L., Van de Maele, I., Daminet, S., 2013. Enteropathogens in pups from pet shops and breeding facilities. Journal of Small Animal Practice, volume 54.
9. Epe, C., Rehker, G., Schnieder, T., Lorentzen, L., Kreienbrock, L., 2010. *Giardia* in symptomatic dogs and cats in Europe – Results of a European study. Veterinary Parasitology 173, 32-38.
10. Feng, Y., Xiao, L., 2011. Zoonotic Potential and Molecular Epidemiology of *Giardia* Species and Giardiasis. Clinical Microbiology Reviews 2011, 110-140.
11. Fink, M.Y., Singer, S.M., 2017. The intersection of Immune Responses, Microbiota, and Pathogenesis in Giardiasis. Trends in Parasitology 33, 903-913.
12. Geurden, T., Berkvens, D., Casaert, S., Vercruysse, J., Claerebout, E., 2008. A Bayesian evaluation of three diagnostic assays for the detection of *Giardia duodenalis* in asymptomatic dogs. Veterinary Parasitology 157, 14-20.
13. Grit, G.H., Devriendt, B., Van Coppennolle, S., Geurden, T., Hope, J., Vercruysse, J., Cox, E., Geldhof, P., Claerebout, E., 2013. *Giardia duodenalis* stimulates partial maturation of bovine dendritic cells associated with altered cytokine secretion and induction of T-cell proliferation. Parasite Immunology 36, 157-169.
14. Grit, G.H., Van Coppennolle, S., Devriendt, B., Geurden, T., Dreesen, L., Hope, J., Vercruysse, J., Cox, E., Geldhof, P., Claerebout, E., 2014. Evaluation of cellular and humoral systemic immune response against *Giardia duodenalis* infection in cattle. Veterinary Parasitology 202 2014, 145-155.
15. Kooyman, F.N.J., Wagenaar, J.A., Zomer, A., 2019. Whole-genome sequencing of dog-specific assemblages C and D of *Giardia duodenalis* from single and pooled cysts indicates host-associated genes. Microbial genomics 2019; 5.
16. Kuzi, S., Argentaro, S.E., Baneth, G., 2020. Prevalence of *Giardia duodenalis* infection, comorbidities and associated risk factors in dogs admitted to a veterinary teaching hospital in Israel. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 68, 101401.

