

Laboratorium lessen

4.1 HH



2013-2014

Helicon Opleidingen NHB Deurne

Inhoudsopgave

Lesplanning

Hoofdstuk 1: Veiligheid in het laboratorium	3
Hoofdstuk 2: Materialen in het laboratorium	5
Hoofdstuk 3: Etiketteren	18
Hoofdstuk 4: Urineonderzoek	20
Hoofdstuk 5: Feces onderzoek	28
Hoofdstuk 6: Microbiologisch onderzoek	37

Hoofdstuk 1: Veiligheid in het laboratorium

In het laboratorium is het belangrijk dat je veilige en nauwkeurig werkt. In dit hoofdstuk staan de veiligheidsregels beschreven die gelden tijdens je aanwezigheid in een laboratorium.

Besmet materiaal

In een laboratorium werk je met patiënten materialen. Deze materialen kunnen besmet zijn. Besmet materiaal kan gevaar voor je zelf opleveren als je hier niet zorgvuldig mee omgaat. Ook kan het gevaar opleveren voor je omgeving. Ga dus zorgvuldig en juist om met het patiënten materiaal.

Hygiëne

Werk met dit 'besmette' materiaal hygiënisch. Hieronder staan een aantal handvaten om hygiënisch te werken:

- Rook en eet niet in de ruimte waar het onderzoek wordt uitgevoerd!
- Draag een schone witte jas bij laboratoriumonderzoek en hang deze weg in het laboratorium voordat je dit verlaat.
- Werk met plastic handschoenen als je met gevaarlijke stoffen werkt of wondjes hebt.
- Was geregeld je handen met desinfecterende zeep.
- Verlaat nooit het laboratorium voordat je je jas hebt uitgetrokken en opgehangen en je handen gewassen zijn.
- Neem de tafels af met een desinfecterend middel.
- Na voltooid onderzoek al het onderzoekmateriaal zodanig verwijderen dat voor mens en dier besmettingsgevaar is uitgesloten.
- Urineresten kan je, gemengd met grote hoeveelheden leidingwater, wegspoelen door de gootsteen.
- Feces- en bloedresten worden verzameld in containers en daarna vernietigd.

Veiligheid

Omdat je met gevaarlijke stoffen en materialen in aanraking kunt komen is veiligheid zeer belangrijk. Je behoort altijd veiligheidsmaatregelen te treffen in een laboratorium. Ook moet in het laboratorium enkele veiligheidsmaatregelen zijn getroffen.

Maatregelen in het laboratorium:

- Er moeten twee uitgangen zijn.
- Er moet een brandblusser hangen
- Etiketteer alle flessen in het laboratorium
- Sluit gebruikte potten en flessen goed af
- (oog)douche is aanwezig

Er zijn ook enkele algemene afspraken die in een laboratorium gelden:

- Er mag niet gegeten / gedronken worden in het lab
- Langhaar moet worden vastgebonden met een elastiekje
- Labjassen moeten schoon zijn, zonder tekeningen
- Er mag niet gerent worden in het lab
- Je mag geen gebruikte vloeistoffen terug gooien in de originele fles/vat
- Alles wat je overgiet moet je coderen
- Je bent zelf verantwoordelijk voor je materialen
- Ruim de (patent)materialen op in de daarvoor bestemde containers
- Zet de brander als je hem niet gebruikt op de zichtbare (gele) vlam
- Jassen en tassen moeten uit het gangpad worden weggelegd.
- Codeer alle materialen / vloeistoffen etc. die je gebruikt.

Verantwoordelijkheid

Het is zoals hierboven staat beschreven heel erg belangrijk op hygiënisch en veilig te werken. Je bent hier zelf verantwoordelijk voor. Het is ook belangrijk dat je collega's / mede studenten op hun gedrag kunt aanspreken mochten even de regels vergeten!

Hoofdstuk 2: Materialen in het laboratorium

In dit hoofdstuk worden de meest gebruikte materialen uit het laboratorium besproken.

Materiaal

Hieronder worden de verschillende materialen beschreven.

Reageerbuis en rek



Reageerbuizen kunnen voor allerlei onderzoeken worden gebruikt. Glazen reageerbuizen kunnen in een brander worden verhit. Gebruik bij het verhitten een reageerbuisklem. De buizen worden in een reageerbuisje gezet. Als je reageerbuizen vult, dien je altijd met een afwasbare stift de reageerbuis te coderen!

Bekerglas



Bekerglazen zijn er in verschillende maten. De glazen bekerglazen zijn te verhitten boven een brander. Het bekerglas zet je dan op een driepoot, met de brander eronder. Let op dat de bekerglas stabiel staat. De bekerglas kun je ook gebruiken om hoeveelheden vloeistof in te schenken.

Driepoot



De driepoot kan worden gebruikt om bekerglazen op te warmen. De driepoot kan boven een brander met blauwe vlam worden gezet. Zorg er voor dat de driepoot stabiel staat boven de brander.

Erlenmeyer



De erlenmeyer is vaak van glas gemaakt. De erlenmeyer is er in verschillende formaten. Ook deze kan worden verward om een driepoot met brander er onder. De erlenmeyer kan goed worden gebruikt bij het mengen van stoffen.

Horlogeglazen



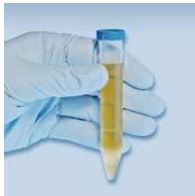
Horlogeglazen worden gebruikt om stoffen af te wegen. Via een horlogeglas kun je op een weegschaal de benodigde hoeveelheid vaste stof (poeders etc.) afwegen. Let op dat je het horlogeglas zelf niet mee weegt!

Spatels



Spatels gebruik je om vaste stoffen uit potten te halen. Ze kunnen van verschillend materiaal gemaakt zijn (metaal, hout, plastic) en kunnen verschillende vormen hebben. Zorg er voor dat je met de spatels de poeders niet vervuult. Gebruik dus voor elke pot een andere spatel, of reinig deze eerst.

Sedimentbuisje



In een sediment buisje centrifugeer je meestal een hoeveelheid vloeistof. De vaste bestanddelen die eventueel in de vloeistof zitten, zakken dan naar de bodem. Als je de bovenstaande vloeistof afgiet, kan je dit sediment (bezinksel) microscopisch onderzoeken.

Maatcilinder



Een maatcilinder wordt gebruikt om een hoeveelheid vloeistof af te meten (bv. Voor het verdunnen van een reagens met water). Op de zijkant van de cilinder is een schaalverdeling aangebracht die de inhoud aangeeft in milliliters. Wil je het volume van een vloeistof in een maatcilinder aflezen op de schaalverdeling, dan moet je zorgen dat je op ooghoogte kijkt langs de onderkant van de meniscus (= vloeistofspiegel). Het schaaldeel dat samenvalt met de meniscus geeft het volume aan.

Het is natuurlijk duidelijk dat als je een volume van 5 ml wil afmeten, je dit niet doet in een maatcilinder die 100 ml kan bevatten, maar in een maatcilinder met een zo klein mogelijk volume. In dit geval 10 ml.

Pasteurse pipetten



Pasteurse pipetten dienen om kleinere hoeveelheden van een vloeistof vanuit bv. een fles over te brengen in bv. een reageerbuis. Met behulp van het speentje kan je het uitlopen van de vloeistof uit de pipet regelen en zelfs druppels uit de pipet laten komen. Het is zeer aan te bevelen om met water het pipetteren te oefenen. Je moet er goed op letten dat de pipet altijd met de punt naar beneden in verticale stand in de hand gehouden moet worden. Er mag geen vloeistof in de speen komen, dus houdt de pipet recht!

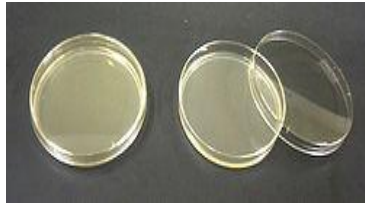
Öse



öse, ook wel entnaald genoemd, is een instrument waarmee je bacteriën kunt enten zodat de bacteriën beter kunnen groeien en kunnen worden gedetermineerd. (naam geven van de bacterie)

De handelingen van dit enten worden in hoofdstuk 6 beschreven.

Petrischaal

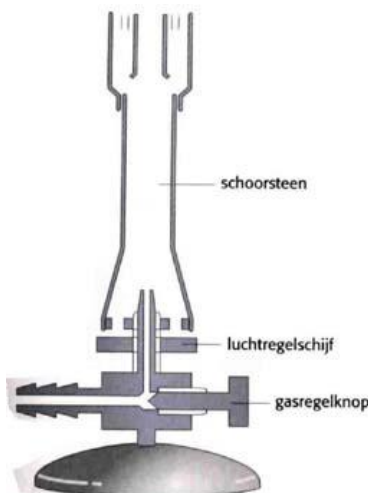


De petrischaal is een glazen of plastic schaal waarin je onder andere voedingsbodems (voor bacteriën) in kunt maken. Ook kun je bv haren, huidschilfers etc. in de petrischalen bewaren. Als de petrischalen worden gevuld met agar spreekt men van een voedingsbodem. De agar is een soort gel met allerlei nutriënten erin die de bacteriën

nodig

hebben om te groeien.

(Bunsen)Brander



Voor bv. het verwarmen van een vloeistof maak je gebruik van een gasbrander. Indien je gas in de brander laat stromen en je houdt de luchtregelaar gesloten, dan brandt het gas met een gele roetende vlam. Ga je echter de luchtopening vergroten, dan zal lucht aangezogen worden en wordt de kleur van de vlam blauw. (De temperatuur van deze vlam is hoger dan die van de gele vlam.)

Werkwijze brander

- Sluit de slang aan op de gaskraan van de werktafel.
- Controleer of de gasregelaar dicht is.
Controleer of de luchtregelaar dicht is.
- Draai de gaskraan op de werktafel open.
- Houd een vlammetje bij het uiteinde van de schoorsteen.
- Draai de gasregelaar open.
Je hebt nu een gele vlam. Dit is de spaarvlam en is duidelijk zichtbaar, dus veiliger.
- Draai de luchtregelaar open.
Je hebt nu een blauwe vlam. Deze vlam wordt gebruikt om reageerbuizen e.d. te verwarmen.

