

ZIEKTEN & GEZONDHEID



Deze rubriek wordt verzorgd door de "Studiegroep voor ziekten, optimaal houden en kweken van terrariumdieren" van de belgische terrariumvereniging "Terra". Mocht U vragen hebben, die in het kader van deze rubriek passen, dan kunt U die rechtstreeks stellen aan de voorzitter van de Studiegroep: H. Claessen, A. Sterckstraat 18, B-2600 Berchem, België.

MIKROSKOPIE, DEEL I.

Door: H. Claessen, A. Sterckstraat 18, 2600 Berchem, België.

Inhoud: Inleiding - Mikroskopische gebieden - Mikroskopische technieken - Algemene handelingen - Mikroskopische uitrusting - Recepten - Glaswerk.

INLEIDING

Zoals reeds in vorige artikelen aangehaald, is de mikroskopie een zeer goede onderzoekingsmethode om de verschillende aandoeningen, lang voor het uitbreken van symptomen, te ontdekken. Gezien de belangstelling en vragen hierover, mogen wij concluderen dat vele terrariumliefhebbers zijn overgegaan op regelmatig faecesonderzoek bij hun dieren. Het onderzoek van zieke dieren en eventueel gestorven dieren moet zeker in de terrariumliefhebberij nog verder aangemoedigd worden.

Men moet trachten uit zo weinig mogelijk dieren (dood of levend) zo veel mogelijk informatie te

halen. De verkregen informatie over onderzoek, behandeling en verloop van aandoeningen moet gepubliceerd worden, zodat iedereen de ontwikkelingen kan blijven volgen aangaande behandeling van zieke dieren. Dat dit momenteel nog niet genoeg gebeurt, merkt men aan het feit dat nog regelmatig artikelen verschijnen in recente tijdschriften en boeken, die aangaande ziekten en behandeling uitgaan van fantasie tot verouderde of achterhaalde behandelingen. Dit is ook zeker te wijten aan het feit dat in bepaalde landen, bepaalde talen niet gelezen worden.

We willen in dit artikel de mikroskopische mogelijkheden wat verder uitdiepen en de verschillende laboratorium technieken belichten. We kunnen dan nagaan welke gebieden voor ons interessant zijn en hieraan een artikel wijden zodat er op den duur een reeks is ontstaan die zeker voor liefhebbers nuttig kan zijn.

MIKROSKOPISCHE GEBIEDEN

De gebieden die sterk mikroskopisch gericht en voor de medische- en geneeskundige takken van zeer groot belang zijn, zijn de volgende: bacteriologie, parasitologie en de histologie.

A. Bakteriologie

In de bacteriologie tracht men bacteriën, schimmels en gisten te bestuderen, door het maken van kleuringen, soms algemene-, soms ook specifieke kleuringen. Door mikroskopisch onderzoek kan men bepalen tot welke groep bacteriën de soort behoort. Schimmels en gisten kan men vrij gemakkelijk herkennen en opsporen. Van bacteriën kan men door verschillende kleuringen een onderscheid maken tussen bijvoorbeeld ronde, staafvormige, gram positieve (algemene bacteriën) en gram negatieve (pathogene bacteriën),

enz. Dit alles kan op eenvoudige wijze gebeuren, indien men over een aantal chemicaliën beschikt en de werkwijze kent. Men kan vrij snel slijm, etter, bloed en faeces onderzoeken op deze organismen. Het is dus een goed bruikbaar hulpmiddel voor de terrariumkunde en door amateurs gemakkelijk aan te leren.

B. Parasitologie

De parasitologie is eigenlijk ongeveer hetzelfde als de bacteriologie. Het enige wat verschilt, zijn de kleurtechnieken en behandeling van de materialen. Bijkomend zijn wel de preparatietechnieken om de parasieten te ontdekken in kleine hoeveelheid. De meeste technieken kunnen gemakkelijk door amateurs uitgevoerd worden, vooral indien men na verloop van tijd wat handigheid ontwikkelt. Er is geen bijkomende apparatuur voor nodig, alhoewel het met speciaal daarvoor bestemde apparatuur beter en aangenaamer werken is.

