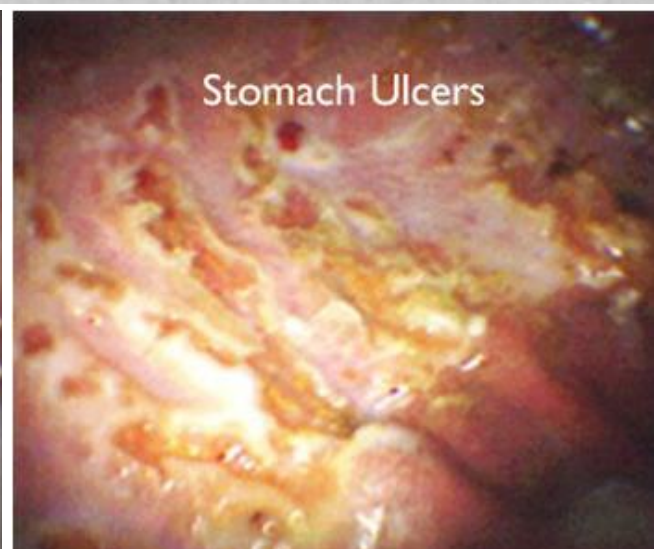
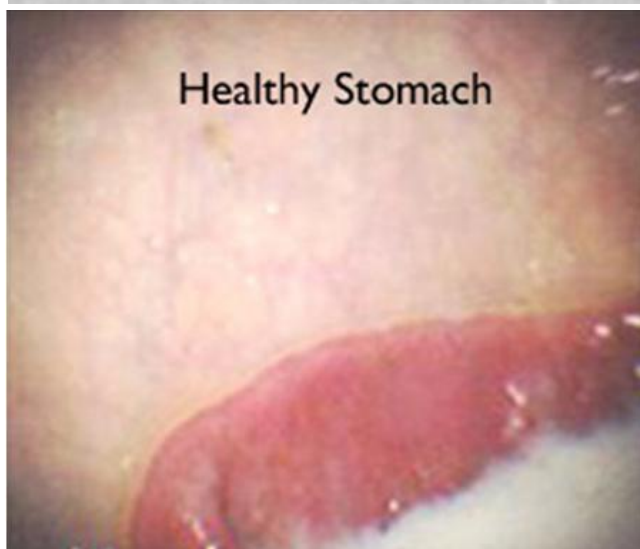
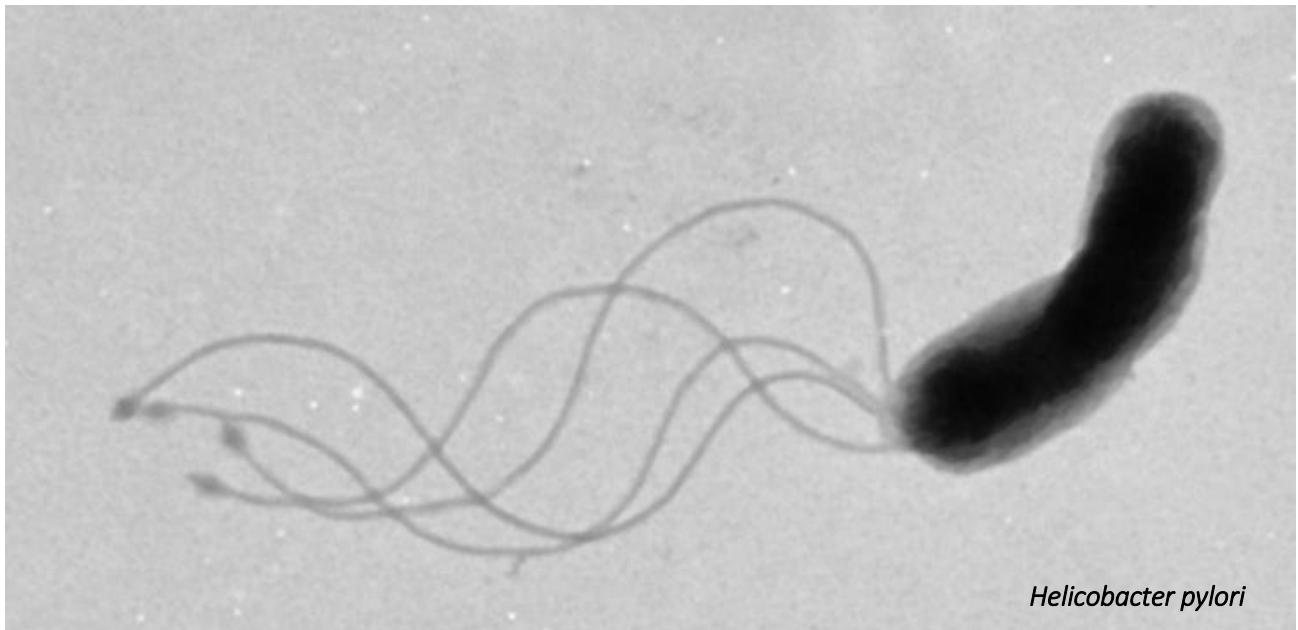


Het Equine Gastric Ulceration Syndrome & *Helicobacter pylori* bij paarden in Nederland



Auteur: Sanne de Rijk

Het Equine Gastric Ulceration Syndrome & *Helicobacter pylori* bij paarden in Nederland

Een afstudeeronderzoek naar de prevalentie van maagwandaantasting en *Helicobacter pylori* bij paarden in Nederland, en de mogelijke relatie hiertussen

Sanne de Rijk

Studentnummer: 920820001

Diermanagement

Begeleiders:

drs. C.A.M. Koenis

ir. H.J. Kuipers

Hogeschool VHL

Projectnummer: 594000

Leeuwarden, juli 2015

De schrijver van dit afstudeerrapport en de overige betrokkenen bij het schrijven hiervan hebben gestreefd naar juistheid en volledigheid van de aangeboden informatie, maar noch zij, noch de opleiding of de organisatie als geheel zijn in geen geval aansprakelijk voor enige directe of indirecte schade welke ontstaat door gebruikmaking van de in dit rapport aangeboden informatie of van informatie van bronnen waarnaar dit rapport verwijst.

De afbeeldingen op de omslag zijn afkomstig van:

Helicobacter pylori: <http://mib.uga.edu/research/labs/hoover>

Healthy stomach & Stomach Ulcers: www.mobileequinediagnostics.com/?attachment_id=114

Paardenbenen: www.paardenarts.nl/kennisbank/gewrichtsproblemen-bij-paarden/

Samenvatting

Het Equine Gastric Ulceration Syndrome (EGUS) is een aandoening aan de maag van het paard waarbij het maagwandepitheel wordt aangetast door het maagzuur. Hierdoor ontstaan er een ontstekingsreactie, zwelling en uiteindelijk maagzweren. Internationaal is veel onderzoek verricht naar de prevalentie van EGUS, hierbij zijn percentages gevonden van 25% tot 100% afhankelijk van het gebruiksdoel van het paard. Voor zover bij de auteur bekend zijn er geen gegevens over de prevalentie van EGUS (en de verschillende gradaties hiervan) bij paarden in Nederland. Naast bekende oorzaken/risicofactoren zoals vasten en voermanagement (bv. het geven van krachtvoer) voor EGUS is ook de bacterie *Helicobacter pylori* een mogelijke oorzaak/risicofactor voor het ontstaan van EGUS. Het is bekend dat *Helicobacter pylori* bij mensen verschillende aandoeningen kan veroorzaken, waaronder maagzweren. Bij paarden bestaat er tegenstrijdig bewijs over de relatie tussen de aanwezigheid van *Helicobacter pylori* en EGUS.

De prevalentie (van de gradaties) van EGUS op verschillende locaties in de maag, de prevalentie van *Helicobacter pylori* en de relatie tussen *Helicobacter pylori* en EGUS zijn onderzocht. De locaties zijn het non-glandulaire deel, glandulaire deel en de margo plicatus. Het onderzoek is uitgevoerd door 103 magen van geslachte paarden te openen. Elke locatie werd met behulp van een scoresysteem beoordeeld op de aanwezigheid en gradatie van EGUS, vervolgens werden er samples van het maagwandepitheel genomen. Deze samples werden in elke locatie genomen van de ernstigste maagwandaantasting die aanwezig was en van gezond weefsel. Indien er in een locatie geen EGUS aanwezig was werd er alleen een sample genomen van gezond weefsel. De samples werden met behulp van een *Helicobacter pylori* Antigen ELISA kit geanalyseerd op de aanwezigheid van *Helicobacter pylori*.

Van de onderzoekspopulatie had 49,5% (95% BI 39,8 – 59,2) op geen enkele locatie EGUS en 50,5% (95% BI 40,8 – 60,2) had op één of meerdere locaties EGUS. Vanwege de diversiteit van de onderzoekspopulatie uit dit onderzoek is het moeilijk om de hiervoor genoemde resultaten met andere onderzoeken te vergelijken. Deze onderzoeken richtten zich namelijk op specifieke ‘typen’ paarden.

Uitgesplitst naar de verschillende locaties had 18,4% (95% BI 11,7 – 26,2) van de onderzoekspopulatie EGUS in het non-glandulaire deel. In het glandulaire deel had 24,3% (95% BI 15,5 – 34,0) EGUS en in de margo plicatus 28,2% (95% BI 19,4 – 37,9). De verschillen tussen deze locaties waren niet significant ($p = 0,212$). Dit werd bij aanvang van dit onderzoek wel verwacht omdat het glandulaire deel beter beschermd is tegen het maagzuur. Daarnaast komt EGUS volgens dierenartsen vaker voor in het non-glandulaire deel. Mogelijk werd geen significant verschil gevonden door een steekproefgrootte die onvoldoende was. Een verschil van bijna 10% tussen het non-glandulaire deel en de margo plicatus werd namelijk wel als relevant beschouwd.

Bij alle locaties kwam gradatie 0 (geen EGUS) het meest voor, gevolgd door gradatie 1 (één kleine laesie of kleine laesies op meerdere plaatsen). Deze resultaten verklaren is moeilijk omdat er geen inzicht was in de achtergrond van de onderzoekspopulatie. Daardoor was er geen informatie beschikbaar die inzicht kon geven in de risicofactoren waaraan deze paarden bloot stonden en die de ontwikkeling van EGUS beïnvloedden.

In één van de 292 genomen samples werd *Helicobacter pylori* aangetoond. Bij aanvang van dit onderzoek werd verwacht dat *Helicobacter pylori* vaker aangetroffen zou worden dan dat nu gedaan

is. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de omstandigheden in de paardenmaag ongeschikt zijn voor *Helicobacter pylori*, die zeer specifieke eisen aan zijn omgeving stelt om te kunnen overleven en zich te kunnen vermenigvuldigen. Het gegeven dat in het onderhavige onderzoek *Helicobacter pylori* eenmaal is aangetoond en het eerdere tegenstrijdige bewijs met betrekking tot de relatie tussen de aanwezigheid van *Helicobacter pylori* bij paarden en EGUS leidt tot de verwachting dat *Helicobacter pylori* geen risicofactor is voor het ontstaan van EGUS.

Voorwoord

Voor u ligt de scriptie 'Het Equine Gastric Ulceration Syndrome & *Helicobacter pylori* bij paarden in Nederland', de afronding van mijn opleiding Diermanagement aan Hogeschool VHL. Naar aanleiding van een interessante afstudeerpresentatie van een medestudent over de verschillende risicofactoren voor maagwandaantasting ben ik op dit onderwerp gekomen. Dit onderwerp sprak me in het bijzonder aan omdat het ontstaan van maagwandaantasting bij paarden een samenspel van allerlei factoren is, waardoor er niet specifiek één oorzaak aan te wijzen is. Het was erg interessant om te onderzoeken hoe de situatie omtrent maagwandaantasting bij paarden in Nederland is.

Graag wil ik mijn begeleiders, Inge Koenis en Henry Kuipers, als eerste bedanken voor hun begeleiding en goede feedback tijdens dit proces, het was niet altijd makkelijk maar ik ben erg tevreden met het resultaat. Daarnaast wil ik Slachterij Dik in Stadskanaal hartelijk bedanken voor het feit dat ik alle paardenmagen bij hen mocht ophalen, zonder hen had ik dit onderzoek niet kunnen uitvoeren. Verder wil ik Marije Heida en Moniek Meevissen (MG Lab&Advies) en Aldo Veldhuis (Hogeschool VHL) bedanken voor hun hulp en advies bij het kiezen en uitvoeren van de tests voor *Helicobacter pylori*. Ook wil ik Merel Anne de Bruin bedanken voor haar hulp bij het snijden en beoordelen van de paardenmagen, ze schreef tegelijk met mij haar scriptie waardoor we regelmatig hebben kunnen sparren over de vorm en inhoud van onze verslagen. Als laatste wil ik Martijn Olij bedanken voor zijn kritische blik op de inhoud en vormgeving van dit verslag.