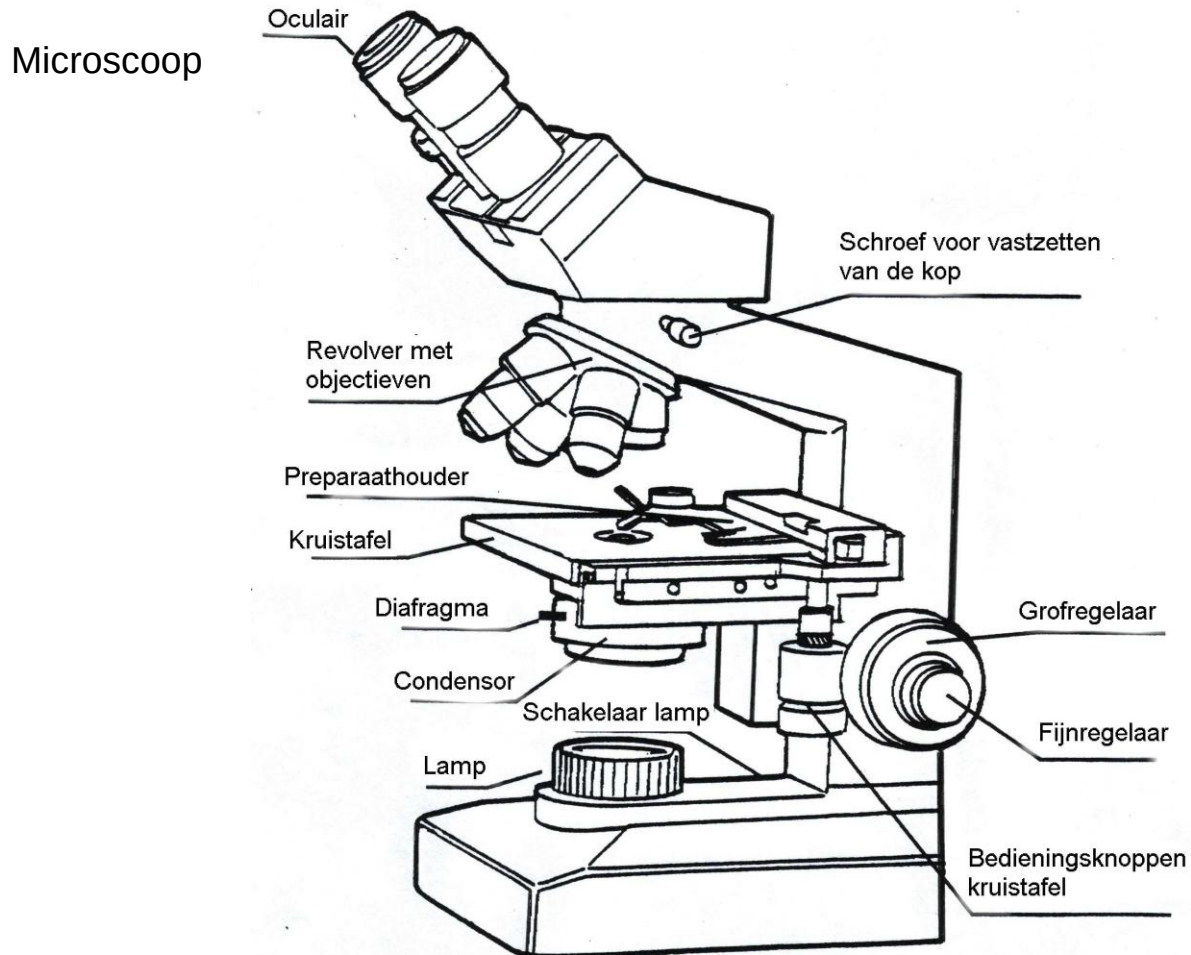
Afsluiten

- Draai de luchtregelaar dicht. => Gele vlam.
- Draai de gasregelaar dicht.
- Draai de gaskraan op de werktafel dicht.
- Neem de slang van de gaskraan op de werktafel.

Let op!

- Plaats geen brandbare stoffen in de buurt van de brander.
- Gooi gebruikte lucifers nooit direct in de prullenbak.
- Verwarm nooit in afgesloten glaswerk.

Richt de opening van de reageerbuis nooit naar jezelf of je collega!!



Een microscoop dient om voorwerpen zichtbaar te maken, die niet met het blote oog kunnen worden waargenomen. Ze worden door de microscoop vergroot weergegeven. Aan een microscoop kan je een mechanisch en een optisch en belichtingsgedeelte onderscheiden.

Mechanisch gedeelte

Het mechanisch gedeelte bestaat uit de volgende onderdelen.

- *Revolver*
De revolver is bevestigd aan de tubus en is draaibaar. Hierin hangen namelijk de voorwerplenzen of objectieven die je door draaien van de revolver in de lichtweg kan brengen.
- *Tafel*
De tafel is vaak verticaal verstelbaar.

- *Kruistafel*
De kruistafel dient om het te onderzoeken voorwerp onder de microscoop te kunnen verplaatsen. Dit gebeurt d.m.v. knoppen die zich onder de kruistafel bevinden. Een millimeterverdeling met noniusaflezing (hulpschaalaflezing) vereenvoudigt het terugvinden van bepaalde gedeelten van een preparaat.
- Grof instelschroef
Met de grof instelschroef kan de kruistafel op en neer bewogen worden. Bij die microscopen waar de tafel vastzit, beweeg je met de grof instelschroef de tubus op en neer. De grof instelschroef dient om een beeld te krijgen van een voorwerp dat je op de kruistafel tussen de klemmen hebt gelegd.
- Fijninstelschroef
Met een fijninstelschroef stel je dit gevonden beeld scherp.

Optisch gedeelte en belichtingsgedeelte

Het optisch en belichtingsgedeelte omvat de volgende onderdelen.

- Objectieven
Aan de revolver hangen drie, soms vier objectieven met een vergroting van 10, 40 of 45 en 100 X. Het objectief (= voorwerplens) met 100 vergroting noem je olie immersie lens. Deze lens gebruik je voor gekleurde preparaten. Je brengt hierbij een druppel olie op het preparaat en draait de lens in de olie. De olie heeft tot doel het preparaat duidelijker zichtbaar te maken. De objectieven maken een vergroot beeld van het voorwerp dat je bekijkt.
- Oculairen
Het oculair (= oog lens) bevindt zich boven in de tubus en maakt een vergroting (meestal 10 X) van het beeld dat je met het objectief van het voorwerp hebt gemaakt. Moderne zg. binoculaire microscopen hebben een dubbele tubus. Je kijkt hierdoor met beide ogen waardoor langdurig microscopiseren minder vermoeiend is.
- Condensor
De condensor is een samenstel van lenzen dat dient om het voorwerp van onderaf te belichten. Het bevindt zich onder de tafel en kan d.m.v. een knopje op en neer worden bewogen, waardoor de belichtingssterkte van het voorwerp geregeld wordt. Een lagere stand van de condensor vermindert de belichtingssterkte van het voorwerp. In de hoogste stand valt het meeste licht op het voorwerp.
- Diafragma
Een diafragma bevindt zich onder de condensor en dient om de openingshoek van het licht te kunnen regelen. Staat het diafragma geheel open, dan wordt het meeste licht doorgelaten, onder de grootste hoek.
De totale vergroting van een voorwerp bepaal je door de vergroting van het oculair te vermenigvuldigen met de vergroting van het objectief.
Bij gebruik van: het oculair 10 X vergroting en het objectief 40 X vergroting is de totale vergroting: 400 X.

Het praktisch werken met de microscoop

Je gebruikt een microscoop o.a. voor:

- het beoordelen van een urinesediment
- het tellen van leukocyten
- het beoordelen van een bloeduitstrijkje
- het vaststellen van de vorm van bacteriën bij een gramkleuring.

Werkwijze microscoop

- Zet de microscoop voor je met de elektriciteitsnoer van je af.
- Draai het objectief met de kleinste vergroting boven het gat in de tafel.
- Draai de tafel met de macroschroef helemaal naar beneden.
- Leg het preparaat op de microscopetafel in de preparaatklem.
- Draai m.b.v. de stelschroeven het preparaat midden boven het gat in de tafel.
- Draai de tafel met de macroschroef helemaal naar boven.
- Zet het lampje aan.
- Kijk door het oculair en draai met de macroschroef de tafel rustig naar beneden totdat je een scherp beeld hebt.
- Leg het te onderzoeken materiaal midden in beeld m.b.v. de stelschroeven.
- Stel m.b.v. het diafragma de hoeveelheid licht in.
- Bij perfect scherp beeld kun je het revolver voorzichtig draaien naar de volgende vergroting.
- Stel het beeld scherp m.b.v. de microschroef.
- Bij perfect scherp beeld kun je het revolver voorzichtig draaien naar de volgende vergroting.
- Stel het beeld scherp m.b.v. de microschroef.

Let op!

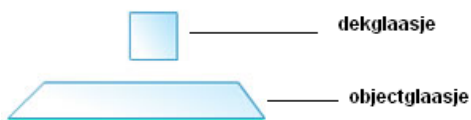
- Houdt de microscoop altijd recht; het oculair kan eruit vallen.
- Schuif de microscoop nooit over de tafel; door de trillingen kunnen de spiegeltjes loskomen.
- Ga pas naar de volgende vergroting als het beeld perfect scherp is.
- Gebruik de macroschroef alleen voor de kleinste vergroting.

Vergrotingen

Als je enigszins vertrouwd bent geraakt met de praktische uitvoering van het laboratoriumwerk gaat de docent van je verwachten dat je weet hoe de stand van condensor en diafragma moet zijn en welke vergroting je moet gebruiken voor een bepaald onderzoek.

Uit te voeren onderzoek	Vergroting objectief	Totale vergroting	Belichting
Bekijken van een urinesediment	10 x	100 x	Weinig licht
Beoordelen van een urinesediment	40 x	400 x	Matig licht
Tellen van leukocyten	10 x	100 x	Weinig licht
Beoordelen kwaliteit bloeduitstrijkje	100 x	1000 x	Veel licht
Wormeieren zoeken	10 x	100 x	Weinig licht
Wormeieren beoordelen	40 x	400 x	Matig licht
Beoordelen bacteriologisch preparaat	100 x	1000 x	Veel licht
Beoordelen van een KOH-preparaat	40 x	400 x	Matig licht

Object glaasje en dekglasje



Een objectglasje is te gebruiken om onder de microscoop te leggen. (patiënt)materiaal is aan te brengen op het objectglasje. Bij sommige (natte) materialen is het nodig om een dekglasje er op te leggen. Vaak gebeurt dit om er voor te zorgen dat de lenzen niet vuil worden.