C. Histologie

Histologie is de leer van de weefsels. Door stukken weefsel, uit bijvoorbeeld lever, nier in zeer dunne plakjes te snijden, gemiddeld een monocellulaire laag van 0,001 tot 0,008 mm, kan men deze onder de mikroskoop bekijken na kleuring. De verschillende structuren worden aldus zichtbaar. Op deze wijze kan men ondubbelzinnig de veranderingen waarnemen die in het weefsel zijn ontstaan door de respektievelijke aandoeningen. Men kan dus bijna altijd de doodsoorzaak vaststellen, zelfs indien er geen uitwendige (makroskopische) veranderingen zichtbaar waren. Het is de uitgelezen methode voor bepaling van de doodsoorzaak. Helaas is een histologisch onderzoek tijdrovend, duur door het gebruik van vele chemikaliën, sterk aan ervaring gebonden en niet uitvoerbaar zonder speciale apparatuur.

MIKROSKOPISCHE TECHNIEKEN

De verschillende mikroskopische technieken die men gebruikt, zijn eigenlijk in elk gebied ongeveer hetzelfde. Ze zijn ontwikkeld om bepaalde problemen in het proces op te lossen. Men vindt ze overal terug, dus leek het ons beter deze technieken afzonderlijk te verklaren in een algemeen deel. De speciale technieken, eigen aan een bepaald gebied, zullen we in de beschrijving van dit gebied vernoemen. Dit heeft het voordeel dat men een bepaalde term, die een bewerking aanduidt, niet steeds moet verklaren. We willen in het algemeen deel het hoe en waarom van deze handelingen verklaren en de gebruikelijke terminologie aan de handelingen koppelen. De samenstellingen van de diverse oplossingen zijn als appendix gegeven.

ALGEMENE HANDELINGEN

De hieronder systematisch beschreven technieken zullen in de specifieke gebieden in een bepaalde volgorde worden verwerkt, zodat toch een speciaal resultaat ontstaat.

A. Bemonstering.

Bij bemonstering zal de te volgen handeling sterk afhankelijk zijn van het feit waarvoor men het monster wil gebruiken. Men zal een onderscheid maken of de te nemen parasieten dood of levend zullen onderzocht worden. Bij bacteriologisch onderzoek moeten de gebruikte materialen steriel zijn om vervuiling van het monster tegen te gaan. Bloed mag bijvoorbeeld niet stollen, anders is het niet meer behandelbaar. In de meeste gevallen wenst men ook dat het monster blijft zoals het is. Veranderingen kunnen de gezochte parasieten overwoekeren zodat nadien verkeerde konklusies getrokken worden. Al deze factoren in ogenschouw genomen raden

wij de volgende werkwijze aan:

-- Faeces

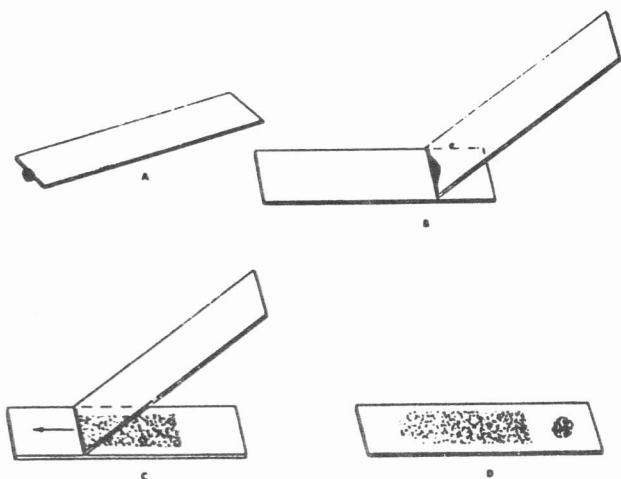
In een gesteriliseerd glazen potje van 10 à 20 ml wordt met een steriel lepeltje of spatel een beetje faeces ter grootte van een erwt gedaan. het beste kan men uit het binnenste van de faecesprop nemen. Dit is gewoonlijk nog vochtig. Dit wordt in het flesje gedaan en gevuld met enkele ml (2 à 4 ml) fysiologische zoutoplossing. Het flesje wordt gesloten en krachtig geschud. Zo behandeld, kan het monster enkele dagen bewaard blijven in de koelkast. Coccidiën, flagellaten en wormeieren kunnen hierin onderzocht worden. Om amoeben aan te tonen moet men binnen het uur het monster onderzoeken.