Sanne de Rijk,

7 juli 2015

Inhoudsopgave

1.	Inleiding	8
1.1.	Probleembeschrijving	8
1.2.	Doelstelling	9
1.3.	Onderzoeksvragen	9
1.4.	Leeswijzer	10
2.	Theoretische achtergrond	11
2.1.	Opbouw maagwand.....	11
2.2.	Risicofactoren van EGUS.....	11
3.	Materiaal & Methode	14
3.1.	Onderzoeksontwerp	14
3.2.	Onderzoekspopulatie.....	14
3.3.	Dataverzamelingsmethoden	15
3.3.1.	Dataverzamelingsmethode gegevens EGUS	15
3.3.2.	Dataverzamelingsmethode bepaling <i>Helicobacter pylori</i>	16
3.4.	Datapreparatie.....	17
3.5.	Data-analyse	19
3.5.1.	Prevalentie EGUS & <i>Helicobacter pylori</i>	19
3.5.2.	Relatie tussen <i>Helicobacter pylori</i> en EGUS	20
4.	Resultaten	21
5.	Discussie	23
5.1.	Prevalentie EGUS	23
5.2.	Prevalentie <i>Helicobacter pylori</i>	24
5.3.	Relatie tussen EGUS & <i>Helicobacter pylori</i>	25
5.4.	Opvallende resultaten	25
6.	Conclusie.....	27
7.	Aanbevelingen	28
	Bronvermelding	29
	Bijlage I Protocol beoordeling maag op EGUS	I
	Bijlage II Protocol bepaling <i>Helicobacter pylori</i>	II
	Bijlage III Codeboek SPSS	V

1. Inleiding

In dit hoofdstuk wordt eerst de probleembeschrijving behandeld, hierin zal onder andere worden ingegaan op het Equine Gastric Ulceration Syndrome, hoe vaak deze aandoening voorkomt en de (mogelijke) risicofactoren. Hierna worden de doelen van dit onderzoek genoemd, samen met de onderzoeks- en bijbehorende deelvragen. Als laatste volgt de leeswijzer waarin de verdere opbouw van dit onderzoeksverslag zal worden aangegeven.

1.1. Probleembeschrijving

Het Equine Gastric Ulceration Syndrome (EGUS) is een aandoening aan de maag van het paard waarbij het maagwandepitheel wordt aangetast door het maagzuur. Hierdoor ontstaan er een ontstekingsreactie, zwelling en uiteindelijk maagzweren. (Nadeau, et al., 2003) Symptomen die bij volwassen paarden kunnen optreden zijn verminderde eetlust, sloomheid, verminderde prestaties, slechte lichaamsconditie, gedragsveranderingen, milde koliek en/of een doffe vacht. Ook kunnen de paarden stijf zijn in hun beweging en een strakke, harde buik hebben. (Lewis, 1995; The Equine Gastric Ulcer Council, 1999; Breukink, 2007) Echter niet ieder paard vertoont symptomen. (The Equine Gastric Ulcer Council, 1999) EGUS komt voor in verschillende gradaties, waarbij de gradatie de mate van maagwandaantasting aangeeft. (Andrews, et al., 2002)

Internationaal is veel onderzoek verricht naar de prevalentie van EGUS zowel bij veulens als bij volwassen paarden die voor verschillende doelen gebruikt worden (bv. racepaarden, recreatiepaarden en sportpaarden). Het percentage racepaarden dat EGUS heeft varieert tussen 70% in Zweden en 100% in de Verenigde Staten. 56 van de 80 onderzochte paarden in Zweden had EGUS (Jonsson & Egenvall, 2006). 81% (164 van de 202 onderzochte paarden (Vatistas, et al., 1994)) tot 100% (30 van de 30 onderzochte paarden (Vatistas, et al., 1999)) in de Verenigde Staten hadden EGUS. Bij recreatiepaarden, manegepaarden en showpaarden werd een lagere prevalentie gevonden, 37% van de 82 onderzochte paarden in de Verenigde Staten had deze aandoening en tevens minder ernstig. (Murray, Grodinsky, Anderson, Radue, & Schmidt, 1989) De prevalentie bij sportpaarden is ongeveer 58% tot 66%. (Mitchell, 2003) Andrews en Nadeau (1999) gaven aan dat de geschatte prevalentie bij veulens in de VS varieert van 25-50%, zoals geciteerd in Rooney 1964; Wilson 1986; Collobert-Laugier et al. 1988; Murray et al. 1987, 1990; Murray 1988, 1989.

Voor zover bij de auteur bekend zijn er geen gegevens over de prevalentie van EGUS en de verschillende gradaties van EGUS bij paarden in Nederland. Hierdoor kan er geen enkele inschatting gemaakt worden van de omvang en de ernst van deze aandoening in Nederland. En de noodzaak tot voorlichting over de preventie/behandeling van EGUS aan paardeneigenaren/-houders. De prevalentie van gradatie van EGUS wordt onderzocht om inzicht te geven in de ernst van maagwandaantasting bij paarden in Nederland. Volgens schattingen zijn er 300.000 – 500.000 paarden en pony's in Nederland. (Hoogeveen & Jager, 2009) Uitgaande van de prevalentie in het buitenland (minstens 25% bij veulens tot 100% bij racepaarden) zijn er in Nederland al snel tienduizenden paarden met EGUS.

Daarnaast zijn er (mogelijke) verbanden gelegd tussen de locatie van EGUS en verschillende risicofactoren, hierop wordt in Hoofdstuk 2.2 verder ingegaan. In dit onderzoek zal daarom ook onderzocht worden wat de prevalentie van EGUS is bij specifieke locaties in de maag. Verwacht wordt dat er verschillen tussen locaties zullen zijn omdat EGUS volgens dierenartsen meer voorkomt in het bovenste deel (non-glandulaire deel) van de maag (Persoonlijke communicatie Marco de Bruijn, april

2014). Daarnaast is het onderste deel (glandulaire deel) van de maag veel beter beschermd tegen het maagzuur (dit wordt in Hoofdstuk 2.2 verder toegelicht) waardoor verwacht wordt dat hier minder EGUS voor zal komen.

Naast bekende oorzaken en risicofactoren voor het ontstaan van EGUS zoals vasten (Luthersson, Hou Nielsen, Harris, & Parkin, 2009b; Murray & Grady, 2002) en het voermanagement (Nadeau, et al., 2003; Luthersson, et al., 2009b) (zie 'Theoretische achtergrond' voor meer informatie) is ook de bacterie *Helicobacter pylori* een mogelijke oorzaak/risicofactor voor het ontstaan van EGUS. (Andrews, Buchanan, Elliot, Clariday, & Edwards, 2005) Bekend is dat *Helicobacter pylori* bij mensen verschillende aandoeningen kan veroorzaken zoals zweren in de maag of duodenum, gastric MALT lymphoma (tumoren in lymfeweefsel van de maag) en acute en chronische gastritis (Veldhuyzen van Zanten, Dixon, & Lee, 1999; Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006).

Bij paarden bestaat er tegenstrijdig bewijs over of de aanwezigheid van deze bacterie verband heeft met EGUS. Door Dimola en Caruso (1999) werd wel *Helicobacter pylori* in paardenmagen gevonden, ook legden zij een verband tussen deze bacterie en een chronische ontstekingsreactie. Daarentegen werd in twee andere studies (Husted, Jensen, Olsen, & Molbak, 2010; Johnson, et al., 1994) geen verband gevonden tussen laesies en de aanwezigheid van bacteriën. Het verband tussen het voorkomen van *Helicobacter pylori* en EGUS is dus nog niet volledig bekend.

1.2. Doelstelling

De doelen van dit onderzoek zijn om de prevalentie van EGUS, de prevalentie van verschillende gradaties van EGUS en de locaties van EGUS in de maag bij paarden in Nederland vast te stellen. Dit onderzoek wil daarnaast inzicht geven in of *Helicobacter pylori* voorkomt bij paarden in Nederland en in de relatie tussen *Helicobacter pylori* en EGUS.

1.3. Onderzoeksvragen

De onderzoeksvragen en de deelvragen zijn als volgt:

- 1) "Wat is de prevalentie van EGUS bij paarden in Nederland?"
 - a) Wat is de prevalentie van de verschillende gradaties van EGUS?
 - b) Wat is de prevalentie van EGUS op verschillende locaties in de maag?
 - c) Wat is de prevalentie per gradatie van EGUS op verschillende locaties in de maag?
- 2) "Wat is de prevalentie van *Helicobacter pylori* in magen van paarden in Nederland?"
 - a) Wat is de prevalentie van *Helicobacter pylori* bij paarden in Nederland?
 - b) Wat is de prevalentie van *Helicobacter pylori* op verschillende locaties in de maag?
- 3) "In hoeverre is er een relatie tussen het voorkomen van *Helicobacter pylori* en EGUS bij paarden in Nederland?"
 - a) Wat is de relatie tussen het voorkomen van *Helicobacter pylori* op verschillende locaties in de maag en het voorkomen van EGUS op diezelfde locaties?
 - b) Wat is de relatie tussen het voorkomen van *Helicobacter pylori* op verschillende locaties in de maag en de gradatie van EGUS op diezelfde locaties?

1.4. Leeswijzer

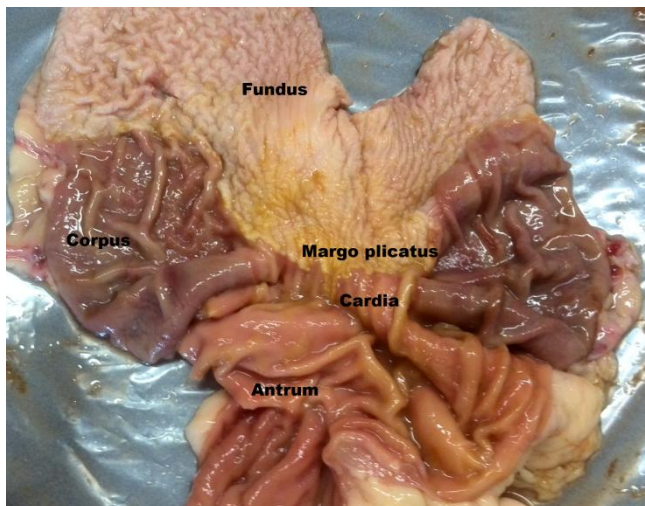
In het volgende hoofdstuk wordt een theoretische achtergrond gegeven over de maagwandopbouw van een paardenmaag, bekende risicofactoren van EGUS en de bacterie *Helicobacter pylori*. Het daaropvolgende hoofdstuk gaat in op de materiaal en methode, onder andere de (onderzoeks)-populatie, dataverzamelingsmethoden en de data-analyse worden behandeld. Het vierde hoofdstuk geeft de resultaten van dit onderzoek weer. In de discussie zal worden ingegaan op de vergelijking tussen de resultaten uit het onderhavige onderzoek en andere onderzoeken. Daarnaast wordt gezocht naar mogelijke verklaringen. Het zesde hoofdstuk geeft de conclusies weer, waarop als laatste de aanbevelingen worden behandeld.

2. Theoretische achtergrond

In dit hoofdstuk wordt een toelichting gegeven op hetgeen in de probleembeschrijving genoemd is. Kort zal worden ingegaan op de opbouw van het maagwandepitheel, de oorzaken/risicofactoren van EGUS en *Helicobacter pylori* als mogelijke risicofactor voor het ontstaan van EGUS.