Een preparaat maken

werkwijze

- Reinig het objectglasje en het dekglasje met een tissue en evt. een reinigingsmiddel.
- Leg het objectglasje voor je op tafel
- Leg een druppel te gebruiken vloeistof midden op het objectglasje.
- Leg het te onderzoeken materiaal midden in de druppel op het objectglasje.
- Neem het dekglasje op twee hoeken tussen duim en wijsvinger vast.
- Zet één zijde van het dekglasje op het objectglasje, tegen de druppel.
- Ondersteun het dekglasje met de prepareernaald en laat het dekglasje los.
- Laat nu voorzichtig het dekglasje met de prepareernaald in de druppel zakken. Hoe rustiger je dit doet, hoe kleiner de kans op luchtbelletjes.

Objectnaald



Met behulp van een objectnaald kan het dekglasje in een hoek rustig op het objectglasje worden neergelegd. De punt van de objectnaald houdt het dekglasje tegen en brengt deze naar de objectglasje toe.

Pipetten



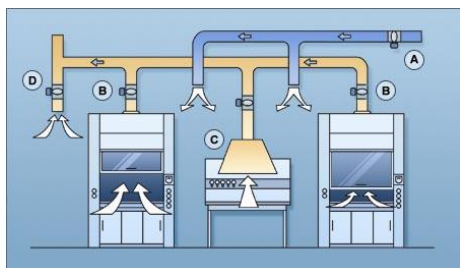
Pipetten kunnen worden gebruikt om een kleine hoeveelheid vloeistof op te nemen en in een andere fles/bekerglas etc. te verdelen. Er zijn verschillende pipetten. Je hebt disposable pipetten (zie afbeelding), maar er zijn ook elektrische pipetten verkrijgbaar. De elektrische pipetten hebben disposable tips, van verschillende maten.

Stoof



De stoof is een soort broedoven voor bacteriën. Voedingsbodems die geënt zijn worden hierin bewaard, zodat de bacteriën kunnen groeien. De temperatuur van de stoof hangt af van de optimumtemperatuur van de bacteriën. Als de bacteriën eenmaal gegroeid zijn gaan ze in de koelkast zodat ze niet verder groeien.

Afzuigkast



In laboratoria wordt soms gewerkt met giftige, vluchtige of besmettelijke stoffen. Om jezelf te beschermen voor je werkzaamheden met deze stoffen uit in een afzuigkast. (laf kast) Door de luchtstroming in die kast wordt de laborant beschermd.

Opdrachten

2.1 Laboratorium instrumenten benoemen

In het klaslokaal zijn verschillende labinstrumenten klaar gelegd. Loop langs de verschillende materialen. Elk materiaal is aangeduid met een letter.

A . Bekijk de materialen en vul schema 1 per materiaal (letter) in.

code	Instrumentnaam	Geschikt voor:	Tekening:
A			
B			
C			

code	Instrumentnaam	Geschikt voor:	Tekening:
D			
E			
F			
G			

code	Instrumentnaam	Geschikt voor:	Tekening:
H			
I			
J			
k			

Opdracht 2.2 : Preparaten onder microscoop bekijken

In tweetallen ga je een aantal preparaten bekijken onder de microscoop. Gebruik je dictaat om de microscoop op de juiste manier in te stellen. Deze oefening dient er voor om vertrouwd te raken met de microscoop. Als je een scherpbeeld hebt van je preparaat laat je de docent dit beeld controleren. Als de docent het goed gekeurd heeft ga je door naar de volgende preparaat.

B: Beschrijf in stappen hoe je tot een scherpbeeld bent gekomen. Benoem daarbij de gebruikte onderdelen van de microscoop.

This image shows a blank sheet of white paper with horizontal ruling lines. The lines are evenly spaced and run across the width of the page. There are no margins, text, or other markings on the paper.

Hoofdstuk 3: Etiketteren

In dit hoofdstuk wordt het belang van het etiketteren en hoe te etiketteren uitgelegd.

(Patiënt)materiaal

In elk laboratorium krijg je monsters om te onderzoeken. Deze monsters kunnen van alles zijn, denk maar aan urinemonsters, mest, bloed, maar ook wattenstaafjes, nagels en huidschilfers kun je tegen komen. Aan de hand van een onderzoek in het laboratorium wordt een mogelijke oorzaak of verwekker aangewezen. Als je niet goed registreer van wie het materiaal is, loop je het risico dat je patiënt gegevens verwisseld met alle gevolgen van dien!

Etiketteren

In sommige laboratoria wordt al het (patiënten)materiaal via de computer aangemeld. Door in de computer aan te geven van wie het is, wat voor een materiaal het is en wat er aan onderzoek gedaan moet worden, krijg je vaak etiketten die je op het te onderzoeken materiaal kunt plakken. Je hebt je materiaal dan direct gecodeerd. Er zijn een aantal stappen die je altijd ter controle moet controleren:

- Klopt het aanvraagformulier met het materiaal?
- Kloppen de gegevens van de patiënt op het formulier en op het materiaal zelf? Komt dat overeen?
- Kloppen de geprinte stickers?
- Zorg dat je ze op de juiste materialen plakt.

Indien je geen etiketten print, dien je zelf de gegevens met een stift op het materiaal te schrijven. Zorg dat je zo codeert dat je zelf nooit twijfelt aan wat er in bv een reageerbuisje zit. Als je twijfelt, moet je het opnieuw doen! Als al het materiaal op is kan dit dus voor grote problemen zorgen! Zet bijvoorbeeld de patiënten naam, het type materiaal en de geboortedatum met een stift op de reageerbuis, bekerglas etc. Doe dit ook voor vloeistoffen, poeders etc. die je gebruikt.

Opdracht 3.1: Etiketteren van (patiënten) materialen

Je krijgt per tweetal drie verschillende (patiënten)materialen uitgedeeld. Bekijk de codering van deze materialen.

C: beschrijf in onderstaande tabel, wat er goed en wat er niet goed is aan de codering van het (patiënten) materiaal.

Tabel C: Overzicht

Beschrijving materiaal A	Wat is goed aan de codering?	Wat is fout aan de codering?
Beschrijving materiaal B	Wat is goed aan de codering?	Wat is fout aan de codering?
Beschrijving materiaal C	Wat is goed aan de codering?	Wat is fout aan de codering?

Afronding les 1

Als je klaar bent ruim je alles op en maak je je werkplek schoon.

Hoofdstuk 4: Urineonderzoek

Urine is de vloeistof die in de nieren wordt gevormd en waarin stoffen uitgescheiden worden die niet door het lichaam gebruikt worden. Veelal zijn dit eindproducten van stofwisselingsprocessen en kan urineonderzoek de dierenarts aanwijzingen geven over een stofwisselingsstoornis of over een slechte werking van een bepaald orgaan.

Het verzamelen van urine

Opvangen van urine bij huisdieren voor laboratoriumonderzoek is niet altijd eenvoudig. Meestal moet de eigenaar het zelf doen. Bij de hond is het niet zo moeilijk. Met een steelpannetje of een pollepel kan je - het liefst 's morgens bij het uitlaten - als de hond een beetje meewerkt, de urine opvangen.

Bij katten is het moeilijker. Als de kat gewend is op een bak te urineren, zou je de eigenaar kunnen adviseren heel weinig strooisel in de bak te doen of de bodem te bedekken met kleine reepjes of stukjes aluminiumfolie. Met een injectiespuit kan dan later de urine verzameld worden. Nog moeilijker wordt het bij katten die buiten hun behoefte doen. Het manueel ledigen van de blaas door de dierenarts zou eigenlijk de beste oplossing zijn.

Als urine absoluut zonder verontreinigingen en soms zelfs steriel moet worden opgevangen, zal de dierenarts de voorkeur geven aan katheteriseren. Een reu wordt gekatheteriseerd met een buigzame katheter terwijl voor de teef een metalen katheter nodig is. Voor katers gebruik je een zeer dunne meestal polyethyleen katheter. Poezen zijn heel moeilijk of niet te katheteriseren.

De assistente geeft de eigenaar van het huisdier een schoon flesje of potje mee voor het urinemonster. Er zijn voor dit doel speciale kunststof wegwerppotjes met deksel in de handel. Als de eigenaar zelf voor een potje zal zorgen, moet erop gewezen worden dat het potje goed moet worden gereinigd en met water moet worden nagespoeld (om eventuele zeepresten te verwijderen). Om het potje zo veel mogelijk 'kiemvrij' te maken, zou het nagespoeld kunnen worden met kokend water.

Bij het ontvangen van het potje urine ziet de assistente erop toe dat de juiste gegevens van het desbetreffende dier (en van de eigenaar) op het etiket vermeld zijn. Evenals de datum. Als het urineonderzoek niet binnen 30 minuten uitgevoerd kan worden, moet je de urine gekoeld (0 tot 4 °C) bewaren. Het onderzoek moet in elk geval binnen 12 uur plaatsvinden.

Fysisch urineonderzoek

Bij een fysisch onderzoek kijken we naar de kleur, helderheid en geur.

Kleur

De normale kleur van urine is licht- tot donker geel. Variaties hoeven niet direct afwijkend te zijn., De kleur is van veel factoren afhankelijk, zoals:

- diersoort
- voedingsgewoonten
- concentratie van de urine
- tijdstip van verzamelen

Toch kan het belangrijk zijn om de kleur van urine te beoordelen, omdat een mogelijke afwijkende kleur vaak wordt bevestigd door ander laboratoriumonderzoek.

Kleurentabel

Kleur	Mogelijke oorzaak	vervolgonderzoek	aandoening
Rood -roodbruin	Bloed	-Bloedcellen zoeken -chemisch onderzoek	Bloedcellen aanwezig = hematurie Bloedcellen stuk = Hemolyse
Donkergeel - bierbruin	Galkleurstoffen	Chemisch onderzoek	Bilirubinurie

Praktische uitvoering:

- 1 Breng wat urine over in een schone reageerbuis.
- 2 Beoordeel de kleur, bij voorkeur met direct invallend licht.
- 3 Noteer de kleur en bevestig een afwijkende kleur als pathologisch met ander laboratoriumonderzoek.

Helderheid

In de meeste gevallen is normale, vers geloosde urine, vrijwel helder. Een troebele urine hoeft niet afwijkend te zijn. Troebelingen kunnen door de meest uiteenlopende oorzaken ontstaan. Of een troebeling werkelijk pathologisch is moet bevestigd worden door een vervolgonderzoek.

Troebelingen kunnen veroorzaakt worden door:

- Erytrocyten = rode bloedcellen
- Leukocyten = witte bloedcellen
- Epitheelcellen
- Bacteriën
- Neergeslagen zouten
- Toevallige verontreiniging

Praktische uitvoering:

- 1 Breng wat urine over in een schone reageerbuis.
- 2 Beoordeel of deze urine licht troebel, troebel of sterk troebel is.

