

De waarde van klinische diagnostiek bij laboratoriummuizen



R. Sneepers

*Nederlands Kanker Instituut (NKI), Plesmanlaan 121, Postbus 90203, 1006 BE Amsterdam
r.sneepers@nki.nl*

Samenvatting

Bij proefdieren is dagelijkse welzijns- en gezondheidscontrole wettelijk voorgeschreven. Om grote aantallen muizen op verantwoorde wijze te controleren is voor diervverzorgers van het NKI een controlesysteem ontwikkeld.

Uit een retrospectief onderzoek bij 127 muizen bleek dat dit systeem mogelijk verbeterd kon worden door elementen van een klinisch onderzoek toe te voegen. Vervolgens is een onderzoek uitgevoerd waarin de resultaten van de welzijns- en gezondheidscontrole bij muizen door een diervverzorger en het klinisch onderzoek door een dierenarts zijn vergeleken met de resultaten van postmortaal pathologisch onderzoek.

De overeenstemming tussen de resultaten van het klinisch en pathologisch onderzoek was bij de dierenarts significant beter dan bij de diervverzorger (sign test; $p < 0.001$).

Beoordeling van de ademhaling, de registratie van het lichaamsgewicht en het opnemen van de rectale lichaamstemperatuur bleken sleutelementen waarmee de diervverzorger de ernst van een afwijking kon documenteren. Het beoordelen van de huidtemperatuur bleek niet zinvol.

INLEIDING

Klinische diagnostiek

Het onderwijs voor dierenartsen in de klinische diagnostiek wordt gegeven volgens een methodiek beschreven door Rijnberk (1). Het onderzoek verloopt volgens een vast protocol en is een basis om afwijkingen te onderkennen en om vervolgstappen naar een diagnose te starten. De diagnose kan vaak de klinische verschijnselen verklaren (Tabel 1) (2).

Diagnostiek bij kleine zoogdieren

In de literatuur is een beperkt aantal methodieken beschreven om klinisch onderzoek bij kleinere gezelschapsdieren systematisch uit te voeren. Vooral de voorgeschiedenis (de anamnese), het bekijken van het dier in rust en tijdens het hanteren, het opnemen van de lichaamstemperatuur, het wegen en de buikpalpatie worden belangrijk beschouwd. Ook worden mogelijkheden genoemd voor nader onderzoek van orgaansystemen en van afgenomen lichaamsmateriaal zoals haar, huid, bloed, urine en feces. »

Tabel 1. Klinische diagnostiek bij huisdieren volgens de methode van Rijnberk

Klinische beoordeling van	Gevonden symptomen (voorbeelden)	Mogelijke oorzaak van de symptomen	Mogelijke einddiagnose
Algemene gegevens en voorgeschiedenis			
Algemene indruk			
• alertheid	verminderd		
• gedrag	verminderde eetlust	laag energiegebruik	
• houding			
• voortbeweging	traag		
• lichaamsvorm	dikke buik, ascites	slechte leverfunctie,	
• voedingstoestand	slecht	stuwing	
• vacht	opstaand		
• abnormale geluiden			
• in het oog springende afwijkingen			Hartaandoening
Algemeen onderzoek			
• ademhaling	verhoogde frequentie	long/circulatie probleem	
• hartslag	onregelmatig		
• lichaamstemperatuur	laag	slechte bloedsomloop	
• slijmvliezen	bleke kleur	bloedarmoede,	
	circulatieprobleem		
• lymfeklieren			
• haren en huid	slechte huidturgor	uitdroging	
Nader onderzoek van orgaansystemen	geringe urineproductie	verminderde nierfunctie	

De Rijnberk-methode wordt vooral toegepast op veel voorkomende (huis)dieren in Nederland, zoals hond, kat, rund en paard.