-- Etter

Aangezien wij etter praktisch altijd na kleuring onderzoeken, zullen wij het rechtstreeks op een voorwerpglasje brengen. Wij ontsmetten de wond of ontsteking zorgvuldig met ontsmettingsalcohol. Nu wordt de wond voorzichtig uitgeperst en de uitvloeiende etter opgevangen op één of enkele voorwerpglasjes. De etter op de glaasjes wordt uitgespreid in een dunne laag van ongeveer 1 cm² oppervlakte. Indien de etter te dik is kan men hem eerst mengen met één druppel fysiologische oplossing met een steriele naald. Nadien laat men de glaasjes zo snel mogelijk drogen, indien mogelijk door verwarming (40-50°C). De glaasjes kunnen nu lange tijd bewaard worden en zijn geschikt voor bacteriologisch onderzoek.

-- Bloed

Aangezien bloed het beste gekleurd kan worden alvorens te onderzoeken, maken wij direkt op een voorwerpglasje een uitstrijk. Dit gebeurt als volgt: wij brengen een druppel bloed op een voorwerpglasje en met behulp van een tweede



glaasje strijken we de druppel zo dun mogelijk uit. De eventueel te dikke randen worden voorzichtig met een doekje weggeveegd. Wij laten deze glaasjes nu aan de lucht drogen.

-- Orgaanpreparaat

Soms wil men gedurende een dissectie kijken of in een bepaald orgaan geen parasieten voorkomen. Men neemt hiervoor weer een glazen flesje en vult dit met 2 à 3 ml fysiologische zoutoplossing. Nu snijdt men van het betreffende orgaan een stukje weefsel ter grootte van ongeveer 1 cm³. Dit stukje doet men in het flesje en door middel van een glazen staaf drukt men het stukje fijn. De zo ontstane suspensie kan direct onderzocht worden of uitgestreken voor kleuring.

B. Fixering

De bovengenoemde monsters zijn eigenlijk alleen geschikt voor direct onderzoek, of onderzoek op levende parasieten. Indien men de monsters wil bewaren voor later, moeten ze gefixeerd worden. Dit wil zeggen zo behandeld dat gedurende lange

tijd (soms jaren) alles blijft zoals het op dit moment is. Wij onderscheiden hierbij drie verschillende technieken:

-- Waterige suspensies

De ontstane waterige suspensies worden na onderzoek gefixeerd, indien men het monster wil behouden. Dit heeft wel tot gevolg dat alles gedood wordt. Men voegt eenvoudig de dubbele hoeveelheid fixeermiddel toe als reeds aanwezige vloeistof. De meest gebruikte oplossingen zijn: geneutraliseerd formaline of Schaudinn oplossing. De monsters kunnen verzonden worden voor verder onderzoek en jaren bewaard.

-- Uitstrijken

De gedroogde uitstrijken worden 5 minuten lang in watervrije methanol gezet. Vervolgens laten drogen. De uitstrijken kunnen jaren later nog steeds gekleurd worden.

-- Histologische preparaten

Indien men een stukje weefsel wil bewaren voor histologisch onderzoek, wordt het stukje weefsel eenvoudig in 4% formaline of Bouin oplossing gedaan. Men vult hiervoor een flesje met 10 à 20 ml vloeistof en doet hierin één à twee stukjes weefsel van ongeveer 1 cm³. De blokjes blijven hierdoor jaren goed.