17. Lopez, J.C., Aguirre, M.J, Dalisay, J., 2019. Occurrence of Intestinal Helminth Parasites in Domestic Dogs (*Canis familiaris domesticus*) in Arevalo, Iloilo City, Philippines Using the Parasep Fecal Parasite Concentration Technique. Publiscience, 2019.
18. Midlej, V., Benchimol, M., 2009. *Giardia lamblia* behavior during encystment: How morphological changes in shape occur. Parasitology International 58 (2009), 72-80.
19. Monis, P.T., Caccio, S.M., Thompson, R.C.A., 2009. Variation in *Giardia*: towards a taxonomic revision of the genus. Trends in Parasitology 25, 93-100.
20. Mravcová, K., Strkolcová, G., Goldová, M., 2019. The prevalence and assemblages of *Giardia duodenalis* in dogs: a systematic review in Europe. Folia Veterinaria, 63, 38-45.
21. Nohýnková, E., Tumová, P., Kulda, J., 2006. Cell Division of *Giardia intestinalis*: Flagellar Developmental Cycle Involves Transformation and Exchange of Flagella between Mastigonts of a Diplomonad Cell. Eukaryotic Cell 2006, 753-761.
22. Ortega-Pierres, M.G., Argüello-García, R., 2019. *Giardia duodenalis*: Role of secreted molecules as virulent factors in the cytotoxic effect on epithelial cells. Advances in Parasitology 106, 129-169.
23. Paerewijck, O., Maertens, B., Dreesen, L., Van Meulder, F., Peelaers, I., Ratman, D. Li, R.W, Lubberts, E., De Bosscher, K., Geldhof, P., 2017. Interleukin-17 receptor A (IL-17RA) as a central regulator of the protective immune response against *Giardia*. Scientific Reports 2017, 8520.
24. Paerewijck, O., Maertens, B., Gagnaire, A., De Bosscher, K., Geldhof, P., 2019. Delayed development of the protective IL-17A response following a *Giardia muris* infection in neonatal mice. Scientific Reports 2019, 8959.
25. Perrucci, S., Berrilli, F., Procopio, C., Montalbano Di Filippo, M., Piernini, A., Marchetti, V., 2019. *Giardia duodenalis* infection in dogs affected by primary chronic enteropathy. Open Veterinary Journal 10, 74-79.
26. Rópolo, A.S., Feliziani, C., Touz, M.C., 2019. Unusual proteins in *Giardia duodenalis* and their role in survival. Advances in Parasitology 106, 1-50.
27. Ryan, U., Cacciò, S.M., 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. International Journal for Parasitology 43, 943-956.
28. Ryan, U., Zahedi, A., 2019. Molecular epidemiology of giardiasis from a veterinary perspective. Advances in Parasitology 106, 209-254.
29. Sanchez-Thevenet, P., Carmena, D., Adell-Aledón, M., Dacal, E., Arias, E., Saugar, J.M., Rodríguez, E., Dea-Ayuela, M.A., 2019. High Prevalence and Diversity of Zoonotic and Other Intestinal Parasites in Dogs from Eastern Spain. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2019, nr 12.
30. Singer, S.M., Fink, M.Y., Angelova, V.V., 2019. Recent insights into innate and adaptive immune responses to *Giardia*. Advances in Parasitology 106, 171-208.
31. Tangtrongsup, S., Scorza, V., 2019. Update on the diagnosis and management of *Giardia* spp. infections in dogs and cats. Topics in Companion Animal Medicine, 155 – 162.
32. Uiterwijk, M., Nijse, R., Kooyman, F.N.J., Wagenaar, J.A., Mughini-Gras, L., Ploeger, H.W., 2019. Host factors associated with *Giardia duodenalis* infection in dogs across multiple diagnostic tests. Parasites Vectors 2019, 12:556.
33. Uiterwijk, M., Nijse, R., Kooyman, F.N.J., Wagenaar, J.A., Mughini-Gras, L., Koop, G., Ploeger, H.W., 2018. Comparing four diagnostic tests for *Giardia duodenalis* in dogs using latent class analysis. Parasites Vectors 2018, 11:439.

## 9 Bijlagen

### 9.1 Bijlage 1

Tabel 5 - Resultaten mengstalen fecesonderzoek *Giardia duodenalis* Groep 1

<b>SUBGROEP VAKGROEP KLEINE HUISDIEREN (GROEP 1)</b>	<b>WEEK 35 2020</b>	<b>WEEK 39 2020</b>
Kennel 1A	Negatief	Negatief
Kennel 1B	Positief	-
Kennel 2A	Negatief	Positief
Kennel 2B	Negatief	Positief
Kennel 3A	Negatief	Negatief
Kennel 3B	Positief	-
Kennel 4A	Negatief	Positief
Kennel 4B	Negatief	Negatief
Kennel 5A	Negatief	Positief
Kennel 6A	Positief	-
Positieve controle	Positief	Positief
Negatieve controle	Negatief	Negatief

## 9.2 Bijlage 2

Tabel 6 - Resultaten individuele stalen fecesonderzoek *Giardia duodenalis* Groep 1