2.1. Opbouw maagwand

Het maagwandepitheel in een paardenmaag is niet op iedere locatie hetzelfde. De maag kent verschillende gebieden met verschillende functies en opbouw van de maagwand. (Frandsen, Wilke, & Fails, 2009) Deze locaties zijn grofweg: het non-glandulaire slijmvlies, de margo plicatus en het glandulaire slijmvlies (bestaande uit corpus, cardia en antrum). (Luthersson, Hou Nielsen, Harris, & Parkin, 2009a) Figuur 1 is een overzichtsfoto van het maagwandepitheel van een paardenmaag, hierop zijn de verschillende gebieden te zien. Tussen de fundus (non-glandulair slijmvlies), corpus, cardia en het antrum (allen glandulair slijmvlies) ligt de margo plicatus als scheiding. Onder het antrum is nog een stuk van het duodenum te zien. (Andrews & Nadeau, 1999) Volgens Frandsen, et al. (2009) is het verschil tussen het non-glandulaire slijmvlies en het glandulaire slijmvlies dat de laatstgenoemde



Figuur 1 Overzicht gebieden paardenmaag geopend langs de greater curvature (grote bocht) (Fotografie: Sanne de Rijk)

klieren bevat die onder andere slijm en bicarbonaat uitscheiden. Deze stoffen zijn onderdeel van het beschermingsmechanisme dat de maagwand tegen het maagzuur beschermt. Het bicarbonaat werkt als buffer waardoor maagzuur en bicarbonaat worden omgezet in water en CO₂. (Flemstrom, 1994) De rol van het slijm is niet precies bekend, maar gedacht wordt dat het een barrière voor het maagzuur vormt. Als gevolg van het netgenoemde beschermingsmechanisme is het glandulaire deel veel beter beschermd dan het non-glandulaire gedeelte. (Frandsen, et al.; Argenzio, 1999; Murray, 1991)

2.2. Risicofactoren van EGUS

In deze paragraaf worden verschillende risicofactoren van EGUS toegelicht, zoals krachtvoer en stress. Ook *Helicobacter pylori* wordt besproken.

Krachtvoer

In de probleembeschrijving werd krachtvoer al genoemd als bekende risicofactor van EGUS. Krachtvoer bevat namelijk meer koolhydraten dan ruwvoer. In de maag worden de koolhydraten door de daar aanwezige bacteriën, bv. *Lactobacillus spp.* gefermenteerd tot vluchtige vetzuren. (Andrews, et al., 2005; Nadeau, et al., 2000) Volgens Nadeau, et al. (2003) zijn pentaanzuur, azijnzuur, propionzuur en boterzuur voorbeelden van vluchtige vetzuren. Uit dit onderzoek is ook gebleken dat vluchtige vetzuren, in het bijzonder pentaanzuur, functionele schade veroorzaken aan het epitheel in het non-

glandulaire deel van de maag. Dit vindt voornamelijk plaats bij een lage pH ($\leq 4,8$) in de maag. In de fundus veroorzaken de vluchtige vetzuren verzuring, ontregeling van het natriumtransport, zwelling, een ontstekingsreactie en uiteindelijk zweren. Volgens Luthersson, et al. (2009b) is de kans op EGUS in het non-glandulaire gedeelte van de maag 2,4 keer groter bij het voeren van meer dan 1 gram zetmeel/kg lichaamsgewicht.

Speekselproductie

Ellis (2004) schreef dat een paard bij het eten van krachtvoer veel minder speeksel produceert: één liter tegenover drieënhalf liter bij het eten van ruwvoer. Dit speeksel helpt het maagzuur te bufferen. De conclusie kan worden getrokken dat bij het eten van krachtvoer het maagzuur minder goed gebufferd kan worden dan bij het eten van ruwvoer.

Stress

Een risicofactor/oorzaak voor EGUS waar nog discussie over bestaat is stress. Andrews en Nadeau (1999) vonden dat cortisol, ook wel bekend als het stresshormoon, de aanmaak van prostaglandine kan remmen. Prostaglandine stimuleert op zijn beurt de secretie van slijm, bicarbonaat en de bloedtoevoer van het glandulaire maagwandepitheel. Dit zijn beschermingsmechanismen van de maagwand tegen het maagzuur, minder prostaglandine kan leiden tot een verminderde werking van deze beschermingsmechanismen. Zo kan stress leiden tot een grotere kans op maagwandaantasting, echter tijdens studies, uitgevoerd door Irvine en Alexander (1992) en Furr, Murray en Ferguson (1992) bij racepaarden en weidepaarden, werd er geen significant verschil gevonden in de hoeveelheid cortisol in het serum tussen beide groepen. Dit terwijl van racepaarden over het algemeen wordt gedacht dat zij veel stress ondervinden. Furr, et al. (1992) hebben onderzoek gedaan naar het effect van stress op verschillende hormonen en het ontstaan van EGUS bij veulens. Deze veulens ondervonden lichamelijke stress als gevolg van ziekte. Het bleek dat de locatie van laesies in de maag significant afweek van de locaties van laesies bij normale veulens. Laesies werden vaker gezien in het glandulaire maagwandepitheel dan bij normale veulens. De frequentie van laesies in het non-glandulaire maagwandepitheel was niet anders dan eerder gerapporteerd. Volgens de onderzoekers gaf dit aan dat stress weinig invloed had op de ontwikkeling van laesies in het non-glandulaire maagwandepitheel.

Vasten

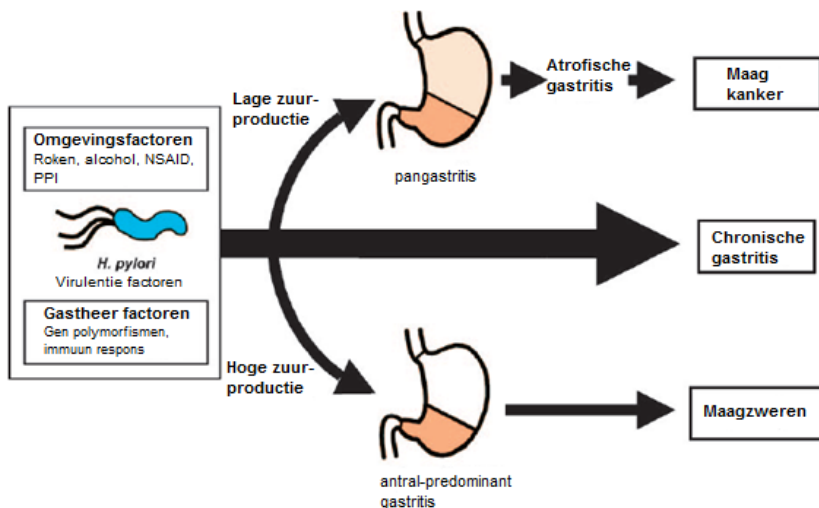
Een paard produceert continu maagzuur. (Andrews, et al. 2005) Dit zorgt voor een zeer lage pH van 1,5 – 4,0 in de pylorus, rondom de margo plicatus is de pH 3 – 6. Omdat er in het non-glandulaire deel geen maagzuur uitgescheiden wordt is de pH hier ongeveer neutraal. (Andrews & Nadeau, 1999)

In twee wetenschappelijke onderzoeken (Murray & Grady, 2002; Andrews & Nadeau, 1999) is een verband gelegd tussen vasten als risicofactor van EGUS en de locatie van EGUS. Vasten wordt in verband gebracht met zeer zure omstandigheden in de maag, vanwege de continue productie van maagzuur. De maaginhoud is tijdens het vasten juist vloeibaarder en minder gebufferd. (Murray & Grady, 2002) Dit kan er voor zorgen dat de maaginhoud zich makkelijker verplaatst in de maag en tegen de maagwand 'spettert'. (Luthersson, et al., 2009b) Paarden die >6 uur vastten hadden een grotere kans op maagzweren in het non-glandulaire deel van de maag, vergeleken met paarden die <6 uur vastten. (Luthersson, et al., 2009b; Murray & Grady, 2002) Ook Murray & Grady (2002) en Andrews & Nadeau (1999) legden een verband tussen vasten en het ontstaan van EGUS in het non-glandulaire gedeelte van de maag.

Helicobacter pylori

De bacterie *Helicobacter pylori* is eveneens een mogelijke risicofactor van EGUS. *Helicobacter pylori* is een van de 18 soorten uit het genus *Helicobacter*. Het is een Gram negatieve bacterie (na Gram-kleuring is de bacterie onder een lichtmicroscopie rood), die geen sporen vormt. De bacterie heeft de vorm van spiraal- of S-vormige staafjes met ronde uiteinden. *Helicobacter pylori* is zeer beweeglijk door de 4-6 flagellen die ze bezit. Bekend is dat *Helicobacter pylori* bij mensen verschillende aandoeningen kan veroorzaken zoals zweren in de maag of het duodenum, gastric MALT lymphoma (tumoren in lymfweefsel van de maag) en acute en chronische gastritis. (Veldhuyzen van Zanten, et al., 1999; Kusters, et al., 2006) Hoe *Helicobacter pylori* precies in de menselijke maag terecht komt is onbekend, gedacht wordt dat de overdracht bij nieuwe infecties direct van mens op mens plaatsvindt. Dit kan oraal – oraal, faeces – oraal of beide zijn. *Helicobacter pylori* is namelijk gevonden in speeksel, braaksel, reflux uit de maag en faeces. Voor de verspreiding via besmette faeces is nog geen doorslaggevend bewijs gevonden. Een andere mogelijke bron is besmet voedsel. *Helicobacter pylori* is in staat kort te overleven op bevroren voedsel. Maar gekoppeld aan de extreme gevoeligheid van *Helicobacter pylori* voor zuurstof, tekort aan nutriënten en temperaturen buiten het bereik van 34 tot 40°C, is directe mens op mens overdracht de meest waarschijnlijke besmettingsroute (Kusters, et al. 2006). Eenmaal in de maag leeft *Helicobacter pylori* in het slijm, dicht bij het oppervlak van het maagwandepitheel. Hier veroorzaakt de bacterie (vaak pas na een tijdje) een ontstekingsreactie. Afhankelijk van waar deze ontstekingsreactie ontstaat en of de productie van maagzuur hoog of laag is ontstaan er maagkanker, chronische gastritis of maagzweren. (Kusters, et al., 2006; Schreiber, et al., 2004; Blaser & Atherton, 2004) Figuur 2 laat dit schematisch zien.

Zoals in de Probleembeschrijving geschreven bestaat er bij paarden tegenstrijdig bewijs over of de aanwezigheid van deze bacterie verband heeft met laesies in het maagwandepitheel.



Figuur 2 Schematische weergave van factoren die bijdragen aan de uitkomst van een *Helicobacter pylori* infectie bij mensen (Bron bewerkt naar: Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006)

3. Materiaal & Methode

In dit hoofdstuk wordt omschreven hoe het onderzoek is uitgevoerd, allereerst wordt het onderzoeksontwerp besproken. Daarna volgt een uitgebreide omschrijving van de (onderzoeks)populatie. De dataverzamelmethode, de datapreparatie en daaropvolgend de data-analyse worden als laatste behandeld.

3.1. Onderzoeksontwerp

Om de benodigde gegevens te verzamelen zijn magen van geslachte paarden geopend. Hiervoor is gekozen omdat op deze wijze de gehele maag goed te beoordelen is. Het onderzoekstype is beschrijvend, wat resulteert in een survey-onderzoek om de onderzoeksvragen te kunnen beantwoorden. Bij dit survey-onderzoek is een steekproef getrokken uit een grotere populatie en werden de data binnen één periode verzameld, namelijk in de periode van 24 februari 2015 tot 29 mei 2015. Voor meer informatie over de populatie en de steekproef zie de volgende paragraaf. Er zijn geen interventies in bestaande situaties geweest.

De aan-/afwezigheid van EGUS, gradatie bij aanwezigheid, locatie(s) bij aanwezigheid, de aan-/afwezigheid van *Helicobacter pylori* en de locatie bij aanwezigheid van *Helicobacter pylori* zijn gemeten, waarbij aan elke paardenmaag (de onderzoekseenheid) eenmaal een meting is gedaan.

Dit leverde het onderstaande schematische onderzoeksontwerp op:

	X	t ₁
Groep 1		O ₁

Groep 1: Slachtpaarden

X: moment van slachten

t₁: tijdstip 1

O₁: meting op tijdstip 1

3.2. Onderzoekspopulatie

De paardenmagen waren de onderzoekseenheden in het onderhavige onderzoek, echter de populatie bestaat uit alle paarden in Nederland. Volgens schattingen zijn dit er 300.000 – 500.000. (Hoogeveen & Jager, 2009) De populatie is lastig te beschrijven door de grote diversiteit en het ontbreken van gegevens. Gegevens die wel aanwezig zijn dateren uit verschillende jaren. Geschat wordt dat in 2009/2010 rond de 50.000 manegepaarden in Nederland waren, verder stonden er circa 39.000 paarden op een pension. (CBS, 2013; ZLTO, FNRS, & HAS-Den-Bosch, 2012) Een aantal jaar eerder schatte Koolen (2005) dat er rond de 42.000 fokmerries en 1.250 goedgekeurde dekhengsten waren. In totaal waren er in 2008 circa 60.500 wedstrijdpaarden en -pony's (het aantal pony's was 12.727). (Rust, 2011)

Vanwege de grootte van de populatie was het onmogelijk om bij de gehele populatie gegevens te verzamelen, daarom is er een steekproef getrokken uit de onderzoekspopulatie. Deze bestond uit paarden die voor humane consumptie geslacht worden in een door de Nederlandse Voedsel- en Waren Autoriteit (NVWA) erkend Nederlands slachthuis. Per jaar worden er zo'n 2.500 tot 4.500 eenhoevigen in Nederland geslacht, waarvan een groot deel paarden. (CBS, 2014)

De representativiteit van deze onderzoekspopulatie is onbekend, doordat er geen gegevens voorhanden zijn over de samenstelling hiervan.