Het is misschien ook mogelijk dat men een heel dier wil fixeren. Men neemt hiervoor een ruime glazen pot, waarin het dier gemakkelijk past. Vervolgens vult men de pot half met 4% formaline. Het dier wordt nu met een injectiespuit op verschillende plaatsen ingespoten, vooral in de buikholte. Men spuit zolang men het dier ziet zwellen. Vervolgens doet men het dier in de pot en vult verder bij tot het hele dier onder de vloeistof zit.

Bij al de vorige beschrijvingen is een duidelijke en volledige etikettering een noodzaak, wil

men bijvoorbeeld na een dissectie nog weten wat, en waarom de verschillende monsters genomen zijn.

C. Preparaat maken

De methode die soms wordt toegepast bij faeces-onderzoek om een preparaat te maken is gebaseerd op het verschil in soortelijk gewicht tussen wormeieren en de resterende afvalstoffen in de faeces. Men neemt hiervoor een glad kunststof of glazen flesje van 20 ml, waarvan de opening iets kleiner is dan een dekglasje. Men filtert 2 à 3 ml van de faeces suspensie door verbandgaas in het flesje. Nu vult men het flesje tot boven aan met scheidingsvloeistof. Men moet zo aanvullen dat de vloeistof een weinig boven het flesje uitkomt. Hierop legt men voorzichtig een dekglasje en laat alles rustig staan. De zware fragmenten (zand, enz.) zullen langzaam zakken, de wormeieren die een kleiner soortelijk gewicht hebben zullen nu langzaam stijgen en tegen het opgelegde glasje gaan kleven. Na 15 à 20 minuten kan men het dekglasje voorzichtig afnemen en op een vochtig draagglas leggen. Men kan nu nog op wormeieren, flagellaten cysten en coccidiën onderzoeken. Aangezien trematode-eieren iets zwaarder zijn dan andere eieren, kan men door een keuze te maken in de samenstelling van de scheidingsvloeistof, deze eieren eerst laten zakken en bij een volgend monster mee laten stijgen. In een goed uitgerust laboratorium versnelt men de dalende en stijgende beweging van de eieren door centrifugeren. Men legt dan geen glasje op het huisje, maar neemt na afloop een weinig vloeistof van het oppervlak en onderzoekt deze. Men kan met de bovenstaande vloeistof ook een uitstrijk maken en fixeren, zodat men de wormeieren als preparaat kan bewaren.

Bij een dissectie vindt men soms nog levende

wormen in het spijsverteringskanaal. Men kan dan de wormen spoelen in water en in een flesje met fysiologische zoutoplossing bewaren. Na ongeveer 24 à 48 uur worden de wormen overgebracht in formaline 4%. De fysiologische zoutoplossing wordt voorzichtig afgegoten van het ontstane neerslag. Dit neerslag bestaat praktisch uitsluitend uit wormeieren van de respectievelijke wormen. Hiervan kan men een uitstrijk maken, laten drogen en fixeren. Men heeft nu een preparaat van de eieren en de corresponderende wormen op formaline.

D. Kleuring/differentiatie

Nadat preparaten gemaakt zijn en gefixeerd kan men deze kleuren. Het kleuren gebeurt om bepaalde structuren beter zichtbaar te maken (bijvoorbeeld bacteriën) of om een onderscheid te maken door de kleuring zo te kiezen dat bepaalde cellen kleuren en andere niet. Het kleuren steunt op het verschil in zuurgraad of chemische reactie van de verschillende bestanddelen. Zal men een uitstrijk kleuren met een basische kleurstof dan zullen alle zure componenten met de basische kleurstof reageren terwijl de basische componenten dit niet of veel minder zullen doen. Gewoonlijk gaat men als volgt te werk:

- Men kleurt met een kleurstof gedurende enkele minuten door het preparaatglaasje in de kleurstof te dompelen of met de kleurstof te overgieten.
- Nadien wast men de overgebleven kleurstof weg met water of een bepaald oplosmiddel.
- Nu differentieert men met een oplossing, zodat de zwak gebonden kleur terug oplost, maar de sterk gebonden kleur blijft.
- Men spoelt het differentiatiemiddel weg.
- Nu kleurt men opnieuw met een kontrasterende kleurstof die alle niet gekleurde delen kleurt.