Geur

Afwijkende geuren die op bepaalde ziekteverschijnselen kunnen wijzen, ruik je bij het opvangen van de urine of bij het openen van het potje.

- Ammoniakgeur → kan wijzen op urineweginfectie
- Rotten eierengeur → kan wijzen op ernstige urineweginfectie
- Aceton → kan wijzen op diabetes mellitus (suikerziekte)

Opdracht 4.1: Fysisch urineonderzoek

- Meng de urine door voorzichtig te zwenken.
- Giet de urine in een buis.
- Beoordeel de urine op kleur, helderheid en geur.
- Meet m.b.v. een refractometer de soortelijk massa (s.m.)
- Noteer de gegevens in onderstaande tabel.

	1	2.	3.	4.
Kleur				
Helderheid				
Geur				

Chemisch urineonderzoek

Het chemisch urineonderzoek omvat het kwalitatief en het kwantitatief bepalen van allerlei chemische stoffen in urine, die mogelijk een indicatie zijn voor bepaalde ziektebeelden. Het kwalitatief onderzoek toont de aanwezigheid aan van deze stoffen: het kwantitatief onderzoek geeft de hoeveelheid van deze stoffen aan.

In een dierenartsenpraktijk is vooral het kwalitatief onderzoek van belang. Is een kwantitatieve bepaling noodzakelijk, dan wordt de urine opgestuurd naar een gespecialiseerd laboratorium.

De volgende chemische bestanddelen worden beoordeeld.

- Leukocyten

Witte bloedcellen zijn belangrijk bij de afweer tegen lichaamsvreemde stoffen zoals bacteriën en virussen

-Nitriet

Is een afvalproduct van bepaalde bacteriën die een urineweginfectie kunnen veroorzaken.

-pH

Is een maat voor de zuurgraad. Deze heeft een schaal van 0 – 14.

pH 0 – 6,5 = zuur

pH 6,5 – 7,5 = neutraal

pH 7,5 - 14 = basisch

-Eiwit

Als de filterwerking van de nieren verminderd, kunnen er eiwitten uit het bloed in de urine terecht komen.

-Glucose

Bij de stofwisselingsziekte diabetes mellitus, is door een tekort aan insuline het glucosegehalte in het bloed te hoog. Hierdoor kunnen de nieren wat glucose uit het bloed via de urine afvoeren.

-Ketonen

Door een verstoorde vetstofwisseling kunnen ketostoffen zoals aceton in de urine worden aangetroffen. De urine ruikt dan naar aceton.

-Urobilinogeen en bilirubine

Galkleurstoffen zijn afbraakproducten van hemoglobine, die vrijkomt als de erythrocyten niet meer bruikbaar zijn.

-Hemoglobine

Is een belangrijk bestanddeel van bloed (= rode bloedkleurstof)

-Soortelijke massa (s.m.) / dichtheid

Dit geeft een indicatie voor de concentratie van de opgeloste stoffen in de urine.

Praktische uitvoering:

- 1 Doop het indicatorstrookje kort in verse, goed gemengde urine.
- 2 Tip de overtollige urine af.
- 3 Vergelijk de ontstane kleur met de bijgeleverde kleurenschaal.

Bepaling soortelijke massa met Zakrefractometer

Je bepaalt de soortelijke massa met de zakrefractometer als volgt.

- 1 Open het afdekplaatje en pipetteer 2-3 druppels water op het prismaplaatje.
- 2 Sluit het afdekplaatje voorzichtig zodat de druppels water een dun laagje op het prismaplaatje vormen.
- 3 Lees door het oculair bij de grenslijn de s.m. op het linkerschaalgedeelte af. Controleer of de meter inderdaad 1,000 aangeeft. Stel zo nodig een correctiefactor vast, of laat de refractometer afstellen door de docent.
- 4 Droog de zakrefractometer.
- 5 Breng 2-3 druppels homogene urine op het prismaplaatje.
- 6 Sluit het afdekplaatje.
- 7 Lees de s.m. af en corrigeer zo nodig.
- 8 Spoel de zakrefractometer af onder de kraan en droog hem met een tissue.

Opmerking:

Het voordeel van een zakrefractometer is dat je slechts enkele druppels urine nodig hebt, wat bij kleine dieren natuurlijk van pas komt.

Teststroken



In urine kunnen, zoals eerder is vermeld, stoffen voorkomen die een aanwijzing kunnen zijn voor een ziekteproces in het lichaam. Het (kwalitatief) aantonen van deze stoffen kan voor de dierenarts de bevestiging zijn van z'n diagnose en is dus een belangrijk hulpmiddel.

Tegenwoordig maak je bij dit kwalitatief chemisch onderzoek veelal gebruik van teststroken die de orthodoxe reageerbuisproeven hebben vervangen.

Bij het werken met teststroken moet je een aantal zaken in acht nemen:

- Letten op de vervaldatum van de stroken, na deze datum mogen de stroken niet meer gebruikt worden.
- Strikt de voorgeschreven afleestijd hanteren (met stopwatch).
- De stroken zijn gevoelig voor vocht en licht. De meeste verpakkingen bevatten een droogmiddel dat niet verwijderd mag worden. Buiten dat is het belangrijk dat je na uitnemen van de teststrook uit de flacon direct de dop weer op de flacon doet.
- Het testuiteinde niet aanraken.
- De teststrook kort in de urine dompelen. Te lang in de urine dompelen zou tot gevolg hebben dat de stoffen die op het testuiteinde zitten, in de urine oplossen.
- De overtollige urine aftippen aan de rand van de urinebeker.
- Bij goed licht de kleur van de teststrook na de voorgeschreven afleestijd vergelijken met de kleurenstrook op de flacon.
- Elke kleurverandering betekent een positieve reactie, wat nog niet hoeft te betekenen dat de stof die je aan wil tonen ook werkelijk aanwezig is. De mogelijkheid is aanwezig van: een foutpositieve uitslag: de reactie op het testuiteinde is positief, maar de aan te tonen stof is niet aanwezig, of: een foutnegatieve uitslag: de reactie op het testuiteinde is negatief, terwijl de aan te tonen stof wel aanwezig is. Het is zeer belangrijk aan deze mogelijkheden te denken en daarom dus altijd de gebruiksaanwijzing in de bijsluiter te lezen.
- Teststroken niet in de koelkast en niet boven 30 °C bewaren.

Opdracht 4.2: Chemisch urineonderzoek

- Meng de urine door voorzichtig te zwenken.
- Giet de urine in een buis.
- Dip de strip helemaal in de urine.
- Tik de overtollige urine af.
- Laat de teststrip ± 2 min. Reageren.
- Vergelijk de kleuren met de bijbehorende kleurenschaal.
- Noteer de gegevens in onderstaande tabel.

	1.	2.	3.	4.
Leukocyten				
Nitriet				
pH				
Eiwit				
Glucose				
Ketonen				
Urobilinogeen				
Bilirubine				
Hemoglobine				
S.m.				

Urine sediment maken

De praktische uitvoering van het maken van een urinesediment verloopt als volgt.

- 1 Centrifugeer een centrifugebuis (puntbuis) met urine gedurende drie minuten bij 1.500-2.500 toeren per minuut. Je centrifugeert relatief kort en langzaam om de eventueel aanwezige, uiterst breekbare cilinders niet stuk te draaien.
- 2 Giet hierna in een enkele beweging de vorenstaande urine af en veeg de overtollige urine van de buitenkant van de buis.
- 3 Schud het sediment onder in de punt van de buis heel zorgvuldig los: niet heen en weer ratsen over een rekje of tikken tegen het tafelblad!
- 4 Na het opschudden laat je het sediment in de buis naar voren lopen tegen de punt van een dekglasje. Ten gevolge hiervan hecht zich weinig sediment aan het dekglasje.
- 5 Het dekglasje plaats je nu onder een hoek van ongeveer 45° op het voorwerpglasje en laat het daarna los, zodat het op het voorwerpglasje komt te liggen. Het sediment zal zich zeer gelijkmatig, maar vooral in een dunne laag onder het dekglasje verspreiden. Als het preparaat te dun is, zullen er luchtbelletjes ontstaan. Dit moet je voorkomen.

Afbeelding 4.1: sediment op dekglasje brengen en op voorwerpglasje leggen



Beoordelen urinesediment

Leg het preparaat onder een microscoop die van tevoren is ingesteld op weinig belichting. Bekijk het met een vergroting van 100 X: (10 X 10) en beoordeel het preparaat daarna met een vergroting van 400 X: (10 X 40).

Zoals al is vermeld, geef je voor leukocyten en erythrocyten het gemiddelde aantal cellen in 5 gezichtsvelden door. Bij meer dan gemiddeld 30 cellen per gezichtsveld mag je 'veel' vermelden. Voor de overige bestanddelen vermeld je: 'weinig', 'matig' of 'veel'.

De gezichtsvelden kies je door met een slangenbeweging eerst heel het preparaat te bekijken, om zo een totaalbeeld te krijgen. Is het sediment erg troebel door amorfe zouten, dan is het beoordelen vaak zeer moeilijk, daar dan eventueel aanwezige leukocyten of erythrocyten niet meer te zien zijn. Je moet dan zure urine even onder de warme kraan houden en basische urine licht aanzuren met 6%-azijnzuur.

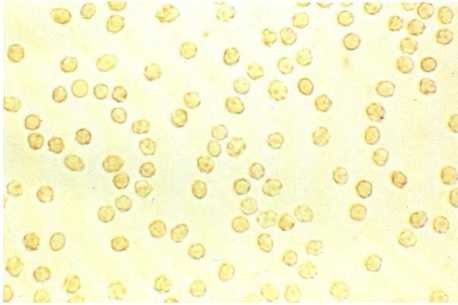
Hierna opnieuw een sediment afdraaien en beoordelen. Soms kan je ook een duidelijker beeld krijgen door een kleurmethode toe te passen (bv. Sedicolor). Hierbij worden de cellen gekleurd en de kristallen niet.

Opdracht 4.3: Urinesediment

- Maak een urinesediment en beoordeel deze.
- Maak eventueel gebruik van de afbeeldingen op de volgende bladzijde.
- Noteer de gegevens in onderstaande tabel.