De steekproef is getrokken door meerdere slachterijen in de provincie Friesland, Groningen, Noord Holland en Gelderland te benaderen die één of meerdere malen per week paarden slachtten. De provincies zijn gekozen in verband met de afstand tot Hogeschool VHL te Leeuwarden. Uiteindelijk bleek één slachterij in de provincie Groningen twee keer per week meerdere paarden te slachten en bereid te zijn om mee te werken aan dit onderzoek. De metingen zijn gedaan in de periode van 24 februari 2015 tot en met 29 mei 2015. Hierbij zijn totaal 103 magen verzameld. Dit zijn de magen van alle paarden die in deze periode bij deze slachterij geslacht zijn. De samenstelling van de paarden in de steekproef is niet volledig bekend. Aan de slachters is met enige regelmaat gevraagd wat voor paarden er die dag geslacht waren. Hierdoor werd duidelijk dat hier qua leeftijd zowel jonge, volwassen als oudere paarden en pony's bij waren. Daarnaast zijn zowel rijpaarden en paarden die afgekeurd waren voor de sport in de steekproef terecht gekomen. De rassen van de geslachte paarden waren onder andere Fries, Shetlander en KWPN. Exacte aantallen zijn echter onbekend.

3.3. Dataverzamelingsmethoden

De magen werden op de dag van slachten opgehaald bij het slachthuis, afzonderlijk verpakt en gekoeld (in tempexdozen met koelelementen) naar Hogeschool VHL vervoerd. Daar werd elke maag gelabeld met de datum van ophalen, indien er geen mogelijkheid was om de magen direct te beoordelen werden ze opgeslagen in de vriezer bij een temperatuur van -18 °C. Op de dag dat de magen beoordeeld konden worden werden ze langzaam ontdooid in lauwwarm water.

3.3.1. Dataverzamelingsmethode gegevens EGUS

De paardenmagen zijn op Hogeschool VHL beoordeeld op de aan-/afwezigheid van EGUS, de gradatie bij aanwezigheid en de locatie van EGUS bij aanwezigheid. De snijdmethode en de beoordelingscriteria zijn te vinden in 'Bijlage I Protocol beoordeling maag op EGUS'. Dit protocol is aan de hand van een eerder uitgevoerde studie (Husted, et al., 2010) opgesteld.

Scorecriteria

De magen zijn beoordeeld aan de hand van het Practitioner's Simplified (PS) scoresysteem. Hierbij wordt een maag normaliter als één geheel beoordeeld, waarbij een score gegeven wordt op basis van de ernstigste maagwandaantasting die aanwezig is. De criteria van het PS scoresysteem en een voorbeeld worden gegeven in Tabel 1.

Tabel 1 Omschrijving per score PS Scoresysteem, inclusief voorbeelden (Bron omschrijvingen bewerkt naar Andrews, et al., 1999 en bron voorbeelden bewerkt naar ADOBE Veterinary Center, 2012)

Score	Omschrijving	Voorbeeld
0	Intact epitheel (kan lichte roodheid en/of milde verdikking van het stratum corneum hebben)	
1	Eén kleine laesie of kleine laesies op meerdere plaatsen	
2	Eén grote laesie, grote laesies op meerdere plaatsen of uitgebreide oppervlakkige laesies	
3	Uitgebreide (vaak aaneengesloten) laesies met gebieden van zichtbare diepe zweren	

Bij dit onderzoek werden drie afzonderlijke regio's van iedere maag beoordeeld, namelijk: non-glandulaire slijmvlies, glandulaire slijmvlies (bestaande uit corpus, cardia en het antrum) en de margo plicatus. Iedere afzonderlijke regio is gescoord op de ernstigste maagwandaantasting die er aanwezig is, volgens het PS scoresysteem. Daarna bepaalde de hoogste score van de drie afzonderlijke regio's de score voor de maag als één geheel.

Beoordeling door twee personen

Een tweede beoordelaar heeft 30 van de 103 magen twee keer beoordeeld, daarnaast heeft beoordelaar 1 deze magen ook voor een tweede keer beoordeeld. Zo kon bepaald worden of beide personen zowel consistent met zichzelf als met elkaar waren, hierdoor werd de betrouwbaarheid van de metingen te vergroot. Zie 'Datapreparatie' voor meer informatie en de analyses.

3.3.2. Dataverzamelmethode bepaling *Helicobacter pylori*

Omdat dit onderzoek ook de prevalentie van *Helicobacter pylori* wil onderzoeken en daarnaast een relatie aan wil tonen tussen de aanwezigheid van deze bacterie en de aanwezigheid van EGUS zijn er samples genomen van maagzweren (EGUS) en controlesamples van gezond weefsel (geen EGUS). Met de controlesamples die genomen zijn van gezond weefsel wil dit onderzoek aantonen dat *Helicobacter pylori* juist voorkomt op plekken in de maag met maagzweren (EGUS).

Afhankelijk van welke score een maag toegekend werd bij de beoordeling op EGUS waren er twee mogelijkheden voor het nemen van samples voor het bepalen van *Helicobacter pylori*:

Maag zonder EGUS

Indien alle drie de regio's (non-glandulaire slijmvlies, glandulaire slijmvlies en margo plicatus) van een maag beoordeeld werden met score 0 (geen EGUS) dan werd er één controlesample genomen uit elk van deze regio's. Dit leverde in totaal drie controlesamples per maag op.

Maag met EGUS

Indien één of meerdere regio's van een maag beoordeeld werden met score 1, 2 of 3 (wel EGUS) dan was de procedure als volgt:

- Regio beoordeeld met score 1, 2 of 3: één sample van de ernstigste maagzweer aanwezig in deze regio + één controlesample van gezond weefsel (minimaal 5 cm verderop in dezelfde anatomische regio genomen)
- Regio beoordeeld met score 0: één controlesample van gezond weefsel

Nadat de maag beoordeeld was op de aanwezigheid van EGUS werd op de uitgekozen plekken in de maag een sample van ± 1 cm bij 1 cm uitgesneden met een steriele scalpel en vervolgens in een steriel buisje gedaan. Elk buisje werd vervolgens gecodeerd met het nummer van de maag, de afkorting van de regio waaruit het sample genomen was¹ en in het geval van een controlesample de letter C (=controle) (anders geen extra letter). In het geval dat niet direct een *Helicobacter pylori* bepaling gedaan kon worden, werden de (controle)samples bewaard in de vriezer bij een temperatuur van -18 °C.

De *Helicobacter pylori* bepaling is gedaan met behulp van een *Helicobacter pylori* Antigen ELISA kit, ELISA staat voor 'Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay'. Deze test is erg betrouwbaar met een sensitiviteit van 97,7%, specificiteit van 96,3%, Positieve Voorspellende Waarde van 98,8% en een Negatieve Voorspellende Waarde van 92,9%. (Immundiagnostik, 2011) Daarnaast kan deze test uitgevoerd worden met zowel verse samples als samples die ingevroren zijn geweest. Het principe van deze test is dat de *Helicobacter pylori* antigenen uit het (controle)sample worden gebonden aan antistoffen die op de bodem van de *wells* zitten. Antistoffen zijn eiwitten die door het lichaam geproduceerd worden als reactie op antigenen. De antistoffen op de bodem van de *wells* zijn gelabeld, dat wil zeggen dat ze chemisch gekoppeld zijn aan een enzym. Via meerdere tussenstappen ontstond er een kleurstof, hoe meer kleurstof er ontstond hoe meer *Helicobacter pylori* aanwezig was. (Immundiagnostik, 2011)

Het protocol voor deze ELISA test is te vinden in Bijlage II Protocol bepaling *Helicobacter pylori*. In de paragraaf 'Data-analyse' zal worden ingegaan op de analyse van deze gegevens.

3.4. Datapreparatie

Allereerst is alle data ingevoerd in PASW Statistics 22 (SPSS), het codeboek staat in Bijlage III Codeboek SPSS. Ter voorbereiding op de data-analyse zijn de onderstaande variabelen gehercodeerd:

- gradGM (Beoordeling gehele maag op gradatie EGUS door persoon 1, 1^e keer)
- gradNG (Beoordeling non-glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 1, 1^e keer)
- gradGD (Beoordeling glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 1, 1^e keer)
- gradMP (Beoordeling margo plicatus op gradatie EGUS door persoon 1, 1^e keer)

¹ Non-glandulair= NG, Margo Plicatus= MP en Glandulair= G

Deze variabelen hadden de volgende waarden: 0 = gradatie 0, 1 = gradatie 1, 2 = gradatie 2 en 3 = gradatie 3.

Bij het hercoderen is van elk van de hiervoor genoemde variabelen een nieuwe variabele (aanwezigheid van EGUS) met twee waarden gemaakt, namelijk: 0 = geen EGUS en 1 = wel EGUS. Dit wordt schematisch weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2 Te hercoderen variabelen

Te hercoderen variabele	Nieuwe variabele	Waardes te hercoderen variabele => nieuwe variabele
gradGM	egusGM	0 => 0 (= geen EGUS) 1 => 1 (= wel EGUS) 2 => 1 (= wel EGUS) 3 => 1 (= wel EGUS)
gradNG	egusNG	0 => 0 (= geen EGUS) 1 => 1 (= wel EGUS) 2 => 1 (= wel EGUS) 3 => 1 (= wel EGUS)
gradGD	egusGD	0 => 0 (= geen EGUS) 1 => 1 (= wel EGUS) 2 => 1 (= wel EGUS) 3 => 1 (= wel EGUS)
gradMP	egusMP	0 => 0 (= geen EGUS) 1 => 1 (= wel EGUS) 2 => 1 (= wel EGUS) 3 => 1 (= wel EGUS)

Inter- en intra researcher reliability

Met behulp van de 30 magen die door een tweede beoordelaar beoordeeld zijn is de waarde van Cohen's Kappa bepaald. Door middel van deze associatiemaat kan worden aangetoond of de twee beoordelaars consistent met zichzelf en met elkaar zijn. Een waarde van Cohen's Kappa van $\geq 0,9$ duidt op een zeer sterke mate van overeenstemming en wordt acceptabel geacht. (Vocht, 2009)

Voor de beoordeling van een maag op de gradatie van EGUS (=grad) zijn vier variabelen per locatie gecreëerd: 1 staat voor 'beoordeling persoon 1, 1^e keer, 1her is 'beoordeling persoon 1, herhaling. 2 is 'beoordeling persoon 2, 1^e keer' en 2her is 'beoordeling persoon 2, herhaling'. Van al deze variabelen is de mate van overeenstemming bepaald.

Tabel 3 Waarde van Cohen's Kappa $\pm$ standaardfout voor de twee beoordelaars met zichzelf en met elkaar (N=30) (a= beoordelingen die onvoldoende met elkaar overeenstemmen)

	Beoordelaar 1 (1e keer) * Beoordelaar 1 (herhaling)	Beoordelaar 2 (1e keer) * Beoordelaar 2 (herhaling)	Beoordelaar 1 (1e keer) * Beoordelaar 2 (1e keer)
Gradatie gehele maag	0,933 $\pm$ 0,066	1,000 $\pm$ 0,000	0,935 $\pm$ 0,064
Gradatie non-glandulaire deel	1,000 $\pm$ 0,000	1,000 $\pm$ 0,000	0,839 $\pm$ 0,157 a
Gradatie glandulaire deel	0,843 $\pm$ 0,153 a	0,874 $\pm$ 0,124 a	0,873 $\pm$ 0,124 a
Gradatie margo plicatus	1,000 $\pm$ 0,000	1,000 $\pm$ 0,000	1,000 $\pm$ 0,000

Tabel 3 laat zien dat vrijwel alle beoordelingen voldoende met elkaar overeenstemmen (Cohen's Kappa > 0,9). De waarden van de beoordelingen die onvoldoende met elkaar overeenstemden werden als acceptabel beschouwd in verband met de grootte van de standaardfout. Daarnaast werden de waarden <0,9 veroorzaakt door telkens één afwijkende beoordeling. De afwijkende beoordeling waren niet toe te wijzen aan één specifieke maag.