INDIVIDUELE STALEN VAKGROEP KLEINE HUISDIEREN (GROEP 1)	WEEK 35 2020	WEEK 39 2020
Hond 1B1	Negatief	Negatief
Hond 1B2	Negatief	Negatief
Hond 1B3	Negatief	Negatief
Hond 2A1	-	Negatief
Hond 2A2	-	Negatief
Hond 2A3	-	Negatief
Hond 2A4	-	Positief (100 cpg)
Hond 2B1	-	Positief (2800 cpg)
Hond 2B2	-	Positief (2400 cpg)
Hond 3B1	Negatief	Positief (400 cpg)
Hond 3B2	Positief (100 cpg)	Negatief
Hond 4A1	-	Positief (3400 cpg)
Hond 4A2	-	Negatief
Hond 4A3	-	Negatief
Hond 4A4	-	Positief (13000 cpg)
Hond 5A1	-	Negatief
Hond 5A2	-	Positief (600 cpg)
Hond 5A3	-	Positief (900 cpg)
Hond 5A4	-	Negatief
Hond 5A5	-	Positief (1500 cpg)
Hond 5A6	-	Negatief
Hond 5A7	-	Positief (900 cpg)
Hond 6A1	Positief (200 cpg)	Positief (6000 cpg)
Hond 6A2	Positief (100 cpg)	Positief (1400 cpg)
Hond 6A3	Negatief	Positief (2500 cpg)
Hond 6A4	Negatief	Positief (7800 cpg)
Hond 6A5	Negatief	Positief (1500 cpg)
Hond 6A6	Negatief	Positief (160 cpg)



Hond 6A7	Negatief	Positief (5300 cpg)
Hond 6A8	Positief (100 cpg)	Positief (2300 cpg)
Hond 6A9	Negatief	Positief (300 cpg)
Positieve controle	Positief	Positief
Negatieve controle	Negatief	Negatief

### 9.3 Bijlage 3

#### GROEP 1 – VAKGROEP KLEINE HUISDIEREN

Tabel 7 – Bloedonderzoek proliferatie-index subgroep 6A groep 1. Con A = positieve controle, medium = negatieve controle

Hond	Conditie	Live cells	CD3	CD4	CD3CD4	CD3CD4IL-17A
<b>6A1</b>	Con A	4,04	1,9	2,51	1,82	1,7
	GDE	1,29	1,22	1,23	1,16	1,14
	Medium	1,44	1,36	1,36	1,28	1,21
<b>6A2</b>	Con A	5,11	3,68	2,49	2,37	2,02
	GDE	1,75	1,6	1,64	1,52	1,41
	Medium	1,74	1,63	1,62	1,54	1,48
<b>6A5</b>	Con A	3,9	2,65	2,26	2,02	1,7
	GDE	1,35	1,19	1,25	1,13	1,13
	Medium	1,3	1,22	1,2	1,15	1,07
<b>6A7</b>	Con A	6,1	3,39	2,98	2,54	2,26
	GDE	1,87	1,7	1,77	1,62	1,44
	Medium	1,81	1,63	1,72	1,54	1,66
<b>6A8</b>	Con A	3,93	2,27	2,65	2,15	1,87
	GDE	1,27	1,14	1,21	1,11	1,07
	Medium	1,11	1,07	1,07	1,05	1,03

## 9.4 Bijlage 4

### GROEP 2 – VAKGROEP DIERVOEDING

Tabel 8 - Bloedonderzoek proliferatie-index groep 2. Con A = positieve controle, medium = negatieve controle

Hond	Conditie	Live cells	CD3	CD4	CD3CD4	CD3CD4IL-17A
<b>F</b>	Con A	3,09	2,68	2,21	2,12	1,95
	GDE	1,07	1,02	1,05	1,01	1
	Medium	1,09	1,02	1,05	1,01	1
	GDLT	1,24	1,03	1,18	1,03	1
<b>G</b>	Con A	4,67	3,56	4	3,5	3,09
	GDE	1,37	1	1,59	1	1
	Medium	1,5	1	1,66	1	1
	GDLT	1,84	1,01	2,33	1,01	1
<b>H</b>	Con A	3,14	2,49	2,08	1,92	2,59
	GDE	1,23	1,01	1,24	1,01	1,03
	Medium	1,34	1	1,26	1	1,1
	GDLT	1,51	1,01	1,46	1,01	1
<b>I</b>	Con A	5,71	2,38	4,17	2,35	2,4
	GDE	1,07	1	1,09	1	1
	Medium	1,05	1	1,06	1	1
	GDLT	1,18	1	1,25	1	1
<b>K</b>	Con A	4,96	2,36	3,41	2,15	6,11
	GDE	1,43	1	1,84	1,01	1
	Medium	1,56	1,01	2,04	1,02	1
	GDLT	1,82	1,01	2,45	1,02	1,35