	1.	2.	3.	4.
Cellen - Erytrocyten - Leukocyten - Epitheelcel				
Cilinders				
Bacteriën				
Kristallen				
Amorfe zouten				
Slijmdraden				
Verontreiniging				

Extra: Hulp bij beoordelen urinesediment



Ery's



leukocyten



bacteriën



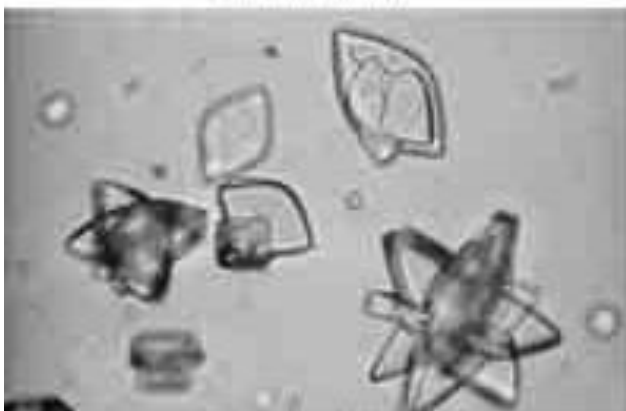
Epitheel cellen



Calciumoxalaat



Triphosfaat



Urinezuur

Hoofdstuk 5: Feces onderzoek

Stoornissen in de spijsvertering kun je vaststellen door een verteringsonderzoek en feces onderzoek op wormeieren kan duidelijkheid verschaffen over een eventuele worminfectie.

Normaal heeft feces een vaste vorm, een bruine kleur en een geringe geur.

- Diarree
 - Te snelle darmpassage door stress
 - Storing in de vertering (vetten, koolhydraten, eiwitten)
Onverteerde voedselbestanddelen houden vocht vast.
 - Aanwezigheid van parasieten
- Kleurverandering
 - Bruine kleur wordt veroorzaakt door afbraak van rode bloedcellen.
 - ⇒ Donkerder of heel bleek kan duiden op afwijking in aanmaak van nieuwe rode bloedcellen
 - Rood => Aanwezigheid van vers bloed => beschadiging achter in de darm
 - Zwart => Aanwezigheid van oud bloed => beschadiging voor in de darm
- Geurverandering
 - Rotten eierenlucht=> eiwitten onvoldoende verteerd en gaan rotten

Daarnaast kunnen er verschillende onderzoeken worden uitgevoerd. Zo kan er op wormeieren worden gezocht, maar ook vet en zetmeel kan worden opgespoord als het aanwezig is in de mest (feces)

Laboratoriumdiagnostiek

Voor het stellen van een diagnose van een parasitose is kwalitatief onderzoek op wormen en wormeieren meestal voldoende. Soms moet kwalitatief onderzoek nog aangevuld worden met kwantitatief onderzoek, dus het vaststellen van het aantal wormeieren per bepaalde hoeveelheid onderzoekmateriaal. In dit hoofdstuk wordt echter alleen het kwalitatief, eenvoudigste onderzoek behandeld.

Fecesmonsters

Voor het nemen van fecesmonsters is het belangrijk dat je zo hygiënisch mogelijk werkt, dit om jezelf, maar ook anderen te beschermen tegen infecties.

In elk geval moet je over een aantal attributen beschikken, zoals: plastic handschoenen, houten spatels, verzamelpotjes, bij voorkeur van plastic met schroefdop. Verder moet je een aantal algemene regels i.v.m. het opvangen van feces goed in acht nemen:

- Als een onderzoek van feces niet meteen na afname wordt uitgevoerd, kan je het beste het fecesmonster, goed afgesloten, in het potje in de koelkast bewaren. Dit o.a. om te voorkomen dat de eventueel aanwezige wormeieren zich verder gaan ontwikkelen tot het embryonale stadium (larvale stadium).
- Als de feces verstuurd moet worden naar een laboratorium, doe dit dan onmiddellijk na de monsterafname.
- Voorzie ieder fecesmonster van de nodige gegevens op het etiket van het potje. Belangrijke gegevens kunnen zijn: diersoort, eigenaar van het dier, datum en het uur van afname.
- Geef duidelijk aan welk onderzoek gewenst is.

Bij de afname van fecesmonsters maak je onderscheid tussen individuele monsterafname en mengmonsters.

Individuele monsterafname gebeurt meestal rectaal en wordt veelal door de dierenarts zelf verricht. Hiervoor gebruikt hij meestal een plastic handschoen. Zodra voldoende feces ingezameld is, wordt de handschoen binnenstebuiten gekeerd, zorgvuldig dichtgeknoopt en voorzien van de nodige gegevens naar het laboratorium gebracht. Een dergelijk rectaal verzamelen van feces gebeurt meestal alleen bij grotere dieren. Rectale monsterafname bij kleine huisdieren gebeurt vaak met de thermometer of met een staafje.

Als je de eigenaar van een huisdier zelf feces van zijn dier wilt laten verzamelen, is het belangrijk dat de eigenaar duidelijke aanwijzingen hiervoor krijgt. De eigenaar doet dit verzamelen dan niet op bovenstaande wijze, maar vangt feces op via een bodem die vooraf grondig schoongemaakt is. Opvangen op een stuk schoon plastic voldoet uitstekend.

Met mengmonsters probeer je een idee te krijgen over de infectiegraad van een groep dieren, bv. in een stal, een kennel. Je neemt dan een of meer monsters uit de totale hoeveelheid in 24 uur geproduceerde feces van een stal.

Het onderzoek op vetten

Onverteerd vet is in de ontlasting aanwezig in de vorm van vetbolletjes die als oranje rode bolletjes te zien zijn als je de feces kleurt met Sudan III.

Bij aanwezigheid van veel vetten kan je ook vetzuren aantreffen. Deze zijn ingekapseld. Door het preparaat te verwarmen komen de vetzuren vrij en na afkoelen kristalliseren ze uit in de vorm van naaldvormige kristallen (vetzuren naalden).

De praktische uitvoering van het onderzoek is als volgt.

- 1 Homogeniseer de feces met een spateltje.
- 2 Meng op een objectglaasje een speldenkop feces met een druppel Sudan III.
- 3 Bedek het preparaat met een dekglasje.
- 4 Verwarm het zacht boven de spaarbrander tot er bolletjes ontstaan.
- 5 Laat het preparaat afkoelen.
- 6 Beoordeel het preparaat microscopisch met een vergroting van 400 X.

Het onderzoek op zetmeel

Aanwezig zetmeel is aantoonbaar door de feces met 4%-lugol te behandelen. Het preparaat wordt verwarmd om de celmembranen stuk te maken zodat de zetmeelcel zich kan kleuren. Onverteerd zetmeel kleurt lila/paars. Halfverteerd zetmeel kleurt bruin/rood.

De praktische uitvoering van het onderzoek is als volgt.

- 1 Homogeniseer de feces met een spateltje.
- 2 Meng op een objectglaasje een speldenkop feces met een druppel lugol.
- 3 Bedek het preparaat met een dekglasje.
- 4 Verwarm het zacht boven de spaarbrander (niet laten koken).
- 5 Laat het preparaat afkoelen.
- 6 Beoordeel het preparaat microscopisch met een vergroting van 400 X.

Opdracht 5.1: Beoordeling feces op vet en zetmeel

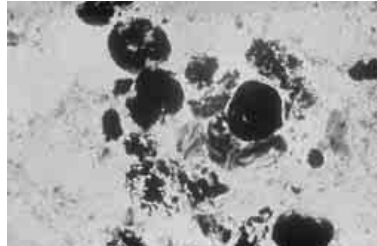
Onderzoek op vetten

Onderzoek het feces monster dat je hebt meegebracht op zetmeel en vetten.

Vetzuur naalden



Verteerd zetmeel



Vul voor beide onderzoeken de onderstaande tabel in.

Monster:	Aanwezigheid vetten	Aanwezigheid zetmeel

Fecesonderzoek op darmparasieten

Zelfs de grootst mogelijke hygiëne kan onze huisdieren (zoals kat en hond) niet beschermen tegen een worminfectie. Langs allerlei wegen kunnen ze met deze parasieten besmet worden: door de omgang met soortgenoten, door vlooiën en luizen, via de aarde, het water dat ze her en der drinken of door het eten van besmet vlees, vleesafval of vis. Jonge hondjes worden vaak al tijdens de dracht door de moederhond besmet.

De wormen vestigen zich in het lichaam op diverse plaatsen: in de longen, de lever, het hart, de darmen of elders en kunnen zich daar o.a. ingekapseld als cysten maandenlang in leven houden. Door middel van eieren en larven houden ze de soort in stand. Dit alles ten koste van de gastheer die hierdoor ernstig ziek kan worden, met klachten als steeds terugkerende diarree en een slechte algemene conditie. Via de ontlasting verlaten de parasieten hun gastheer. Soms als volledige wormen, soms in gedeelten. Soms als larven en vaak via eieren.

Een onderzoek van de ontlasting is dan ook de aangewezen weg om de aanwezigheid van bepaalde darmparasieten vast te stellen. Je doet dan een onderzoek naar wormeieren.

Vaak kan de dierenarts sneller vaststellen dat een dier besmet is met wormen, omdat ze met het blote oog zijn waar te nemen. Te denken valt aan delen van lintwormen die in de haren van hond of kat hangen, of aan pups die spoelwormen uitbraken.

Wormsoorten

In ons land komen een tien tot twintigtal verschillende wormsoorten voor. De belangrijkste wormen die bij honden en katten worden aangetroffen, zijn in twee groepen in te delen, nl.: de rondwormen of nematoden en de lintwormen of cestoden. Tot de ronde wormen behoren verschillende soorten: spoelwormen, zweepwormen en haakwormen; ook onder de lintwormen kan je een aantal soorten onderscheiden.

Macroscopisch en microscopisch onderzoek

Voor het kwalitatieve onderzoek dat in dit hoofdstuk behandeld wordt, wordt verder onderscheid gemaakt tussen macroscopisch en microscopisch onderzoek.

Macroscopisch onderzoek van feces kan snel een oriënterende diagnose opleveren. Dit kan bv. mogelijk zijn als je volwassen wormen, segmenten van lintwormen e.d. met het blote oog kan waarnemen. Proglottiden van lintwormen worden in de feces vrij gemakkelijk herkend als ze nog bewegen. Ze kunnen nog gedeeltelijk aaneengeregen zijn.

Deze proglottiden, maar ook kleinere wormsoorten, kunnen verder nog geïsoleerd worden door zeven. Hiertoe wordt de feces uitgespoeld met leidingwater op een zeef (mazengrootte 0,3 mm of kleiner).

Bij microscopisch onderzoek onderscheid je drie methoden:

- directe methode
- flotatiemethode
- kleefbandmethode

Bij de directe methode gebruik je voorwerp- en dekglasje.

De praktische uitvoering verloopt als volgt.