3.5. Data-analyse

In deze paragraaf wordt besproken op welke manier de data is geanalyseerd, hiervoor is gebruik gemaakt van het programma PASW Statistics 22 (SPSS). Voor alle statistische toetsen is een onbetrouwbaarheid van 5% gekozen.

3.5.1. Prevalentie EGUS & *Helicobacter pylori*

De verzamelde data met betrekking de prevalentie van EGUS zijn allereerst verwerkt tot twee frequentietabellen om een overzicht te geven van de prevalentie van de verschillende gradaties bij paarden in Nederland, de eerste frequentietabel geeft een overzicht van de scores voor de gehele maag. In de tweede frequentietabel is dit uitgesplitst per locatie en het totaal van deze locaties. Bij deze frequentietabellen is het betrouwbaarheidsinterval bepaald door gebruik te maken van bootstrapping.

Om te onderzoeken of er significante verschillen waren in de aanwezigheid van EGUS tussen de locaties is allereerst Cochran's Q toets gebruikt. Indien deze toets aangaf dat er inderdaad significante verschillen waren werden paarsgewijze vergelijkingen uitgevoerd met behulp van Cochran's Q toets om te bepalen welk tweetal locaties verschilden.

De hierboven beschreven frequentietabel is niet gecreëerd voor de data met betrekking tot *Helicobacter pylori* omdat er één positief sample is aangetroffen. Dit gold ook voor de statistische analyses.

Met behulp van de Friedman toets is onderzocht of er significante verschillen waren tussen de gradatie van EGUS per locatie. Indien dit het geval was is de Dunn's-Bonferroni toets gebruikt om te bepalen welk tweetal locaties significant verschilden.

3.5.2. Relatie tussen *Helicobacter pylori* en EGUS

De statistische analyses met betrekking tot de relatie tussen *Helicobacter pylori* en de aanwezigheid van EGUS kon niet worden uitgevoerd omdat er in één van de samples *Helicobacter pylori* is aangetroffen.

4. Resultaten

In dit hoofdstuk worden de resultaten van de data-analyses weergegeven, hiermee wordt antwoord gegeven op de gestelde onderzoeksvragen. Bij het verwerken en weergeven van de resultaten is gebruik gemaakt van de beoordeling door persoon 1, 1^e keer.

Resultaten met betrekking tot EGUS

Allereerst zijn de resultaten met betrekking tot de prevalentie van de gradaties van EGUS weergegeven in twee frequentietabellen. Tabel 4 laat de prevalenties van de gradaties EGUS voor de gehele maag zien. Hierbij is er vanuit gegaan dat de score voor de gehele maag gebaseerd is op de ernstigste maagwandaantasting die aanwezig was. Dit betekent dat bij de 14 magen met gradatie 2 het mogelijk is dat zich op locatie één EGUS gradatie twee aanwezig is, en op locatie twee EGUS gradatie 1. Uit Tabel 4 is af te leiden dat 49,5% (95% BI 39,8 – 59,2) van de onderzoekspopulatie geen EGUS had en 50,5% (95% BI 40,8 – 60,2) had wel EGUS.

Tabel 4 Gradaties van EGUS voor de gehele maag (BI= betrouwbaarheidsinterval)

Gradatie	Gehele maag	
	N	Percentage (95% BI)
0 'Intact epitheel (kan lichte roodheid en/of milde verdikking van het stratum corneum hebben)'	51	49,5% (39,8 – 59,2)
1 'Eén kleine laesie of kleine laesies op meerdere plaatsen'	36	35,0% (26,2 – 44,7)
2 'Eén grote laesie, grote laesies op meerdere plaatsen of uitgebreide oppervlakkige laesies'	14	13,6% (6,8 – 21,3)
3 'Uitgebreide (vaak aaneengesloten) laesies met gebieden van zichtbare diepe zweren'	2	1,9% (0,0 – 4,9)
Totaal	103	100%

Tabel 5 geeft een meer gedetailleerd beeld van de prevalentie van de gradaties van EGUS per locatie. Deze tabel laat zien hoe vaak de verschillende locaties beoordeeld zijn met een bepaalde gradatie. Af te leiden is dat 81,6% (95% BI 73,8 – 88,3) van de onderzoekspopulatie geen EGUS heeft in het non-glandulaire deel tegenover 18,4% (95% BI 11,7 – 26,2) die daar wel EGUS heeft. 75,7% (95% BI 66,0 – 84,5) Van de onderzoekspopulatie heeft geen EGUS in het glandulaire deel en 24,3% (95% BI 15,5 – 34,0) heeft wel EGUS in datzelfde gedeelte. Als laatste heeft 71,8% (95% BI 62,1 – 80,6) geen EGUS in de margo plicatus en 28,2% (95% BI 19,4 – 37,9) wel.

Tabel 5 Gradatie van EGUS uitgesplitst naar locatie (BI= betrouwbaarheidsinterval)

Gradatie	Locatie						Totaal	
	Non-glandulair		Glandulair		Margo plicatus			
	Percentage (95% BI)	N	Percentage (95% BI)	N	Percentage (95% BI)	N	Percentage	N
0	81,6% (73,8 – 88,3)	84	75,7% (66,0 – 84,5)	78	71,8% (62,1 – 80,6)	74	76,4	236
1	13,6% (7,8 – 20,4)	14	16,5% (9,7 – 24,3)	17	23,3% (15,5 – 32,0)	24	17,8	55
2	4,8% (1,0 – 8,7)	5	6,8 % (1,9 – 12,6)	7	3,9% (1,0 – 7,8)	4	5,2	16
3	0,0% (0,0 – 0,0)	0	1,0% (0,0 – 2,9)	1	1,0% (0,0 – 2,9)	1	0,6	2
Totaal	100	103	100	103	100	103	100	309

Met behulp van Cochran's Q Toets is onderzocht of er significante verschillen waren in de aanwezigheid van EGUS tussen de verschillende locaties in de maag. Er is geen significant verschil aangetoond tussen de drie locaties met $\chi^2 (2) = 3,102$, $p = 0,212$.

De Friedman toets liet vervolgens zien dat er ook geen significant verschil is in de gradatie van EGUS tussen de verschillende locaties met $\chi^2 (2) = 3,192$, $p = 0,203$.

Resultaten met betrekking tot *Helicobacter pylori*

Vervolgens wordt gekeken naar de resultaten met betrekking tot *Helicobacter pylori*. Van de 292 samples die op *Helicobacter pylori* getest zijn was één sample positief. Dit sample werd genomen uit de margo plicatus, waar geen EGUS aanwezig was in deze locatie. In het non-glandulaire deel van deze maag werd wel EGUS aangetroffen, maar de samples die uit het non-glandulaire deel werden genomen testten negatief.

Tweemaal werd een waarde gevonden waarbij het sample opnieuw moest worden geanalyseerd, deze twee samples testten daarbij negatief. Er is voor gekozen om deze samples als negatief te beschouwen.

Omdat *Helicobacter pylori* eenmaal aangetoond is kan er geen uitspraak worden gedaan over de relatie tussen de aanwezigheid van *Helicobacter pylori* en EGUS bij zowel de onderzoekspopulatie als bij paarden in Nederland.

5. Discussie

In dit hoofdstuk wordt allereerst ingegaan op de vergelijking van de resultaten met betrekking tot de prevalentie van EGUS met de resultaten uit andere wetenschappelijke onderzoeken. In tweede paragraaf worden resultaten met betrekking tot de aanwezigheid van *Helicobacter pylori* bediscussieerd. De derde paragraaf gaat in op de vergelijking tussen de resultaten van het onderhavige onderzoek en de resultaten uit ander wetenschappelijk onderzoek voor wat betreft de relatie tussen EGUS en *Helicobacter pylori*. In de laatste paragraaf worden enkele opvallende resultaten uit dit onderzoek behandeld.

5.1. Prevalentie EGUS

In dit onderzoek zijn de volgende resultaten gevonden: 18,4% (95% BI 11,7 – 26,2) had EGUS in het non-glandulaire deel, 24,3% (95% BI 15,5 – 34,0) had EGUS in het glandulaire deel en 28,2% (95% BI 19,4 – 37,9) had EGUS bij de margo plicatus.

Prevalentie van EGUS per locatie

De verschillen tussen deze drie locaties waren niet significant, dit werd bij aanvang van het onderzoek wel verwacht omdat het glandulaire deel van de maag veel beter beschermd is tegen het maagzuur dan het non-glandulaire gedeelte. (Frandsen, et al.; Argenzio, 1999; Murray, 1991) Daarnaast komt EGUS volgens dierenartsen vaker voor in het non-glandulaire deel van de maag. (Persoonlijke communicatie Marco de Bruijn, april 2014) Een steekproefgrootte die onvoldoende was kan hier een verklaring voor zijn, een verschil van bijna 10% tussen het non-glandulaire deel en de margo plicatus werd namelijk wel relevant geacht.

Als gekeken wordt in andere onderzoeken naar de prevalentie van EGUS op verschillende locaties in de maag bij slachtpaarden valt op dat de percentages uit het onderhavige onderzoek lager zijn dan in andere onderzoeken. Sweeney (1990) onderzocht 614 magen van geslachte paarden in Ierland onder andere op de aanwezigheid van EGUS, hij vond dat er in 28,2% van de magen (95% BI 24,9 – 31,9) EGUS aanwezig was in het non-glandulaire deel. Met behulp van Fisher's Exact Toets werd geen significant verschil aangetoond.

Bij dit onderzoek werden bij 25/103 (24,3%, 95% BI 17,5 – 39,7) paarden laesies in het glandulaire deel van de maag gevonden. Husted, et al. (2010) deden een studie naar de prevalentie van EGUS in het glandulaire gedeelte van de magen van 63 slachtpaarden. Zij vonden dat 36 van de 63 magen (57,1%, , 95% BI 44,4 – 69,8) laesies hadden. Het verschil tussen deze onderzoeken kan verklaard worden doordat Husted, et. al. gebruik gemaakt hebben van een ander scoresysteem dan in het onderhavige onderzoek. Zij kozen ervoor de laesies in groepen in te delen op basis van het type laesie. Er zijn dus niet dezelfde criteria gehanteerd voor het beoordelen op wel of geen EGUS, hierdoor kan het zijn dat Husted, et. al. meer magen beoordeelden met 'wel EGUS'. Met behulp van Fisher's Exact Toets is aangetoond dat deze resultaten significant van elkaar verschillen ($p = 0,011$)

Vergelijkbare onderzoeken naar de prevalentie van EGUS bij de margo plicatus bij slachtpaarden zijn niet door de auteur gevonden. In de hierboven genoemde literatuur werd niets over de prevalentie van EGUS bij de margo plicatus vermeld.

Prevalentie van de gradatie van EGUS

In het onderhavige onderzoek kwam gradatie 0 (geen EGUS) het vaakst voor, gevolgd door gradatie 1. Gradatie 2 en gradatie 3 kwamen veel minder vaak voor in vergelijking met gradatie 1. Het geven van

een verklaring hiervoor is moeilijk omdat er geen inzicht was in de achtergrond van de onderzoekspopulatie. Zo was er bijvoorbeeld geen informatie bekend over de risicofactoren waaraan deze paarden bloot stonden en die de ontwikkeling van EGUS beïnvloedden.

Prevalentie van EGUS bij verschillende ‘typen’ paarden

Over de gehele maag gezien heeft 49,5% van de onderzoekspopulatie geen EGUS en 50,5% heeft wel EGUS. Het verschil met de percentages van de afzonderlijke locaties is te verklaren doordat de 49,5% van de onderzoekspopulatie die geen EGUS heeft bestaat uit paarden die in geen enkele locatie EGUS hebben. De 50,5% van de onderzoekspopulatie die wel EGUS heeft, heeft dat in één of meerdere locaties.

In de Inleiding zijn de prevalenties van EGUS bij veulens, race-, sport-, recreatie-, manege- en showpaarden beschreven. Het is lastig de gevonden prevalentie van EGUS uit het onderhavige onderzoek met deze wetenschappelijke onderzoeken te vergelijken, omdat de onderzoekspopulatie uit het onderhavige onderzoek een diverse samenstelling heeft. Navraag bij de slachterij leerde dat qua leeftijd zowel jonge, volwassen als oudere paarden en pony's in de steekproef terecht zijn gekomen. Daarnaast zijn verschillende ‘typen’ paarden (bv. rijpaarden als paarden die afgekeurd waren voor de sport) in de steekproef terecht gekomen.