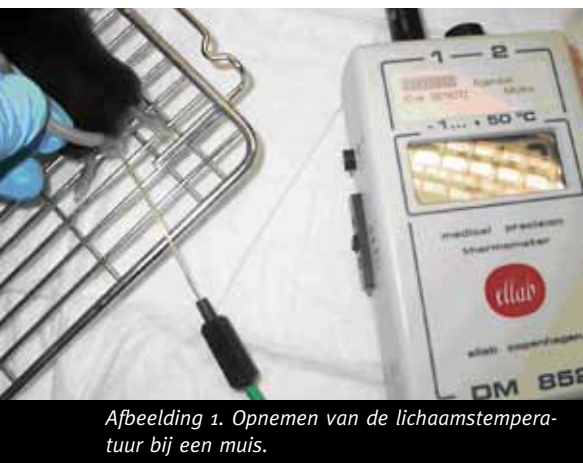
In Nederland is op basis van het klinisch onderzoek volgens Rijnberk een systematisch onderzoek beschreven voor als huisdier gehouden muizen (3).

Bij diagnostiek bij muizen worden soms delen van het onderzoek overgeslagen, omdat de resultaten beïnvloed kunnen worden door de onderzoeksmethode. De temperatuur kan bij muizen vrij snel (10 min) na een stressinducerende gebeurtenis, zoals verplaatsen of uit de kooi halen, oplopen. Deze stressgeïnduceerde hyperthermie is na 15-60 minuten weer verdwenen.

Ook kan de lichaamstemperatuur bij muizen dalen van 36,6 tot 34,3 °C door plaatsing in een restrainer (4). Dit effect kan mogelijk verklaard worden door warmteverlies in een koudere omgeving (de restrainer), door vermindering van activiteit of het is een evolutionaire aanpassing aan een situatie, waaraan ontkomen niet mogelijk is (vergelijk winterslaap). In het algemeen daalt de temperatuur bij muizen, zoals bij andere zoogdieren, bij het voortschrijden van ziekteprocessen.

De lichaamstemperatuur is bij muizen te meten met een rectale sonde, met een geïmplanteerde microchip of met een uitwendige sonde waarmee de uitwendige temperatuur kan worden bepaald. Er bestaat tussen de resultaten van de drie methoden een goede correlatie (5).

Voor muizen die als proefdier gehouden worden is nog geen model voor klinische diagnostiek beschreven. Door onderzoekers worden vaak klinische observaties van exper-



Afbeelding 1. Opnemen van de lichaamstemperatuur bij een muis.

rimentgerelateerde symptomen genoteerd, al dan niet in de vorm van scoresheets (6). Organen of orgaansystemen waar men geen afwijkingen aan verwacht worden niet altijd onderzocht. Om algemene (gezondheids)kenmerken te evalueren zijn voor kleine proefdieren (fenotyperings) systemen ontwikkeld die in de regel (veel) verder gaan dan het algemeen klinisch onderzoek.

Gezondheids- en welzijnscontrole

Binnen het NKI worden op twee manieren de gezondheid en het welzijn van muizen beoordeeld. Ten eerste door diervverzorgers via de dagelijkse controle en ten tweede in het kader van het experiment een specifieke, meestal door de onderzoeker uitgevoerde, controle op van te voren gedefinieerde parameters.

Beide controles moeten leiden tot de vaststelling van de gezondheid en het welzijn van het proefdier. Onjuist geïnterpreteerde of, erger, niet waargenomen symptomen kunnen leiden tot onnodig ongerief voor het proefdier of beïnvloeding van het onderzoeksresultaat. Een immunologisch experiment kan bijvoorbeeld nadelig beïnvloed worden door intercurrente infecties met bijvoorbeeld streptokokken of een darmontsteking door een worminfectie.

Omdat bleek dat de postmortale bevindingen niet altijd overeenkwamen met de gegevens uit de gezondheids- en welzijnscontroles, is onderzocht of verbeteringen in het controlesysteem mogelijk zouden zijn door toevoeging van elementen uit het Rijnberk-protocol.

MATERIAAL EN METHODE

Onderzoek door diervverzorger

Gescoord is op vier waarden voor vier parameters (Tabel 2a) en ook de meest in het oog springende klinische afwijkingen werden geregistreerd (Tabel 2b).