Dit is bijvoorbeeld een normale gram-kleuring voor bacteriën. Men kleurt eerst met een blauwe kleurstof, differentieert en kleurt daarna met een rode kleurstof. De bacteriën die blauw gekleurd zijn noemt men gram-positief en de rode bacteriën gram-negatief.

E. Ontwateren/insluiten

De ontstane preparaten moeten met een dekglasje afgesloten worden om behouden te kunnen blijven. Dit gebeurt door op een droog en gekleurd preparaat een druppel insluitmiddel te doen. Door middel van een pincet wordt een schoon dekglasje op de druppel gelegd.

Men moet wel zorgen dat er geen luchtbellens onder blijven zitten. Nu zal het insluitmiddel tussen dek- en draagglas zich gelijkmatig verdelen. Men kan eventueel voorzichtig op het dekglas drukken of hierop een gewichtje zetten.

Vele van deze insluitmiddelen zijn onverenigbaar met water, wil men dus grotere delen zoals wormen, schimmels of insecten op deze wijze prepareren dan moet men eerst het water eruit halen. Men vervangt daarvoor het water in het weefsel door een oplosmiddel dat wel verenigbaar is met het insluitmiddel. Doet men dit niet en laat men alles eerst drogen dan schrompelen de ingesloten objecten, waardoor ze waardeloos worden. Om het water te vervangen doet men achtereenvolgens de stukjes gedurende enkele minuten tot uren in 50% alcohol, 75% alcohol, 95% alcohol en vervolgens in 100% isopropylalcohol. Daarna twee maal gedurende enkele minuten in toluen, xyleen of chloroform. Men kan nu direkt het insluitmiddel aanbrengen en afdekken. Voor grotere objecten kan men eventueel een insluitmiddel nemen dat wel voor waterige insluitingen geschikt is. Men kan hierin direkt waterige preparaten insluiten. Men moet wel na enkele uren drogen het dekglas omranden met een

laklaag, omdat deze insluitmiddelen aan de lucht uitdrogen. Dit noemt men aflakken. Gewoonlijk smelt men een laksoort en brengt deze met een staafje of penseel zo aan dat het dekglas een weinig aan de randen bedekt is. Men doet dit helemaal rondom en laat de lak afkoelen. Kleurloze nagellak is echter ook uitstekend geschikt.

MIKROSKOPISCHE UITRUSTING

Nu wij de meest voorkomende handelingen besproken hebben zonder volledig te willen zijn, wat in dit kader onnodig is, moeten wij nog aandacht besteden aan de recepten van de verschillende genoemde oplossingen en kleurstoffen. Er zijn natuurlijk veel verschillende kleurstoffen en samenstellingen. We willen enkel een paar algemene recepten geven en hun specifiek gebruik. In de bespreking van de meer specifieke gebieden zullen wij eveneens de verschillende recepten bij elke beschrijving voegen. Wij willen enkel deze noemen, die zonder moeilijkheden een goed resultaat geven, dat elke amateur kan bereiken.

Na de recepten-opgave volgt een lijst van de benodigde laboratoriummaterialen, welke strikt nodig zijn en enkele die wij kunnen aanbevelen.

RECEPTEN

Fysiologische zoutoplossing - 6 g keukenzout (NaCl) per liter water.

Alkohol 95% - gedenatureerde ontsmettingsalkohol (ethanol).

Alkohol 75% - 100 ml alkohol 95% + 20 ml water.

Alkohol 50% - 65 ml alkohol 95% + 45 ml water.

Methanol 100% - zuivere methylalkohol (giftig).

Isopropanol 100% - zuivere isopropylalkohol.

Tolueen (giftig, kan bij langdurige inademing
bloedbeeld veranderen).