- 1 Breng midden op een voorwerpglaasje een druppel leidingwater aan.
- 2 Hierin een 'speldenknop' feces aanbrengen en zodanig uitspreiden, dat je een betrekkelijk homogeen en goed doorschijnend geheel verkrijgt. Grove delen opzij schuiven.
- 3 Het geheel afdekken met een dekglasje.
- 4 Met een vergroting van 10 X 10 het gehele preparaat systematisch onderzoeken.

Met deze uiterst eenvoudige methode is het mogelijk zowel wormeieren als zeer kleine wormen of larven aan te tonen, maar je moet daar wel de nodige ervaring in hebben. Plantencellen, luchtbellen etc. kunnen zeer storend werken. Bovendien beoordeel je maar een zeer beperkte hoeveelheid feces. Een negatief resultaat is dus zeker niet altijd betrouwbaar.

Wil je wat meer kans hebben om wormeieren in een preparaat aan te treffen, dan pas je de zg. flotatiemethode toe, waarbij de eieren uit een fecesmonster geconcentreerd worden op een enkele plaats. Dit bereik je door wat feces te mengen met een verzadigde keukenzoutoplossing (d.i. zoveel keukenzout in water oplossen, tot een verzadiging is bereikt en het niet meer oplost, maar naar de bodem zakt). De in de feces aanwezige wormeieren zijn in deze oplossing nu zo licht van gewicht, dat ze naar het oppervlak van de vloeistof stijgen.

Als je nu op het oppervlak van de vloeistof een dekglasje laat drijven, zullen de wormeieren aan de onderkant van dit glasje vastkleven. Na enige tijd haal je het dekglasje voorzichtig met een pincet weg, om het vervolgens op een voorwerpglaasje aan te brengen. Je hebt dan een geconcentreerd wormeierenpreparaat.

De praktische uitvoering van de flotatiemethode is als volgt.

- 1 Een plastic zakje met feces wordt door kneden goed gemengd.
- 2 Vervolgens een maatcilinder van ca. 150 ml vullen met een verzadigde keukenzoutoplossing.
- 3 Ongeveer 6 gram feces uit het zakje nemen en de inhoud van de maatcilinder uitgieten over de feces in bv. een plastic bekertje. De feces met bv. een stokje goed vermengen met de verzadigde keukenzoutoplossing.
- 4 Vervolgens de fecessuspensie door een zeefje of door een trechter met wat verbandgaas teruggieten in de maatcilinder.
- 5 Op het oppervlak van de suspensie een dekglasje aanbrengen zodat het blijft drijven.
- 6 Na een flotatie (stijgen van de eieren) van 20-30 minuten het dekglasje met een pincet van het oppervlak afnemen en op een voorwerpglaasje leggen.
- 7 Beoordeel het concentratiepreparaat vervolgens microscopisch bij een vergroting van 100 X op wormeieren. (Ook oöcysten, bv. bij coccidiose van konijnen, kunnen zo met grotere trefkans worden aangetoond.)

De derde methode bij microscopisch onderzoek van feces is de kleefbandmethode. Met een doorschijnende kleefband, die tegen de anus wordt gedrukt, worden de wormeieren opgenomen, die dan rechtstreeks onder de microscoop onderzocht kunnen worden. Bij de hond pas je de kleefbandmethode wel toe als je de eieren van *Trichuris vulpis* (zweepwormen) wilt opsporen, die veelal rond de anus kleven. Ook kan je zo wel segmenten van lintwormen opsporen.

De praktische uitvoering is als volgt.

- 1 Om zo weinig mogelijk verontreinigingen in het preparaat te verkrijgen, kan je het best de dag voor de monsterafname de zone rond de anus goed reinigen.
- 2 Plak de kleefband op de anusplooi en druk deze goed aan.
- 3 Hierna de kleefband op een voorwerpglasje plakken en microscopisch onderzoeken.

Met de hiervoor beschreven methoden voor kwalitatief onderzoek kan je snel en betrekkelijk eenvoudig laboratoriumonderzoek verrichten.

Wormeieren in feces

Er zijn verschillende testen om de feces te onderzoeken op wormeieren. Hieronder staan een aantal wormeieren die je tegen kunt komen.

Wormei van *Toxocara canis* (spoelworm hond) en *Toxocara cati* (spoelworm kat):



- ongeveer bolvormig, soms wat langwerpig
- een dikke, vrij ruwe schaal
- donkerbruine tot zwarte, korrelige inhoud, die meestal volledig de eischaal vult
- te onderscheiden van het ei van *Toxocaris leonina*, dat een Gladde kleurloze schaal heeft en een geelbruine inhoud
- het wormei van *Toxocara canis* is wat groter dan van *Toxocara cati*.

Wormei van *Toxocaris leonina* (spoelworm bij zowel hond als kat):



- bolvormig tot licht ovaal
- een gladde en kleurloze schaal
- geelbruine korrelige inhoud, die het ei slechts gedeeltelijk vult
- goed te onderscheiden van de andere spoelwormeieren, die een ruwe schaal hebben en een bruine tot zwarte inhoud.

Wormei van *Trichuris vulpis* (zweepworm bij de hond):



- citroenvormig met twee duidelijk uitstekende en doorschijnende poolproppen
- een dikke schaal met een glad oppervlak
- bruine, gekorrelde inhoud.

Wormei van *Ancylostoma caninum* (haakworm bij de hond) en *Ancylostoma tubaeforme* (haakworm bij de kat):



- een dunne, gladde schaal
- een enigszins ovoïde vorm, d.w.z. stompe polen en bolle zijwanden, de inhoud is gevuld met 2 tot 8 blastomeren (de eerste delingscellen van een bevruchte eicel).

Wormei van *Taenia pisiformis*, *Taenia hydatigena* en *Echinococcus granulosus* (lintwormen bij honden en katten, die gewervelde dieren (taeniasoorten) of zoogdieren (echinococcus) als tussengastheer hebben):



- bolvormig
- een dikke gladde schaal die radiaal gestreept is (als de spaken van een wiel)
- bevat een zeshakig embryo

Wormei van *Dipylidium caninum* (lintwormen bij hond en kat, die de vlo of de luis als tussengastheer hebben):



- bolvormige eitjes, die als pakketjes in een eikapsel liggen
- donkerbruin tot geelachtig
- bevatten een zeshakig embryo.

Opdracht 5.2: Aanwezigheid van wormeieren in feces

Benodigdheden:

- Spatel / roerstaaf
- Fecal Ova 3 step
- Fasol
- Faeces
- Pincet
- Dekglaasje
- Objectglaasje

Werkwijze:

- Open de Fecal Ova-buis.
- Verwijder het blauwe filter.
- Doe m.b.v het filter één flinke schep feces in de Fecal Ova-buis.
- Vul de buis tot de eerste lijn met fasol
- Steek het filter in de Fecal Ova-buis tot halverwege de vloeistof.
- Homogeniseer het geheel door het filter op en neer te draaien.
- Steek het filter tot onderin de Fecal Ova-buis.
- Vul aan met fasol tot een kleine bolling op het filter.
- Leg een dekglaasje op de fasol.
- Laat het geheel 15 – 20 min. Staan.
De eitjes drijven omhoog tegen het dekglaasje.
- Neem met een pincet het dekglaasje van het filter af.
- Leg het dekglaasje met de natte kant naar beneden op het objectglaasje.
- Beoordeel het preparaat bij een vergroting van 400 x.

Monster _____

Soort wormeitje	Hoeveelheid

Monster _____

Soort wormeitje	Hoeveelheid

Opdracht 5.3: Aanwezigheid van zand in paardenfeces

Benodigdheden:

- Bekerglas
- Water
- Roerstaaf
- Feces paard

Werkwijze:

- Paardenfeces in bekerglas.
- Voeg ruim voldoende water toe.
- Roer tot een de feces helemaal is opgelost.
- Laat het geheel enkele minuten staan.
De normale fecesbestanddelen zullen drijven, het zand zinkt naar de bodem.
- Giet de fecesbestanddelen en het water af.
Wat in het bekerglas achterblijft is zand.

Beoordeel het fecesmonster op de hoeveelheid zand

Monster _____ bevat wel / geen zand.

De mate waarin zand is gevonden _____

Monster _____ bevat wel / geen zand.

De mate waarin zand is gevonden _____

Hoofdstuk 6: Microbiologisch onderzoek

De naam zegt het al: microbiologie gaat over hele kleine organismen. Je kunt micro-organismen dan ook niet met het blote oog zien. Daar heb je een microscoop voor nodig. In een laboratorium kun je bacteriën kweken op voedingsbodems om ze goed te kunnen bestuderen en om uit te zoeken hoe onschadelijk te maken zijn. Hoe dit in zijn werk gaat, leer je in dit hoofdstuk.

Micro-organismen

Micro-organismen zijn, zoals de naam al aangeeft, uiterst kleine organismen die met het blote oog niet waarneembaar zijn.

In de veterinaire geneeskunde interesseren we ons natuurlijk vooral voor de ziekteverwekkende of pathogene micro-organismen.

Alvorens je je daarin gaat verdiepen, is het noodzakelijk te weten dat een globale indeling de micro-organismen indeelt in een aantal die behoren tot het plantenrijk zoals: de bacteriën en de schimmels. Andere micro-organismen behoren tot het dierenrijk, zoals de eencellige diertjes of protozoën. Virussen zijn moeilijk onder te brengen in het planten- of dierenrijk; zij vormen een aparte groep.

Indeling

Je kunt micro-organismen indelen in een groep die tot het plantenrijk behoort, een groep die tot het dierenrijk behoort en een groep die noch tot het dierenrijk, noch tot het plantenrijk behoort.

Micro-organismen die tot het plantenrijk behoren

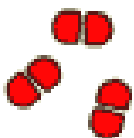
Micro-organismen die tot het plantenrijk behoren zijn bacteriën en schimmels.

Bacteriën

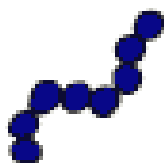
Bacteriën zijn naar vorm in te delen.

Kokken: ronde bolvormige bacteriën die zich na deling op verschillende manieren rangschikken op grond waarvan je ze onderverdeelt in:

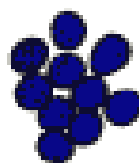
- diplokokken: die paarsgewijs gerangschikt zijn (A)
- streptokokken: die in kettinkjes gerangschikt zijn (B)
- stafylokokken: die in zg. druiventrosjes gerangschikt zijn. (C)



A



B



C

Enkele voorbeelden van kokken zijn:

- gonokokken: veroorzaken de geslachtziekte gonorroe
- meningokokken: veroorzaken nekkrimp
- pneumokokken: veroorzaken longontsteking
- pyogene streptokok die talrijke ontstekingen kan veroorzaken
- viridans streptokokken die als commensaal* leven op slijmvliezen en huid.
- enterokokken zijn streptokokken die als commensaal in de ingewanden leven en bij verminderde weerstand een darmontsteking (enteritis) kunnen veroorzaken
- de *staphylococcus aureus*: een stafylokok die normaal als commensaal op de huid, de slijmvliezen of in de keel wordt aangetroffen maar die bij verminderde weerstand de veroorzaker is van veel soorten huidinfecties. Tegenwoordig is de bacterie vooral berucht om het feit dat hij resistent (on gevoelig) is geworden voor veel antibiotica. (MRSA= Meticilline Resistant Staphylococcus Aureus.)