Echter het gevonden percentage in het onderhavige onderzoek ligt lager dan in andere onderzoeken. Een verklaring hiervoor is de diverse samenstelling van de onderzoekspopulatie van het onderhavige onderzoek en het gegeven dat andere onderzoeken (Mitchell, 2003; Vatistas, et al., 1999; Murray, Grodinsky, Anderson, Radue, & Schmidt, 1989) zich richtten op een specifiek ‘type’ paard. Bijvoorbeeld racepaarden, sportpaarden en recreatiepaarden.

Om met een betrouwbaarheidsniveau van 95% en een foutmarge van 6% een uitspraak te kunnen doen over de prevalentie van EGUS bij paarden in Nederland was een steekproefgrootte van N= 267 vereist. Uiteindelijk is de steekproefgrootte N=103 geworden, waardoor met onvoldoende betrouwbaarheid een uitspraak kan worden gedaan over de prevalentie van EGUS bij paarden in Nederland.

5.2. Prevalentie *Helicobacter pylori*

Bij elke uitgevoerde ELISA test waren zowel de positieve als de negatieve controle correct, wat aangaf dat de test correct was uitgevoerd. Omdat deze ELISA test is ontwikkeld voor het aantonen van *Helicobacter pylori* in feces, is ook onderzocht of deze test ook bruikbaar was bij bipten. Dit is gedaan door een zeer kleine hoeveelheid van de positieve controle (25 µl en 50 µl) op twee samples te pipetteren. Deze samples zijn verder volgens protocol verwerkt en geanalyseerd. Beide samples waren positief wat aangeeft dat, indien er *Helicobacter pylori* in de maag aanwezig was, deze aangetoond kan worden. In het onderhavige onderzoek is slechts eenmaal *Helicobacter pylori* aangetroffen, de huidige verwachting is dat *Helicobacter pylori* zeer weinig bij paarden in Nederland voorkomt. Bij aanvang van dit onderzoek was de verwachting dat *Helicobacter pylori* veel vaker zou voorkomen dan nu het geval blijkt. Dit kan veroorzaakt worden doordat *Helicobacter pylori* een zeer gevoelige bacterie is. Bij de mens leeft de bacterie in het slijm (dichtbij het oppervlak van het maagwandepitheel). (Kusters, van Vliet, & Kuipers, 2006) Als dit ook het geval is in een paardenmaag dan zijn de omstandigheden in en rondom het slijm wellicht ongeschikt (bv. langdurig te zuur) voor *Helicobacter pylori*. Een paard produceert namelijk continu maagzuur. Dit vindt plaats in het glandulaire gedeelte waar ook de slijmlaag zich bevindt. (Andrews, et al., 2005) Ook is *Helicobacter pylori* zeer gevoelig voor zuurstof en

een tekort aan nutriënten (Kusters, et al. 2006), mede hierdoor overleeft de bacterie het wellicht niet lang genoeg in een paardenmaag om zich te vermenigvuldigen.

5.3. Relatie tussen EGUS & *Helicobacter pylori*

Zoals in de probleembeschrijving is geschreven bestaat er bij paarden tegenstrijdig bewijs over de relatie tussen de aanwezigheid van *Helicobacter pylori* en EGUS. Door Dimola en Caruso (1999) werd wel *Helicobacter pylori* in paardenmagen gevonden, ook legden zij een verband tussen deze bacterie en een chronische ontstekingsreactie. Daarentegen werd in twee andere studies (Husted, Jensen, Olsen, & Molbak, 2010; Johnson, et al., 1994) geen verband gevonden tussen laesies en de aanwezigheid van bacteriën. Het onderhavige onderzoek duidt er op dat *Helicobacter pylori* weinig bij paarden voorkomt. Over de precieze relatie tussen *Helicobacter pylori* en EGUS bij paarden kan aan de hand van het onderhavige onderzoek geen uitspraak worden gedaan. Op basis van eerdere onderzoeken en dit onderzoek samen is de verwachting dat *Helicobacter pylori* geen risicofactor is voor het ontstaan van EGUS.

5.4. Opvallende resultaten



Figuur 4 Paardenmaag met gele vloeistof (Fotografie: Sanne de Rijk)

Bij het beoordelen van de magen zijn er, naast EGUS, een aantal interessante resultaten gevonden. Zo hadden verreweg de meeste paarden ruwvoer (hooi/kuil) gegeten voordat ze geslacht werden. Slechts een aantal paarden had iets anders gegeten zoals vers gras, krachtvoer (brok) of muesli. Exacte cijfers zijn hier echter niet van bekend. Deze verschillende voedingsmiddelen waren zeer duidelijk van elkaar te onderscheiden. Gras was veel groener dan hooi/kuil en bijvoorbeeld brok was in de maag een dikke brij.

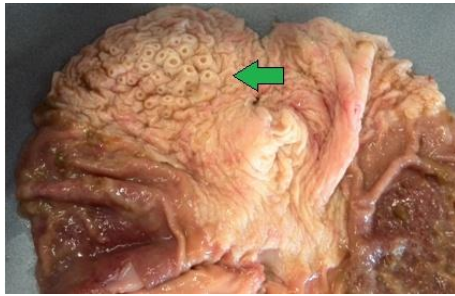
Enkele paarden hadden niets gegeten voordat ze geslacht werden, in de magen van deze paarden werd geen voedsel aangetroffen of slechts enkele sprietjes hooi/kuil. Opvallend was dat er in enkele van deze magen een gele vloeistof aanwezig was. In Figuur 4 is deze gele vloeistof te zien, volgens Argenzio (1999) wordt dit voornamelijk gezien bij vastende paarden. Dit zou kunnen wijzen op een reflux van gal (Frandsen, et al. 2009) vanuit het duodenum naar de maag van het paard.

Naast maagzweren werden ook regelmatig roze larven van ongeveer 1,5 cm tot 2 cm aangetroffen die zich vast hadden gebeten in de maagwand. Vermoedelijk zijn dit larven van de Paardenhorzel (*Gasterophilus intestinalis*). (University of Florida | IFAS, 2007) Figuur 5 geeft een voorbeeld van hoe deze larven eruit zien. Voor het beoordelen van de maag werden deze larven voorzichtig losgehaald. Figuur 6 laat zien hoe de maagwand er uit ziet nadat de larven zijn losgehaald, de plekken waar ze zich vastgebeten hadden zijn nog duidelijk te zien (groene pijl). Deze larven zaten vrijwel altijd in het non-glandulaire gedeelte (net boven de margo plicatus). Een enkele keer is het voorgekomen dat de larven in het glandulaire



Figuur 5 Larven in het non-glandulaire gedeelte van een paardenmaag (Fotografie: Sanne de Rijk)

gedeelte werden aangetroffen. In dit onderzoek werd bij 32% van de magen deze larven aangetroffen.



Figuur 6 Beeld na loshalen larven uit paardenmaag (Fotografie: Sanne de Rijk)

Het blijkt dat deze larven vaker in paardenmagen zijn aangetroffen, Borgsteede & van Beek (1998) vonden al dat 41,4% van de 70 geslachte paarden die zij onderzochten *Gasterophilus intestinalis* in de maag hadden. Hierbij zagen zij geen seizoensgebonden patroon of invloed van de parasieten op de conditie van de paarden. Sweeney (1990) vond een vergelijkbaar percentage; namelijk 43% (197/458). Dit zijn hogere percentages dan de 32% die gevonden is in het onderhavige onderzoek. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de twee genoemde onderzoeken jaren terug zijn uitgevoerd, sinds deze tijd kan het zo zijn dat paardeneigenaren/-

houders beter of vaker antiparasitaire middelen toedienen aan paarden. Of deze antiparasitaire middelen kunnen verbeterd zijn waardoor de paardenhorzellarven beter bestreden worden.

Daarnaast was er één paardenmaag die gevuld was met bloed. Aan deze maag was tijdens het beoordelen niets abnormaals te zien, ook geen EGUS. Navraag bij de slachterij leerde dat dit paard een scheur in de slokdarm had, hoogstwaarschijnlijk is als gevolg hiervan de maag vol met bloed gestroomd.

6. Conclusie

In dit hoofdstuk wordt antwoord gegeven op de gestelde onderzoeks- en bijbehorende deelvragen.

Prevalentie van EGUS

EGUS is bij de onderzoekspopulatie in alle drie de locaties in de maag gevonden. In het non-glandulaire deel heeft 18,4% EGUS, voor het glandulaire deel is dat 24,3% en bij de margo plicatus heeft 28,2% EGUS. Over de gehele maag gezien heeft 50,5% EGUS.

De gradaties van EGUS komen in de volgende mate bij de onderzoekspopulatie voor: gradatie 0: 76,4%, gradatie 1: 17,8%, gradatie 2: 5,2% en gradatie 3: 0,6%. Deze cijfers zijn het gemiddelde van de drie locaties in de maag.

Als de gegevens uitgesplitst worden naar locatie en naar gradatie ontstaat het volgende beeld over de onderzoekspopulatie:

- Non-glandulair= gradatie 0: 81,6%, gradatie 1: 13,6%, gradatie 2: 4,8% en gradatie 3: 0,0%
- Glandulair= gradatie 0: 75,7%, gradatie 1: 16,5%, gradatie 2: 6,8% en gradatie 3: 1,0%
- Margo plicatus= gradatie 0: 71,8%, gradatie 1: 23,3%, gradatie 2: 3,9% en gradatie 3: 1,0%

Over de prevalentie van EGUS en de gradaties van EGUS bij paarden in Nederland kan met onvoldoende betrouwbaarheid een uitspraak worden gedaan, omdat de steekproefgrootte hiervoor onvoldoende was.

Prevalentie van *Helicobacter pylori* en de relatie met EGUS bij paarden

Gezien de grootte van de onderzoekspopulatie kan geen uitspraak worden over de prevalentie van *Helicobacter pylori* bij paarden in Nederland. De verwachting is dat *Helicobacter pylori* zeer weinig bij paarden in Nederland voorkomt.

Ook kan er geen uitspraak worden gedaan over de relatie tussen *Helicobacter pylori* en EGUS, wegens het slechts eenmaal aantonen van *Helicobacter pylori* in dit onderzoek. De verwachting is dat *Helicobacter pylori* geen risicofactor is bij het ontstaan van EGUS.

7. Aanbevelingen

Op basis van dit onderzoek kan gezegd worden dat EGUS niet alleen in het buitenland voorkomt. Aanpassingen in de sector zijn nodig om deze aandoening in de toekomst minder voor te laten komen. Paardeneigenaren/-houders kunnen hierop inspelen door het management van hun paard(en) aan te passen. Een goed begin kan gemaakt worden bij het aanpassen van het voermanagement. Bijvoorbeeld door meer ruwvoer en minder krachtvoer te verstrekken, daarnaast kunnen zij naar passende oplossingen zoeken om de tijd dat hun paard(en) vast(en) te verminderen. Ook zijn er risicofactoren voor het ontstaan van EGUS die niet in dit onderzoek genoemd zijn, waar paardeneigenaren/-houders op in kunnen spelen. Hier kan een voorlichtingsrol liggen voor dierenartsen of hippische organisaties, omdat zij makkelijker toegang hebben tot wetenschappelijke literatuur.

Omdat op basis van het onderhavige onderzoek geen uitspraak gedaan kan worden over de prevalentie van EGUS en de verschillende gradaties van EGUS bij alle paarden in Nederland is vervolgonderzoek nodig. Idealiter zou dit een groter opgezet onderzoek zijn wat zich richt op paarden die voor verschillende doeleinden worden gebruikt (bv. recreatie-, sport- en weidepaarden). Dit kan in samenwerking met dierenartsen die maagscopieën uitvoeren gedaan worden, in combinatie met onderzoek bij slachtpaarden. Ook is een vervolgonderzoek naar knelpunten op (bijvoorbeeld) het gebied van voermanagement, huisvesting en training(sintensiteit) bij verschillende 'typen' paarden in Nederland. Zo kan onderzocht worden op welk gebied de meeste knelpunten liggen en kan er tegelijkertijd gekeken worden naar praktische oplossingen voor paardeneigenaren/-houders. Dit onderzoek kan op diverse soorten paardenhouderijen, in de praktijk, uitgevoerd worden.