Het lichaamsgewicht is beoordeeld aan de hand van de 'norm' voor muizen van gelijk genotype, geslacht en leeftijd. Het is niet gemeten. Score 4 is gegeven als zowel de doorn- als de dwarsuitsteeksels van de ruggenwervels duidelijk te onderscheiden waren. Score 2 is gegeven als alleen de doornuitsteeksels met enige moeite palpabel waren.

Tabel 2a. Scoringstabel voor de diervverzorger: beoordeling van de algemene toestand.

	Normaal	Gering afwijkend	Afwijkend	Sterk afwijkend
Houding	1	2	3	4
Gedrag	1	2	3	4
Gewicht	1	2	3	4
Reactie	1	2	3	4

Tabel 2b. Scoringstabel voor de diervverzorger: klinische afwijking.

klein oog of afwezig	afwijkende extremiteit	kale plekken	afwijkende ademhaling	pijn bij hanteren
olifantstanden	waterhoofd	ruwe vacht	afwijkende temperatuur	agressief gedrag
bleke ogen	rectumprolaps	tumor	neusuitvloeiing	bijtwonden
diarree	dikke buik	draaijer	geboorteprobleem	huiddefect
mager	ontstoken testikels	ontstoken oren	oogontsteking	op sterven na dood
pups bijten	scheve kop	slechte groei	uitgedroogd	zwellling

Enkele voorbeelden van uiteindelijke score:

- muis met subcutane tumor zonder ziekteverschijnselen: 1-1-1-1---tumor.
- muis met ernstige ziekteverschijnselen en een afwijkende ademhaling als meest in het oog springend symptoom: 3-3-3-3---afwijkende ademhaling.
- muis die op sterven na dood was: 4-4-3-4---op sterven na dood.



Onderzoek door dierenarts

Muizen met eenvoudig herkenbare ongecompliceerde aandoeningen, zoals bijtwenden of oogontstekingen, zijn wel bekeken, maar niet geteld in dit onderzoek, omdat deze aandoeningen zonder verdere diagnostiek 100% trefzeker te benoemen zijn. Deze dieren dragen niet bij aan het onderzoek naar de waarde van klinisch onderzoek.



Afbeelding 2. Muis met een oogaandoening.

Eerst werd de ademhaling beoordeeld terwijl de muis nog in de kooi zat. Vervolgens is de muis uit de kooi gehaald om de lichaamstemperatuur te meten met een Ellab DM 852-thermometer voorzien van een Ellab rectaal probe type PRC-12080-A. De sonde is over een lengte van 2 cm rectaal ingebracht en na 30 sec afgelezen. Direct daarna, om stressgeïnduceerde hyperthermie te voorkomen, is van een gezonde kooigenoot de lichaamstemperatuur gemeten (controle).

Daarna volgde de rest van het onderzoek volgens de methodiek van Rijnberk. De muis werd gewogen met een elektronische Sartorius-weegschaal met een nauwkeurigheid van 0,1 g. Als er een even oude muis van hetzelfde geslacht (meestal broer of zus) in dezelfde kooi aanwezig was, werd deze ook gewogen als controle. Geprobeerd is door inspectie van de adembewegingen en palpatie, de ademhalingsfrequentie en de hartfrequentie vast te stellen, maar dit bleek niet uitvoerbaar.

Onderzoek door patholoog

Het postmortaal onderzoek heeft plaatsgevonden door de twee NKI-proefdierpathologen volgens de standaardmethodiek van het NKI.

Retrospectief onderzoek

Over de periode januari 2005 tot januari 2007 waren gegevens beschikbaar van 127 zieke muizen die voldeden aan de eis dat het klinisch onderzoek door dierversorger en/of dierenarts had plaatsgevonden en het postmortaal onderzoek was uitgevoerd (Tabel 3). Hiervan had een deel uitwendig zichtbare tumoren. Omdat er 17 muizen waren die door zowel dierversorger als dierenarts waren beoordeeld zijn er $127 + 17 = 144$ records.