(* Commensalen zijn bacteriën die als gast leven op een gastheer zonder deze te schaden. Ze worden pathogeen bij verminderde weerstand van de gastheer.)

Staven: Staafvormige bacteriën, ook wel bacillen genoemd. Soms kort en dik, soms lang en dun met meestal afgeronde of wat opgezwollen uiteinden.

Enkele voorbeelden zijn:

– colibacil (A): een commensale darmbewoner die nuttig is bij de vertering van voedselresten maar die tegelijkertijd de veroorzaker kan zijn van darminfecties en urineweginfecties

– tuberkelbacil: de veroorzaker van tuberculose

– tetanusbacil: kan nekkrimp veroorzaken en 'klem' in de kaken.

vibrionen Vibrionen of spirillen (B): spiraalvormige of kommavormige bacterie.

spirillen Een voorbeeld is de cholerabacterie die cholera veroorzaakt.



A



B

Bacteriën kun je, naast naar vorm, ook naar zuurstofbehoefte onderverdelen:

- aërobe bacteriën, die zuurstof nodig hebben om zich te kunnen vermenigvuldigen.
- anaërobe bacteriën, die zich niet kunnen vermenigvuldigen bij de aanwezigheid van zuurstof. Voor hen is zuurstof dus giftig.

De meeste pathogene bacteriën zijn aëroob; een uitzondering hierop is o.a. de Tetanusbacil, die dus anaëroob is.

Vermenigvuldiging

Bacteriën vermenigvuldigen zich door binaire deling, d.w.z. uit een enkele bacterie ontstaan er twee. En dit gebeurt dan door dwarsdeling. Sommige bacteriën vormen sporen. Sporen zijn restoverblijfselen van bacteriën die gedood zijn. Onder gunstige omstandigheden kunnen deze sporen weer tot ontwikkeling komen en ontstaat weer een nieuwe bacterie. Een bekend voorbeeld hiervan is de miltvuurbacil. Als deze bacil gedood is, kunnen toch jaren daarna uit de sporen weer nieuwe miltvuurbacillen ontstaan.

Aanraking met M.O.

Als een dier geneest van een bacteriële of virale infectie, heeft het vaak tegen zo'n infectieus ziektebeeld een zekere weerstand opgebouwd. Je zegt dan dat dit dier immuun is geworden voor dit ziektebeeld.

Als zo'n ziekte overwonnen wordt, heeft de patiënt antistoffen gevormd tegen een bepaalde soort bacteriën of virussen. Deze antistoffen circuleren dan voor een groot gedeelte in het bloed. In dit verband noem je de ziektekiemen nu de antigenen. Je kan dus zeggen dat een dier ziek kan worden door het binnendringen van antigenen (bacteriën met hun toxinen of virussen) en dat het bij gunstig doorstaan van zo'n infectie antistoffen heeft gevormd, d.w.z. immuniteit heeft opgebouwd.

Het begrip immuniteit kan je weer onderverdelen in twee soorten immuniteit, nl. actieve immuniteit en passieve immuniteit.

Je spreekt van actieve immuniteit als het dier zelf de antistoffen tegen een antigeen heeft opgebouwd d.m.v. het doorstaan van de infectieziekte. Van passieve immuniteit spreek je als een ziek dier bepaalde antistoffen toegediend krijgt en zodoende immuun wordt voor een bepaalde infectie.

Micro-organismen die tot het dierenrijk behoren

Protozoa zijn micro-organismen die tot het dierenrijk behoren. Het zijn eencellige diertjes die, hoewel ze vele malen groter zijn dan bacteriën, ook tot de micro-organismen gerekend worden. Bij kleine huisdieren zijn de belangrijkste protozoa:

- de trichomonas (verwekkers van "het geel" bij duiven)
- de coccidiën (verwekkers van coccidiose bij o.a. konijnen en vogels) en
- de toxoplasma gondii (veroorzaakt het ziektebeeld toxoplasmose bij veel diersoorten en ook bij de mens).

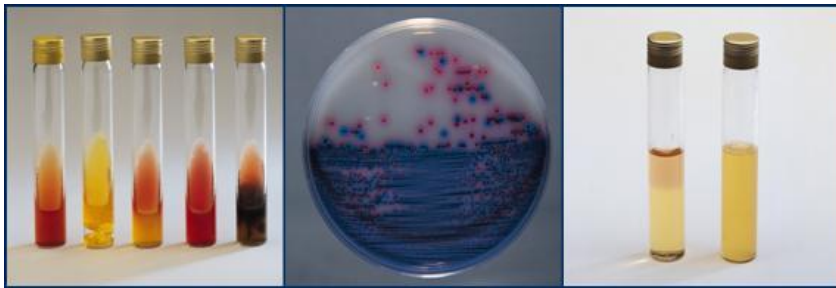
Kunstmatige voedingsbodems

De pathogene bacteriën die leven en zich vermenigvuldigen ten koste van dieren, voelen zich kennelijk thuis op weefsels en in lichaamsvloeistoffen van dieren.

Wil je echter in een laboratorium deze pathogene bacteriën in vitro (buiten het lichaam) laten groeien, dan is dit mogelijk op kunstmatige voedingsbodems. Deze voedingsbodems bevatten allerlei stoffen die gunstig zijn voor bepaalde bacteriën om tot ontwikkeling te komen. Uiteraard moet dan ook weer groei plaatsvinden onder condities van een gunstige temperatuur, zuurgraad en wel of geen zuurstof.

Kweken van bacteriën in een laboratorium kan noodzakelijk zijn om ze goed te kunnen bestuderen en om uit te zoeken hoe je ze voor het dier onschadelijk kan maken. Je hebt dan de mogelijkheid om ze microscopisch te beoordelen en ze op basis van typerende eigenschappen als vorm, groeiwijze te identificeren. Uiteraard met het doel het ziektebeeld van een patiënt te kunnen diagnosticeren. Ook is er vaak een tweede doel, nl. het vaststellen van een therapie.

Op een kunstmatige voedingsbodem (A) heeft men een goede gelegenheid om na te gaan of na toevoeging van bepaalde medicamenten (meestal antibiotica zoals penicilline) de bacteriën hierop nog willen groeien (resistentietest) (B). Worden ze door toevoeging van antibiotica geremd in hun groei, dan betekent dat dat je zo'n antibioticum ook aan het zieke dier kunt geven om het te genezen.



A



B

Er zijn verschillende soorten kunstmatige voedingsbodems. Je maakt gebruik van vloeibare en vaste voedingsbodems. De vloeibare voedingsbodems zijn uitsluitend geschikt voor het vermeerderen van bacteriën; de *vaste voedingsbodems* lenen zich bovendien voor het isoleren en het in zuivere cultuur brengen van stammen van bacteriën.

Gebruik voedingsbodems

Voor de diagnostiek of voor het conserveren van bacteriën gebruik je in een bacteriologisch laboratorium de volgende vaste/vloeibare voedingsbodems:

- Algemene voedingsbodems
- Verrijkte voedingsbodems
- Speciale voedingsbodems
- Selectieve voedingsbodems
- Determinerende voedingsbodems

De algemene voedingsbodems zijn geschikt voor het kweken van vrijwel alle pathogene bacteriën, maar je kan er niet diagnostisch mee werken. Zij worden gebruikt om bacteriën zo lang mogelijk in een goede conditie te houden, om ze later te kunnen overenten op diagnostische voedingsbodems. Bijvoorbeeld een keeluitstrijk kan je eerst enten op een algemene voedingsbodem. Deze wordt dan verzonden naar het bacteriologisch laboratorium en hier gaat men er verder mee werken. Voorbeelden zijn vleesbouillon (vloeibaar) en bouillonagar (vast).

De verrijkte voedingsbodems zijn door toevoeging van groeibevorderende stoffen geschikt gemaakt voor veeleisende bacteriën. Een bekend voorbeeld hiervan is bloedagar (dus agarose waaraan bloed is toegevoegd).

speciale voedingsbodems zijn door een bijzondere samenstelling geschikt gemaakt voor een enkele speciale groep van bacteriën. Bijvoorbeeld alle grampositieve bacteriën groeien er goed op en de gramnegatieve bacteriën niet. Je noemt bacteriën grampositief als ze bij de kleuring volgens Gram violet kleuren, terwijl de gramnegatieve bacteriën (roze)rood kleuren.

Verderop in dit hoofdstuk wordt de gramkleuring nog beschreven.

Met deze speciale voedingsbodems kan je dus al enigszins diagnostisch werken.

Bijvoorbeeld: vrijwel alle urineweginfecties worden veroorzaakt door gramnegatieve bacteriën.

Zoals de naam al aangeeft, kan je door enten op selectieve voedingsbodems uiterst selectief te werk gaan. Als je bijvoorbeeld de spirocheten, die de ziekte van Weil veroorzaken, wil kweken, is daar een selectieve voedingsbodem voor. Alle andere bacteriën groeien hierop niet. Je verkrijgt zo een zg. “reinkweek”.

Met determinerende voedingsbodems kan je tot slot een bepaalde eigenschap van bacteriën onderzoeken, bijvoorbeeld de vorming van zuur uit suikers of een bepaalde kleuomslag door specifieke chemische reacties.

Het enten van een voedingsbodem

Materiaal pakken

Vaak gebruik je een steriel wattenstokje om bv. pus of ander onderzoekmateriaal te verzamelen. Zo'n steriel wattenstokje zit bevestigd aan de stop van een steriele buis en kan daar na het opvangen van het materiaal weer in terug. Je kan dan m.b.v. zo'n wattenstokje rechtstreeks enten op een voedingsbodem.

Heel weinig van dergelijk materiaal wordt nu gebruikt voor enting op een voedingsbodem. Je hebt bijvoorbeeld maar een enkel öse-“lusje” urine nodig om een hele voedingsbodem te enten.

Het enten op een vaste voedingsbodem gebeurt door een “lusje” materiaal uit te strijken over een zo groot mogelijk oppervlak en in een vloeibare voedingsbodem door eenvoudig een “lusje” materiaal in de vloeibare voedingsbodem te dompelen.