Insluitmiddelen onverenigbaar met water en alcohol
- Caedax - droogt zeer langzaam: 2 à 3 maanden.

Insluitmiddelen alcoholhoudend, onverenigbaar met
water - Euparal - droogt zeer langzaam: ca. 1 week.

Insluitmiddelen waterhoudend - Polyvinyl laktofe-
nol. Glycerine - Gelatine.

Formaline 4% geneutraliseerd

Formaline 40%	100 ml
Natriumdihydrogeenfosfaat ($\text{NaH}_2\text{PO}_3\text{H}_2\text{O}$)	4 g
Dinatriumfosfaat (Na_2HPO_3)	6,5 g
Water	900 ml

Nadat men alles heeft opgelost, filtreren door fil-
treerpapier.

Bouin fixeermiddel

Alkohol 95%	50 ml
Formaline 40%	30 ml
Azijnzuur 100% (etsend)	7,5 ml
Verzadigde oplossing van pikrinezuur in water	12,5 ml
Gedestilleerd water	13 ml
Koperacetaat ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$)	1 g
Azijnzuur pas toevoegen bij het gebruik.	

Schaudinn

Verzadigde oplossing van kwikchloride (HgCl_2) in water	66 ml
Alkohol 95%	35 ml
Azijnzuur 100% (etsend)	1 ml
Polyvinylalkohol	5 g
Oplösungen van kwikzouten zijn zeer giftig. Azijnzuur pas toevoegen bij het gebruik.	

Afdeklak

50 g zuivere schellak hars smelten met 50 g bijen-
was.

Scheidingsvloeistof

- Verzadigde oplossing van keuzenzout (NaCl) in water. Trematode eieren blijven onder. 360 g NaCl in 1 liter H₂O.
- Zinksulfaat (ZnSO₄) oplossing.
330 g Zinksulfaat oplossen in 660 ml water. Trematode eieren drijven.

GLASWERK

Het strikt noodzakelijke materiaal wat men nodig heeft, is natuurlijk afhankelijk van wat men allemaal wil doen. Het meeste kan men zelf verzamelen en men hoeft slechts weinig te kopen. Indien men zijn kennissen vraagt wat medicijnflesjes te bewaren, heeft men reeds snel genoeg. Allerlei glazen flesjes en potjes zijn altijd bruikbaar. Men kan natuurlijk ook alles kopen in een zaak voor laboratoriummateriaal. Gewoonlijk kan men ook daar de chemikaliën kopen, zoniet, dan is men aangewezen op een apotheek.

- Glazen potjes - gebruikte penicilline flesjes met rubber stop, na schoon gemaakt te hebben, sterilizeren in een snelkookpan, boven water 20 minuten koken.
- Allerlei flesjes voor kleurstoffen en oplossingen.
- Spatel of klein lepeltje - de houten spatels uit ijsjes en dergelijke.
- Voorwerp- en dekglasjes te kopen bij opticiën.
- Steriele naald - stopnaald op houten handvat gemonteerd.
- Injektie spuit - plastic wegwerpspuiten in allerlei maten.
- Dissektiemesje of skalpel - scheermesje in houten handvat gemonteerd.
- Glazen staafjes - 15 cm lang en 4 à 6 mm dik.
- Verbandgaas.
- Klein glazen of plastic trechttertje.

Natuurlijk kan men ook rechtstreeks laboratoriummateriaal kopen, wat niet strikt noodzakelijk is, maar het werk vergemakkelijken.

- Kleurbakje waar men enkele voorwerpglasjes gelijktijdig in kan kleuren.
- Enkele pincetten, puntig, rond.
- Maatglazen van 100 ml, 50 ml en 10 ml.
- Bekers en erlenmeyers van 500 ml of 250 ml om de verschillende oplossingen te maken.
- Glazen trechter en filtreerpapier om de oplossingen te filtreren.
- Enkele pipetten met schaalverdeling of druppeltellers om op eenvoudige wijze kleine hoeveelheden vloeistof te nemen.