Op basis van de resultaten van het postmortaal onderzoek heeft de dierenarts beoordeeld in hoeverre er een (mogelijk causale) relatie was tussen de resultaten van de klinische beoordeling en het pathologisch onderzoek:

- geen: score 1
- gedeeltelijk: score 2
- duidelijk wel: score 3

Als illustratie, hoe de indeling in de drie groepen tot stand kwam zijn enkele voorbeelden gegeven in Tabel 4.

Prospectief onderzoek

Om het onderzoeksresultaat uit het retrospectief onderzoek te bevestigen is een nieuw onderzoek uitgevoerd, waarbij 43 muizen door een dierversorger, de dierenarts en een patholoog onderzocht werden.

Tabel 4. Voorbeelden van de relatie tussen klinisch en pathologisch onderzoek.

Klinisch onderzoek dierverzorger	Klinisch onderzoek dierenarts	Pathologisch onderzoek	Overeenkomst met pathologie voor dierverzorger	Overeenkomst met pathologie voor dierenarts
4-3-2-1*/ dikke buik	3-3-2-2*, dikke harde buik; piloerectie; pompende ademhaling; temp.	lymfoom; milt en lymfeklieren zeer sterk vergroot; mediastinum aangedaan.	3	3
	35.5 (controle 38.5)			
3-3-3-3*/ uitgedroogd	4-3-3-2*; mager; stijf lopen; piloerectie; verdikte/ontstoken achterpoten; temp. 37.4	geen dehydratie; erosie/ontsteking achterpoten	1	3
3-3-2-3*/ ruwe vacht	3-3-2-3*, mager; piloerectie; volle/weke buik; temp. 36.8	vet dier; vergrote maag met hypertrofie van de mucosa; klier van Cowper cysteus	1	1
4-3-3-3*/ afwijkende ademhaling	4-4-1-4*; volle buik; mager; traag; piloerectie; donkerrode ogen; blauwverkleuring voetzolen; pompende ademhaling; temp. 29.5	ascites; hydrothorax; hartaandoening; leverhypertrofie	2	3

* Score voor houding, gedrag, gewicht, reactie

RESULTATEN

Retrospectief onderzoek

De resultaten staan in Tabel 5. De relatie tussen de klinische bevindingen en wat bij pathologisch onderzoek werd gevonden was bij de dierenarts beter dan bij de dierverzorger.

In het retrospectieve onderzoek zaten zeventien muizen die door beiden waren beoordeeld. Bij zeven was de score van de verzorger lager dan die van de dierenarts, bij tien was de score gelijk. Van de zeventien muizen hadden er vier uitwendig zichtbare tumoren. Bij de resterende dertien muizen was bij zeven muizen de score van de verzorger lager dan die van de dierenarts, bij zes was de score gelijk.

Tabel 5. Causale relatie van klinisch onderzoek en pathologische bevindingen in het retrospectief onderzoek.

groep muizen	n =	beoordelaar	Records	Relatie in %		
			n =	Geen	Deels	Duidelijk
wel tumoren	60	dierverzorger	56	13	6	81
		dierenarts	4	0	25	75
geen tumoren	84	dierverzorger	45	24	27	49
		dierenarts	39	5	15	80
alle	144	dierverzorger	101	18	15	67
		dierenarts	43	5	16	79
			144			

»

Prospectief onderzoek

De resultaten van dit onderzoek zijn vermeld in Tabel 6. Het gaat hier om muizen zonder uitwendig zichtbare tumoren en alle dieren waren door zowel de diervorzorger als de dierenarts gezien, en natuurlijk pathologisch onderzocht.

In het prospectief onderzoek was de overeenstemming in resultaten van het klinisch en pathologisch onderzoek bij de dierenarts significant beter dan bij de diervorzorger (sign test; $p < 0.001$) werd een significant (sign test; $p < 0.001$) verschil gevonden in overeenkomst met de pathologie tussen het onderzoek van de dierenarts en dat van de verzorger. Bij 26 muizen was de score van de diervorzorger lager dan die van de dierenarts, bij zeventien was de score gelijk.