Indien er in de toekomst nog een onderzoek uitgevoerd wordt waarbij de magen van slachtpaarden gebruikt worden, dan wordt aangeraden om deze magen te beoordelen als ze nog vers zijn. Vers wil zeggen dat de magen nog niet ingevroren zijn geweest. Het proces van het invriezen en weer ontdooien is namelijk tijdrovend en omslachtig. Het schoonspoelen van een maag vergroot de beoordeelbaarheid, dit is alleen mogelijk indien er geen samples of iets dergelijks genomen hoeven te worden. Anders is het mogelijk dat onderzoeksmateriaal zoals bacteriën weggespoeld worden.

Bronvermelding

- ADOBE Veterinary Center. (2012, Mei 14). *Reduce Your Horse's Gastric Ulcer Risk*. Opgeroepen op Juni 10, 2014, van Adobe Veterinary Center: <http://adobe veterinarycenter.com>
- Andrews, F. M., & Nadeau, J. A. (1999). Clinical syndromes of gastric ulceration in foals and mature horses. *Equine Veterinary Journal Supplement*, 29, 30-33.
- Andrews, F. M., Buchanan, B. R., Elliot, S. B., Clariday, N. A., & Edwards, L. H. (2005). Gastric ulcers in horses. *American Society of Animal Sciences*, E18-E21.
- Andrews, F. M., Reinemeyer, C. R., McCracken, M. D., Blackford, J. T., Nadeau, J. A., Saabye, L., . . . Saxton, A. (2002). Comparison of endoscopic, necropsy and histology scoring of equine gastric ulcers. *Equine Veterinary Journal*, 34, 475-478.
- Andrews, F. M., Sifferman, R. L., Bernard, W., Hughes, F. H., Holste, J. E., Daurio, C. P., . . . Cox, J. L. (1999). Efficacy of Omeprazole paste in the treatment and prevention of gastric ulcers in horses. *Equine Veterinary Journal Supplement*, 29, 81-86.
- Argenzio, R. A. (1999). Comparative pathophysiology of nonglandular ulcer disease: a review and experimental studies. *Equine Veterinary Journal Supplement*, 29, 19-23.
- Blaser, M. J., & Atherton, J. C. (2004). Helicobacter pylori persistence: biology and disease. *Journal of Clinical Investigation*, 113(3), 321-333.
- Borgsteede, F. H., & Beek, G. v. (1998). Parasites of stomach and small intestine of 70 horses slaughtered in the Netherlands. *The Veterinary Quarterly*, 20(1), 31-34.
- Breukink, H. J. (2007). *Van ademhaling tot zenuwstelsel* (4e ed.). Utrecht: Forte Uitgevers.
- CBS. (2013, Juni 7). *Maneges, sport-, zeil- en surfscholen*. Opgeroepen op December 9, 2014, van Statline: www.statline.cbs.nl
- CBS. (2014, November 28). *Vleesproductie; aantal slachtingen en geslacht gewicht per diersoort*. Opgeroepen op December 10, 2014, van Statline: www.statline.cbs.nl
- Contreras, M., Morales, A., Garcia-Amado, M. A., De Vera, M., Bermudez, V., & Gueneau, P. (2007). Detection of Helicobacter-lik DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 553-557.
- de Vocht, A. (2010). *Basishandboek SPSS 17* (Tweede druk ed.). Utrecht: Bijleveld Press.
- Dimola, S., & Caruso, M. L. (1999). Helicobacter pylori in animals affecting the human habitat through the food chain. *Anticancer Research*, 19, 3889-3894.
- Ellis, A. (2004). *Paard en Voer*. Zutphen: Roodbont Uitgeverij.
- Flemstrom, G. (1994). *Physiology of the Gastrointestinal Tract* (3e ed.). (L. R. Johnson, Red.) New York: Raven Press.
- Frandsen, R. D., Wilke, W. L., & Fails, A. D. (2009). *Anatomy and physiology of farm animals* (7e ed.). Ames: Wiley-Blackwell.
- Furr, M. O., Murray, M. J., & Ferguson, D. C. (1992). The effects of stress on gastric ulceration, T3, T4, reverse T3 and cortisol in neonatal foals. *Equine Veterinary Journal*, 24(1), 37-40.

- Hoogeveen, M., & Jager, J. (2009). *Kengetallen paardenhouderij: lastig door grote diversiteit*. LEI WageningenUR.
- Husted, L., Jensen, T. K., Olsen, S. N., & Molbak, L. (2010). Examination of equine glandular stomach lesions for bacteria, including *Helicobacter* spp by fluorescence in situ hybridisation. *BMC Microbiology*, 10(84).
- Immundiagnostik. (2011). *Helicobacter pylori Antigen ELISA Kit*. Bensheim: Immundiagnostik AG. Opgehaald van Immundiagnostik.
- Irvine, C. H., & Alexander, S. L. (1992). Factors affecting the circadian rhythm in plasma cortisol concentrations in the horse. *Domestic Animal Endocrinology*, 11, 227-238.
- Johnson, B., Carlson, G. P., Vatistas, N. J., Snyder, J. R., Lloyd, K., & Koobs, J. (1994). Investigation of the number and location of gastric ulcerations in horses in race training submitted to the California Racehorse postmortem program. *Proceedings of the 40th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*, 123-124.
- Jonsson, H., & Egenvall, A. (2006). Prevalence of gastric ulceration in Swedish Standardbreds in race-training. *Equine Veterinary Journal*, 38, 209-2013.
- Journalinks. (z.j.). *Bereken de steekproefgrootte*. Opgeroepen op December 14, 2014, van Journalinks: www.journalinks.be
- Koolen, J. T. (2005, April 4). Het paard als nieuwe economische drager van het platteland. Voordracht tijdens het Nationaal Paardencongres 'Paard en plattelandontwikkeling'. Utrecht: Sectorraad Oaarden.
- Kusters, J. G., van Vliet, A. H., & Kuipers, E. J. (2006, Juli). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 449-490.
- Lewis, L. D. (1995). *Equine clinical nutrition*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Luthersson, N., Hou Nielsen, K., Harris, P., & Parkin, T. D. (2009). Risk factors associated with equine gastric ulceration syndrom (EGUS) in 201 horses in Denmark. *Equine Veterinary Journal*, 41, 625-630.
- Luthersson, N., Hou Nielsen, K., Harris, P., & Parkin, T. D. (2009a). The prevalence and anatomical distribution of equine gastric ulceration syndrome (EGUS) in 201 horses in Denmark. *Equine Veterinary Journal*, 41, 619-624.
- Luthersson, N., Hou Nielsen, K., Harris, P., & Parkin, T. D. (2009b). Risk factors associated with equine gastric ulceration syndrom (EGUS) in 201 horses in Denmark. *Equine Veterinary Journal*, 41, 625-630.
- Mitchell, R. D. (2003, Februari). Ulcers in performance horses a widespread probleme. *Horse Sport*, 20-21.
- Murray, M. J. (1989). Gastroendoscopic appearance of gastric lesions in foals: 94 cases (1987-1988). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195, 1135-1138.
- Murray, M. J. (1991). The pathogenesis and prevalence of gastric ulceration in foals and horses. *Vet. Med.*, 815-819.
- Murray, M. J. (1994). Gastric ulcers in adult horses. *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 16, 792-794, 797.

- Murray, M. J., & Grady, T. C. (2002). The effect of a pectin-lecithin complex on prevention of gastric mucosal lesions induced by feed deprivation in ponies. *Equine Veterinary Journal*, 34, 195-198.
- Murray, M. J., & Grady, T. C. (2002). The effect of a pectin-lecithin complex on prevention of gastric mucosal lesions induced by feed deprivation in ponies. *Equine Veterinary Journal*, 34, 195-198.
- Murray, M. J., Grodinsky, C., Anderson, C. W., Radue, P. F., & Schmidt, G. R. (1989). Gastric ulcers in horses: a comparison of endoscopic findings in horses with and without clinical signs. *Equine Veterinary Journal*, 21, 68-72.
- Mutsaers, J. A., Jansen, C. L., Knecht, N. M., & Doornbos, L. (2001). *Bacteriologie voor laboratorium en kliniek 2* (vierde, herziene druk ed.). Houten/Diegem: Bohn Stafleu Van Loghum.
- Nadeau, J. A., Andrews, F. M., Mathew, A. G., Argenzio, R. A., Blackford, J. T., Sohtell, M., & Saxton, A. M. (2000). Evaluation of diet as a cause of gastric ulcers in horses. *American Journal of Veterinary Research*, 61, 784-790.
- Nadeau, J. A., Andrews, F. M., Patton, C. S., Argenzio, R. A., Mathew, A. G., & Saxton, A. M. (2003). Effects of hydrochloric, valeric, and other volatile fatty acids on pathogenesis of ulcers in the nonglandular portion of the stomach of horses. *American Journal of Veterinary Research*, 64(4), 413-417.
- Novum. (2012, Oktober 26). *Paardenoverschot leidt tot recordslachting*. Opgeroepen op December 12, 2014, van NU.nl: www.nu.nl
- NVWA. (z.j.). *Erkenningen, vergunningen, registraties. Sectie 1: vlees van gedomesticeerde hoefdieren*. Opgeroepen op Juli 1, 2014, van De NVWA: www.vwa.nl
- Rust, A. (2011, november 22). Kernsportplan Hippische Sporten 2011-2016 in Provincie Noord-Brabant. Noord-Brabant.
- Schreiber, S., Konradt, M., Groll, C., Scheid, P., Hanauer, G., Werling, H. O., . . . Suerbaum, S. (2004). The spatial orientation of *Helicobacter pylori* in the gastric mucus. *PNAS*, 101(14), 5024-5029.
- Solnick, J. V., & Vandamme, P. (2001). *Helicobacter pylori: Physiology and Genetics*. Washington DC: ASM Press.
- Sweeney, H. J. (1990). The prevalence and pathogenicity of *Gasterophilus intestinalis* larvae in horses in Ireland. *Irish Veterinary Journal*, 43(3), 67-73.
- The Equine Gastric Ulcer Council. (1999). Tutorial article: recommendations for the diagnosis and treatment of equine gastric ulcer syndrome (EGUS). *Equine Veterinary Education*, 11(5), 262-272.
- TNS Nipo. (2015). *Statistische tools*. Opgeroepen op Januari 28, 2015, van TNS Nipo: www.tns-nipo.nl
- University of Florida | IFAS. (2007, December). *Gasterophilus intestinalis*. Opgehaald van Entomology & Nematology: http://entnemdept.ufl.edu/creatures/livestock/horse_bot_fly.htm
- Vatistas, N. J., Sifferman, R. L., Holste, J., Cox, J. L., Pinalto, G., & Schultz, K. T. (1999). Induction and maintenance of gastric ulceration in horses in simulated race training. *Equine Veterinary Journal*, 29, 40-44.
- Vatistas, N. J., Snyder, J. R., Carlson, G., Johnson, B., Arthur, R. M., Thurmond, M., & Lloyd, K. C. (1994). Epidemiological study of gastric ulceration in the Thoroughbred race horse: 202 horses 1992-1993. *Proceedings American Association of Equine Practitioners*, 40, 125-126.

- Veldhuyzen van Zanten, S. O., Dixon, M. F., & Lee, A. (1999). The gastric transitional zones: neglected links between gastroduodenal pathology and *Helicobacter* ecology. *Gastroenterology*, 116, 1217-1229.
- Vocht, d. A. (2009). *Basishandboek SPSS 17; SPSS Statistics*. Utrecht: Bijleveld Press.
- ZLTO, FNRS, & HAS-Den-Bosch. (2012). *Ondernemersmonitor 2012, professionele passie voor paarden*. 's Hertogenbosch: HAS Den Bosch.

Bijlage I Protocol beoordeling maag op EGUS

Protocol beoordeling maag op EGUS

- 1) Draag handschoenen en een labjas tijdens het werken met de magen
- 2) Leg de maag op een vlakke ondergrond en schrijf op een label het nummer van de maag
- 3) Snijd de maag langs de greater curvature open
- 4) Verwijder de maaginhoud zo goed mogelijk (niet naspoelen met leidingwater i.v.m. *Helicobacter pylori* bepaling) en doe deze in een plastic zak.
- 5) Maak een foto van de gehele maag met het label duidelijk leesbaar in beeld, zorg dat het fototoestel zich recht boven de maag bevindt
- 6) Maak een foto van het non-glandulaire deel van de maag met het label duidelijk in beeld, zorg dat het fototoestel zich recht boven de maag bevindt
- 7) Maak een foto van het glandulaire deel van de maag met het label duidelijk in beeld, zorg dat het fototoestel zich recht boven de maag bevindt
- 8) Scoor het non-glandulaire gedeelte, glandulaire gedeelte en de margo plicatus op EGUS, de hoogste score bepaalt de score voor de gehele maag. Doe dit aan de hand van de onderstaande Tabel 6. Noteer dit op het dataverzamelingsformulier.
- 9) De maag wordt later nogmaals door een tweede persoon op EGUS beoordeeld, dit wordt gedaan met behulp van foto's. Ook hier worden de onderstaande criteria voor de aanwezigheid en gradatie EGUS gebruikt. Noteer ook dit op het dataverzamelingsformulier
- 10) Zie eerst Bijlage II Protocol bepaling *Helicobacter pylori* voordat de maag afgevoerd kan worden.