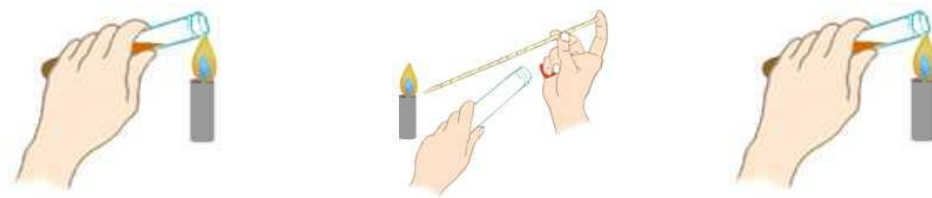
Flamberen

Denk vooral na enting aan het uitgloeien van de öse en het flamberen van het buisje, potje, flesje etc. alvorens deze worden afgesloten.

Sta nog even stil bij het zg. flamberen (door de top van een vlam halen) van o.a. de hals van een steriel flesje. Bij de öse heb je al gezien dat je deze voor en na iedere handeling door de top van een vlam moet halen.

Als je, voor welke behandeling dan ook, de wattenprop van een buis moet halen (of het deksel of de stop van een potje of flesje), moet je je realiseren dat niet-steriele lucht in de buis kan komen en zo het entmateriaal kan verontreinigen. Het is daarom de gewoonte dat bij het openen van een buis altijd de bovenrand door de top van een vlam wordt gehaald, zowel bij het openen als bij het weer sluiten.

Je neemt de stop of de wattenprop tussen de pink en de palm van de rechterhand waardoor je met de linkerhand in de gelegenheid is het buisje of flesje door de vlam te halen. Zodra dit klaar is, draai je met de linkerhand de stop of de prop weer op z'n plaats.

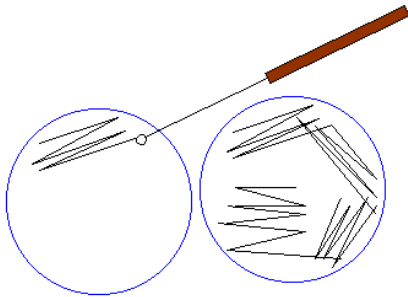


Stappen van het flamberen

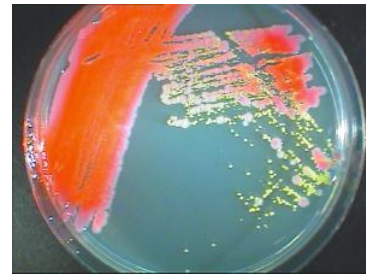
Voedingsbodem enten

Om een bacterie te kunnen determineren (naam geven) is het belangrijk dat je één enkele soort per keer determineert. Hiervoor is een reinstrijk nodig. Een reinstrijk maak je als volgt:

- Flambeer de entnaald / öse
- Koel de entnaald af
- Til het deksel van de agarplaat aan één kant iets op
- Neem met de entnaald materiaal van één kolonie / urinedruppel / etc.
- Strijk dit af op een agarplaat door 3 a 5 evenwijdige strepen te trekken
- Flambeer de entnaald en laat deze afkoelen (evt. controleren door de entoog tegen de agar aan te drukken)
- Haal de öse uit de agarplaat en draai de plaat een kwartslag
- Maak nu met de entnaald weer drie streken, door de twee voorgaande streken.
- Draai de öse op en draai de agarplaat weer een kwartslag
- Maak nu met de entnaald weer drie streken, waarvan je er één door de voorgaande strijkt.
- Draai de agarplaat nog één maal een kwart en maak nogmaals enkele strepen. Zorg dat je de eerste strepen niet haalt.
- Flambeer de entnaald



Stappen reinstrijk



Resultaat reinstrijk

Kweken van Bacteriën

Als de reinstrijk is gemaakt gaan de plaat in de broedstoof.

De beënte voedingsbodems worden geplaatst in een broedstoof bij 37 °C. Na 12 tot 24 uur (soms eerder) ontstaan nu op een vaste voedingsbodem zg. kolonies van bacteriën, waarbij iedere kolonie is ontstaan uit een enkele bacterie. Iedere bacteriesoort heeft zijn eigen typische kolonievorm: sommige kolonies zijn rond, glad en slijmerig, andere zijn juist weer minder rond, ruw en droog. Ook verschillende kleuren kunnen worden aangetroffen. Wil je naast elkaar liggende kolonies verkrijgen, dan is het zaak om niet te “dik” te enten.

Grampreparaat maken

Als je een kolonie microscopisch wilt onderzoeken, pik je de kolonie met een öse van de voedingsbodem af, strijk je deze met dezelfde öse uit over een gedeelte van een voorwerpglasje om vervolgens dit microscopisch onderzoekmateriaal te fixeren (vasthechten aan het glasje).

Het fixeren van het preparaat

Dit bereik je door het glasje met een pincet langzaam 3 keer door de blauwe vlam te halen (flamberen).

De eiwitten waaruit de bacterie bestaat, worden tijdens het fixeren gedenatureerd waardoor de bacterie haar pathogene eigenschappen verliest (zij is dood) en de kleurstoffen beter opneemt.

Bovendien zit het materiaal nu goed vastgehecht aan het glasje en dat is nodig omdat het anders tijdens de kleuring weggespoeld zou kunnen worden.

Samengestelde kleuring (Gram kleuring)

Gebruik je meer kleurstoffen, dan spreek je van een samengestelde kleuring. Een voorbeeld hiervan is de kleuring volgens Gram.

Bij deze kleuring wordt een preparaat gekleurd met een bepaalde kleurstof waarna je een oplosmiddel voor deze kleurstof op het preparaat laat inwerken. Sommige delen van de cel worden nu ontkleurd; andere delen, die de kleurstof beter vasthouden, worden niet ontkleurd. Vervolgens wordt het preparaat met een andere kleurstof nagekleurd.

Bij de gramkleuring noem je de bacteriën die door alcohol ontkleurd zijn en door de fuchsine (roze)rood gekleurd zijn: gramnegatief. De bacteriën die de oorspronkelijke violette kleur van het kristalviolet-lugolmengsel behouden hebben (en dus de ontkleurende werking van de alcohol hebben weerstaan), noem je grampositief. (**P**aars = **p**ositief).

Opdracht 7.1: Wat zit er op mijn hand? (les 1 & 2)

Je gaat testen hoeveel bacteriën er op je hand zitten, voor het wassen en na het wassen.

- **Les 1:**
- Pak twee bloedplaten en codeer deze met je naam, datum, en wel / niet gewassen
- Vul een plastic handschoen met 50 ml water m.b.v. een bekeerglas
- Breng je hand in de handschoen en knijp de handschoen dicht bij de pols
- Kneed het water voorzichtig rond door de handschoen
- Haal voorzichtig je hand uit de handschoen
- Breng via een maatcilinder 5 ml op de plaat aan en verdeel het water over de plaat met een wattenstaaf
- Zet de plaat, met de deksel naar boven weg totdat de plaat droog is.
- Was nu je handen met zeep
- Herhaal bovenstaande handelingen op een nieuwe bloedplaat dit maal met gewassen hand
- Zet beide platen op de hoek van je tafel, met de deksel naar beneden zodat deze kunnen worden ingezet.
- De platen lezen we de **volgende** les af.
- **Les 2:**
- Zoek je eigen platen op
- Beschrijf wat je ziet en wat je opvalt

Niet gewassen hand

Gewassen hand

Opdracht 7.2: Reinstryk maken en kolonies beoordelen (les 1 & 2)

We gaan een reinkweek maken zodat we de bacteriën kunnen determineren

Les 1:

- Codeer de voedingsbodem op de bodem
- Maak eventueel het monster klaar
- Flambeer de entnaald / öse
- Koel de entnaald af
- Til het deksel van de agarplaat aan één kant iets op
- Neem met de entnaald materiaal van één kolonie / urinedruppel / etc.
- Strijk dit af op een agarplaat door 3 a 5 evenwijdige strepen te trekken
- Flambeer de entnaald en laat deze afkoelen
(evt. controleren door de entoog tegen de agar aan te drukken)
- Haal de öse uit de agarplaat en draai de plaat een kwartslag
- Maak nu met de entnaald weer drie streken, door de twee voorgaande streken.
- Draai de öse op en draai de agarplaat weer een kwartslag
- Maak nu met de entnaald weer drie steken, waarvan je er één door de voorgaande strijkt.
- Draai de agarplaat nog één maal een kwart en maak nogmaals enkele strepen. Zorg dat je de eerste strepen niet haalt.
- Flambeer de entnaald
- Zet de voedingsbodem op de kop weg, de **volgende les** beoordelen we de kolonies
- Les 2:
- Zoek je platen op
- Beoordeel de kolonies op vorm, kleur, geur en oppervlakte

	Vorm	Kleur	Geur	Oppervlakte
Kolonie 1				
Kolonie 2				
Kolonie 3				
Kolonie 4				

Opdracht 7.3: Grampreparaat maken (les 2)

We gaan een kolonie onder het preparaat bekijken

Les 2:

- Pak één kolonie met de (schone!) öse van je plaat af
- Strijk deze uit in het midden van een objectglaasje
- Fixeer het preparaat door het drie keer langzaam door een blauwe vlam te halen
- Laat het preparaat afkoelen
- Plak een klein stickertje op het glaasje met je eigen code
- Breng het preparaat naar de wasbak (alle preparaten worden tegelijk gekleurd door de docent)
- De kleuring is als volgt:
- Leg het preparaat op een kleurrekje en bedek het met een gefiltreerde kristalvioletooplossing.
- Laat 1 minuut inwerken.
- Schenk de kristalviolet af.
- Bedek het preparaat met een lugoloplossing.
- Laat 1 minuut inwerken.
- Schenk de lugol af en spoel het preparaat in een bekersglas met 96%-alcohol tot er geen kleurstof meer wordt afgegeven.
- Spoel het preparaat nu voorzichtig af met water (uit de spuitfles).
- Bedek het preparaat ten slotte met een fuchsine-oplossing.
- Laat 1 minuut inwerken.
- Spoel weer voorzichtig af met water (uit de spuitfles).
- Laat het preparaat aan de lucht drogen, door het schuin te plaatsen op een tissue.
- Als de kleuring gedaan is zoek je je eigen preparaat
- Beoordeel je preparaat met de 1000x vergroting en immersieolie op vorm en (gram)kleur

	Vorm	Kleur
Kolonie 1		
Kolonie 2		
Kolonie 3:		