Tabel 6. Relatie van klinisch onderzoek en pathologische bevindingen in het prospectief onderzoek.

	Records	Relatie in %		
<i>beoordelaar</i>	<i>n</i> =	<i>Geen</i>	<i>Deels</i>	<i>Duidelijk</i>
dierverzorger	43	14	60	26
dierenarts	43	0	9	91

Sleutelsymptomen

Tijdens het onderzoek kon een aantal sleutelsymptomen aangewezen worden, die bij de ernstig zieke muizen vaak afwijkend waren. Deze bevindingen kunnen samenhangen met het type muizen en/of het type onderzoek en hoeven daarom niet algemeen geldend te zijn.

De ademhaling was bij 24/41 (59%) van de ernstig zieke muizen duidelijk afwijkend.

De vacht van 35 (85%) ernstig zieke muizen vertoonde piloerectie.

Bij 38 (64%) van de ernstig zieke muizen was de rectale temperatuur meer dan 1°C lager dan bij gezonde kooigenoten. Bij vier solitair gehuisveste muizen was de temperatuur zelfs lager dan 34,5°C. Muizen met een temperatuur < 35,4°C voelden in de helft van de gevallen koud aan. Dit gegeven werd echter als zeer subjectief ervaren.

Er waren vijftien ernstig zieke muizen die twee maal zijn gewogen; bij zeven was het laatste bepaalde gewicht meer dan 20% lager dan bij gezonde kooigenoten.

Bijna alle, namelijk 40/41 (98%) van de ernstig zieke muizen waren vermagerd (palpatie van de rug).

DISCUSSIE

Uitvoering van het onderzoek

Het is niet eenvoudig, zo niet onmogelijk, om alle relevante onderdelen (zoals frequentie en type, ruis en bijgeluiden) van de *ademhaling* te beoordelen bij een muis in zijn normale omgeving. Tellen van de frequentie is onmogelijk en evenmin zijn de longen geausculteerd. Het ademhalingstype is wel te beoordelen: costaal/oppervlakkig of abdominaal. Bij muizen komt een langzame pompende ademhaling (dyspneu) voor als gevolg van ernstige longaandoeningen of van ernstig algemeen ziek zijn. Verder dient men te letten op neusuitvloeiing en op abnormale bijgeluiden van de ademhaling.

De *hartslag* bij muizen is niet uitwendig te bepalen zoals bij grotere diersoorten en de frequentie (500-600 per min.) is te hoog om te tellen.

De *lichaamstemperatuur* is bij muizen eenvoudig op te nemen en is een waardevolle parameter om het welzijn en de gezondheid van muizen te onderzoeken.

Van de *slijmvliezen* zijn die van het oog (de conjunctivae) te beoordelen, vooral op ontstekingen, minder op kleur. Eventueel kan men ook het mond- en tong-slijmvlies beoordelen: tijdens

fixeren van de muis is, eventueel na opensperren van de mond, dit slijmvlies te beoordelen. In dit onderzoek zijn alleen de conjunctivae onderzocht. Voor het beoordelen van bloedarmoede (anaemie), bloedindikking (hyperaemie) of zuurstofgebrek (cyanose) kan men beter naar niet behaarde, ongepigmenteerde (indien aanwezig) delen van de huid kijken, zoals de oren, de voetzolen en de staart.



Afbeelding 3. Muis met huidaandoening.

De *lymfeklieren* van de muis zijn alleen voelbaar als ze duidelijk vergroot zijn. Een eenvoudige vergroting bij een regionale ontsteking is moeilijk vast te stellen, maar vergroting, door bijvoorbeeld lymfomen meestal wel.