Tabel 6 Criteria per score PS Scoresysteem, inclusief voorbeelden (Bron criteria bewerkt naar Andrews, et al., 1999 en bron voorbeelden bewerkt naar ADOBE Veterinary Center, 2012)

Score	Omschrijving	Voorbeeld
0 (geen EGUS)	Intact epitheel (kan lichte roodheid en/of milde verdikking van het stratum corneum hebben)	
1 (wel EGUS)	Eén kleine laesie of kleine laesies op meerdere plaatsen	
2 (wel EGUS)	Eén grote laesie, grote laesies op meerdere plaatsen of uitgebreide oppervlakkige laesies	
3 (wel EGUS)	Uitgebreide (vaak aaneengesloten) laesies met gebieden van zichtbare diepe zweren	

Bijlage II Protocol bepaling *Helicobacter pylori*

Protocol afnemen samples

- 1) Aan de hand van de scores die met behulp van Bijlage I Protocol beoordeling maag op EGUS toegekend zijn aan de maag wordt bepaald wat voor samples uit welke locatie genomen moeten worden.
- 2) Alle (controle)samples zijn ± 1 bij 1 cm groot en moeten met een steriele scalpel worden genomen.
- 3) Doe alle (controle)samples direct na afnemen in een steriel buisje en codeer met het nummer van de maag, uit welke regio het sample komt (NG= Non-Glandulair, G= Glandulair, MP= Margo Plicatus) en of het een controlesample is (zo ja, noteer de letter C)
- 4) Is de score van het non-glandulaire gedeelte:
 - a) Score 0: snijd dan 1 controlesample uit van een willekeurige plek uit deze locatie OF
 - b) Score 1,2 of 3: snijd dan 1 sample van de ernstigste maagwandaantasting aanwezig in deze locatie **EN** snijd 1 controlesample van gezond weefsel (minimaal 5 cm van de andere uitgesneden sample) van deze locatie
- 5) Is de score van het glandulaire gedeelte:
 - a) Score 0: snijd dan 1 controlesample uit van een willekeurige plek uit deze locatie OF
 - b) Score 1,2 of 3: snijd dan 1 sample van de ernstigste maagwandaantasting aanwezig in deze locatie **EN** snijd 1 controlesample van gezond weefsel (minimaal 5 cm van de andere uitgesneden sample) van deze locatie
- 6) Is de score van de margo plicatus:
 - a) Score 0: snijd dan 1 controlesample uit van een willekeurige plek uit deze locatie OF
 - b) Score 1,2 of 3: snijd dan 1 sample van de ernstigste maagwandaantasting aanwezig in deze locatie **EN** snijd 1 controlesample van gezond weefsel (minimaal 5 cm van de andere uitgesneden sample) van deze locatie
- 7) Na het uitsnijden van alle (controle)samples moeten zowel de maaginhoud als de maag zelf door Rendac vernietigd worden. Doe de maaginhoud en de magen een plastic zak en plaats deze in de destructievriezer.

Protocol bepaling *Helicobacter pylori* ELISA test

Belangrijk

- Bedek de microtiter plaat tijdens de verschillende incubatiestappen
- Breng alle reagentia samples op kamertemperatuur en meng goed.
- Vermijd direct zonlicht tijdens alle incubatiestappen

Vorbereiding en opslag reagentia

- Om de test kit meer dan een keer te gebruiken, zorg ervoor dat de reagentia opgeslagen worden onder de omstandigheden die op het label staan vermeld. Maak alleen de benodigde hoeveelheid klaar. De kit kan tot vier keer gebruikt worden voor de houdbaarheidsdatum die vermeld staat op het label
- Reagentia met een volume kleiner dan 100 µl moeten gecentrifugeerd worden voor gebruik om verlies van volume te voorkomen
- De ELISA WASHBUF (geconcentreerde wasbuffer) moet verdund worden met aqua bidest (dubbel gedestilleerd water). Verdun 1:10 (100ml WASHBUF + 900 ml aqua bidest) en meng goed. Kristallen kunnen voorkomen als gevolg van de hoge zoutconcentratie in de bewaaroplossingen. De kristallen moeten opnieuw opgelost worden bij kamertemperatuur of bij 37 °C voor verdunning. Het buffer concentraat is stabiel bij 2-8 °C tot de houdbaarheidsdatum die vermeld staat op het label. Verdunde bufferoplossing kan drie maanden opgeslagen worden in een gesloten fles bij 2-8 °C.
- De 2.AB (2. Antibody) moet 1:100 verdund worden in 2.ADBIL (2^e antibody dilution buffer) (100 µl biotin labelled 2.AB + 9,9 ml 2.ABDIL). Het onverdunde antilichaam is stabiel bij 2-4 °C tot de houdbaarheidsdatum die vermeld staat op het label. Verdunde antilichaam oplossing is niet stabiel en kan niet opgeslagen worden.
- Het CONJ (conjugaat, POD-labelled streptavidine) moet 1:100 verdund worden in wasbuffer (100 µl + 9,9 ml wasbuffer). Het onverdunde conjugaat is stabiel bij 2-4 °C tot de houdbaarheidsdatum die vermeld staat op het label. Verdunde conjugaat oplossing is niet stabiel en kan niet opgeslagen worden.
- De CTRL NEG/CTRL POS (controle, zowel negatief als positief) moet opgelost worden met 500 µl bidest. water (dubbel gedestilleerd water). Los dit gedurende 10 minuten op en meng zeer goed door middel van het zachtjes omkeren van het flesjes om er zeker van te zijn dat het volledig opgelost is. Opgeloste controles zijn niet stabiel en kunnen niet opgeslagen worden.

Test procedure

- 1) Voeg 100 µl CTRL POS/CTRL NEG/SAMPLE (positieve controle, negatieve controle en de samples toe in hun respectievelijke *well*)
- 2) Bedek en incubeer **1 uur**, terwijl de microtiterplaat geschud wordt op een horizontale mixer op kamertemperatuur. Eventueel: incubeer 's nachts bij 2-8 °C zonder schudden.
- 3) Zuig op en was de *wells* 7x met 250 µl verdunde wasbuffer
- 4) Voeg 100 µl verdunde 2.AB (2^e antilichaam, biotin gelabeld) toe in iedere *well*
- 5) Bedek en incubeer 1 uur, terwijl de microtiterplaat geschud wordt op een horizontale mixer op kamertemperatuur.
- 6) Zuig op en was de *wells* 5x met 250 µl verdunde wasbuffer
- 7) Voeg 100 µl verdund CON (conjugaat, Peroxidase gelabeld) toe in iedere *well*
- 8) Bedek en incubeer 1 uur, terwijl de microtiterplaat geschud wordt op een horizontale mixer op kamertemperatuur.
- 9) Zuig op en was de *wells* 5x met 250 µl verdunde wasbuffer
- 10) Voeg 100 µl SUB (substraat) toe in iedere *well*

- 11) Incubeer 5-15 minuten bij kamertemperatuur in het donker
- 12) Voeg 50 µl STOP (stop oplossing) toe in iedere *well* en mix kort
- 13) Bepaal de absorptie met een ELISA reader bij 450 nm.
- 14) Noteer de resultaten (positief of negatief) op het dataverzamelingsformulier '*Helicobacter pylori*'

Resultaten

De cut-off waarde is de waarde waarboven/waaronder het resultaat als positief/negatief wordt beschouwd, deze waarde is 0,190 nm. Hierbij wordt een veiligheidsmarge van 0,025 nm aangehouden.

- Positief= waardes $> 0,215$ ($0,190 + 0,025$)
- Negatief= waardes $< 0,165$ ($0,190 - 0,025$)
- Twijfelachtige resultaten: range 0,165 – 0,215 (gemeten op 450 nm)
 - o Deze monsters moeten opnieuw afgelezen worden door de ELISA reader.
 - o Zit de waarde van het monster **opnieuw** in de range **onder** de cut-off waarde, dan moet met een nieuw monster de *Helicobacter pylori* bepaling opnieuw gedaan worden.
 - o Zit de waarde van het monster **opnieuw** in de range **boven** de cut-off waarde, dan wordt het resultaat als positief beschouwd. (Immundiagnostik, 2011)

Bijlage III Codeboek SPSS

Kolomnr	Naam	Type	Label	Values	Meetniveau
1	Nummer	Numeric	Nummer maag	<i>Handmatig ingevoerd</i>	Ordinaal
2	DatumHaal	Date	Datum van ophalen van maag	<i>Handmatig ingevoerd</i>	Scale
3	DatumKijk	Date	Datum van bekijken	<i>Handmatig ingevoerd</i>	Scale
4	Slachthuis	Numeric	Uit welk slachthuis komt de maag	<i>Handmatig ingevoerd</i>	Nominaal
5	gradGM1	Numeric	Beoordeling gehele maag op gradatie EGUS door persoon 1, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
6	gradGM2	Numeric	Beoordeling gehele maag op gradatie EGUS door persoon 2, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
7	gradGM1h	Numeric	Beoordeling gehele maag op gradatie EGUS door persoon 1, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
8	gradGM2h	Numeric	Beoordeling gehele maag op gradatie EGUS door persoon 2, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
9	gradNG1	Numeric	Beoordeling non-glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 1, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
10	gradNG2	Numeric	Beoordeling non-glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 2, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
11	gradNG1h	Numeric	Beoordeling non-glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 1, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
12	gradNG2h	Numeric	Beoordeling non-glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 2, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal

13	gradGD1	Numeric	Beoordeling glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 1, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
14	gradGD2	Numeric	Beoordeling glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 2, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
15	gradGD1h	Numeric	Beoordeling glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 1, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
16	gradGD2h	Numeric	Beoordeling glandulaire deel op gradatie EGUS door persoon 2, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
17	gradMP1	Numeric	Beoordeling margo plicatus op gradatie EGUS door persoon 1, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
18	gradMP2	Numeric	Beoordeling margo plicatus op gradatie EGUS door persoon 2, 1 ^e keer	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
19	gradMP1h	Numeric	Beoordeling margo plicatus op gradatie EGUS door persoon 1, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
20	gradMP2h	Numeric	Beoordeling margo plicatus op gradatie EGUS door persoon 2, herhaling	0= gradatie 0 1= gradatie 1 2= gradatie 2 3= gradatie 3	Ordinaal
21	egusGM1	Numeric	Wel/geen EGUS in gehele maag (beoordeling persoon 1, 1 ^e keer)	0= geen EGUS 1= wel EGUS	Nominaal
22	egusNG1	Numeric	Wel/geen EGUS in het non-glandulaire deel (beoordeling persoon 1, 1 ^e keer)	0= geen EGUS 1= wel EGUS	Nominaal
23	egusGD1	Numeric	Wel/geen EGUS in het glandulaire deel (beoordeling persoon 1, 1 ^e keer)	0= geen EGUS 1= wel EGUS	Nominaal
24	egusMP1	Numeric	Wel/geen EGUS in margo plicatus (beoordeling persoon 1, 1 ^e keer)	0= geen EGUS 1= wel EGUS	Nominaal
25	helicoNGgew	Numeric	Sample non-glandulaire deel (geen EGUS in locatie)	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal

26	helicoGDgew	Numeric	Sample glandulaire deel (geen EGUS in locatie)	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal
27	helicoMPgew	Numeric	Sample margo plicatus (geen EGUS in locatie)	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal
28	HelicoNG	Numeric	Sample van EGUS in non-glandulaire deel	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal
29	HelicoNGco	Numeric	Controlesample non-glandulaire deel (wel EGUS in locatie)	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal
30	HelicoGD	Numeric	Sample van EGUS in glandulaire deel	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal
31	HelicoGDco	Numeric	Controlesample glandulaire deel (wel EGUS in locatie)	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal
32	HelicoMP	Numeric	Sample van EGUS margo-plicatus	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal
33	HelicoMPco	Numeric	Controlesample margo-plicatus (wel EGUS in locatie)	0= Nee 1= Ja 2= n.v.t.	Nominaal