Palpatie van het *abdomen* (buik) is eenvoudig en snel uit te voeren en kan veel informatie opleveren. Men dient vooral bedacht te zijn op ruimte innemende processen, zoals de drachtige uterus en een overvulde blaas, maar ook tumoren van de milt of van de ovaria zijn goed te voelen. Vaak is het mogelijk om embryo's te voelen in de uterus in de tweede helft van de dracht. Een overvulde blaas is palpabel als een vrij stevige bolvorm in het caudale deel van de buik en soms urineert de muis door de palpatie. Tumoren van de eierstok zijn soms erg groot, vaak eenzijdig en te palperen in de bovenste helft van de buik, in het midden tussen ribboog en bekken. Een vergrote milt kan links achter de ribboog gepalpeerd worden. Soms is het mogelijk de nieren te voelen als deze vergroot zijn (bij niercysten). Zij zijn te onderscheiden van de drachtige uterus, doordat in de laatste embryo's palpabel zijn; het onderscheid met een ovariumtumor is niet mogelijk.

De *voedingstoestand* van muizen is vast te stellen door palpatie van de ruggengraat. Bij magere, en bij heel oude, muizen zijn de wervels duidelijk palpabel.

De resultaten

Bij de gezondheids- en welzijnscontrole, zoals die bij het NKI door de diervorzorger uitgevoerd wordt, kunnen in korte tijd grote aantallen muizen beoordeeld worden, waarbij in 67% van de gevallen een duidelijke relatie was vast te stellen met de postmortale pathologie (Tabel 5). Het klinisch onderzoek door een dierenarts, dat naar schatting vijf maal zoveel tijd kost, vooral door het wegen en rectaal opnemen van de lichaamstemperatuur, gaf in 79% van de gevallen een duidelijke relatie met de postmortale pathologie (Tabel 5). Het verschil tussen beide onderzoeken wordt groter, indien alleen muizen onderzocht worden met niet gemakkelijk herkenbare aandoeningen (49% versus 80%, Tabel 5). In dit onderzoek is niet gekeken naar de score van de diervorzorger als die de muis onderzoekt zoals de dierenarts dat heeft gedaan. Nader onderzoek zal moeten uitwijzen of dan misschien een betere relatie met het postmortaal onderzoek te vinden is.

Conclusie

Klinisch onderzoek afgeleid van het protocol van Rijnberk is bij laboratoriummuizen goed mogelijk, met uitzondering van het tellen van de ademhalingsfrequentie en de hartslag. In vergelijking met de op dit moment in het NKI uitgevoerde gezondheids- en welzijnscontrole »



Afbeelding 4. Muis met olifantstanden.

heeft het klinisch onderzoek volgens het Rijnberkprotocol, vooral door het wegen en het opnemen van de lichaamstemperatuur, een toegevoegde waarde voor het beoordelen van de gezondheid en het welzijn van muizen. Dit kan een bijdrage leveren aan een verantwoord gebruik van proefdieren in het experimenteel onderzoek.

Literatuur

Een volledige literatuurlijst over dit onderwerp is op aanvraag bij de auteur verkrijgbaar.

1. Rijnberk A, de Vries HW (1995) *Medical History and Physical Examination in Companion Animals*. Dordrecht, Kluwer
2. Brown M, Carbone L, Conlee KM, (2006) Working Group on Animal Distress in the Laboratory. Report of the Working Group on Animal Distress in the Laboratory. *Laboratory Animals (NY)* 35, 26-30
3. Visser CJM (1983) De muis als huisdier. Diergeneeskundig memorandum 1983-3, 3-35
4. Meijer MK, Spruijt BM, van Zutphen LFM, Baumans V (2006) Effect of restraint and injection methods on heart rate and body temperature in mice. *Laboratory Animals* 40, 382-91
5. Newsom DM, Bolgos GL, Colby L, Nemzek JA (2004) Comparison of body surface temperature measurement and conventional methods for measuring temperature in the mouse. *Contemporary Topics in Laboratory Animal Science* 43 (5), 13-8
6. Hawkins P (2002) Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Laboratory Animals* 36, 378-95.

«