

Afdeling Microscopie 1982-11-05

VERSLAG 82.95 Pr.nr. 404.2100

Onderwerp: Histologisch onderzoek naar  
de samenstelling van honde-  
en kattevoerconserven.

Bijlage: 1.

Verzendlijst: directeur, sektorhoofd (3x), direktie VKA, afd.  
Microscopie (4x), afd. Normalisatie (Humme), projekt-  
beheer, projekteider (Hollman), afd. Vlees, Feberwee  
(Direktie VKA).



Projekt: Onderzoek naar de kwaliteit van diervoeders en grondstoffen.  
Onderwerp: Histologisch onderzoek naar de samenstelling van honde- en kattevoerconserveren.

---

Doel:

Door middel van histologisch-microscopisch onderzoek nagaan of het mogelijk is blikken honde- en kattevoer op samenstelling te controleren.

Samenvatting:

Een twaalfstal monsters honde- en kattevoerconserveren werd met behulp van histologische technieken en diverse kleuringen onderzocht op samenstellende bestanddelen.


Conclusie:

Uit dit onderzoek is gebleken dat met behulp van histologische technieken en diverse kleuringen en microscopische waarnemingen het zeer goed mogelijk is de samenstelling van blikken honde- en kattevoer te controleren op hoofdbestanddelen en nevenbestanddelen.

Tevens kan geconcludeerd worden dat de op de verpakking vermelde declaraties in de meeste gevallen niet overeenkomen met de inhoud. Als hoofdbestanddeel werd in de monsters longweefsel, separatorvlees (meat) of TVP vastgesteld. Gezien de op de etiketten vermelde declaraties zoals "vlees met hart, rundvlees, jachtschotel met konijn, kipballetjes met kalkoen, e.d." lijkt het zinvol om conserven van honde- en kattevoer steekproefsgewijs te controleren op de juiste samenstelling.

---

Verantwoordelijk: drs W.J.H.J. de Jong  
Samenstellers: J.S. Ossenkoppele, J.J.M. Vliege  
Projektleider: ir P. Hollman





### Inleiding:

Op etiketten van honden- en kattenvoer wordt veelvuldig een in het oog springende vage aanduiding over de samenstelling van het produkt gegeven. Om te controleren of deze samenstelling enigszins met de inhoud overeenkomt, werd er een oriënterend histologisch onderzoek naar gedaan. Hiertoe werd een twaalfstal blikken honden- en kattenvoer onderzocht. Bij dit onderzoek zijn produkten van drie grote ondernemingen betrokken.

### Materiaal en methoden:

Twaalf van de meest gangbare produkten werden onderzocht op samenstelling en gewicht. De blikken werden, na uitwendige beoordeling, tien dagen bebroed bij 37°C, daarna gecontroleerd op volumeverandering en vervolgens, aangezien nimmer bombage was opgetreden, op de normale wijze geopend.

De inhoudsopgaven werden vergeleken met het door ons vastgestelde netto-gewicht. Tevens werd een organoleptisch onderzoek ingesteld. Voor het microscopisch onderzoek werden  $\pm$  8 representatieve stukjes van  $\pm$  2 x 2 x 0,5 cm uitgesneden per monster.

### Het vervaardigen van coupes

Om tot een goed herkenbaar microscopisch preparaat te komen zijn de volgende bewerkingen noodzakelijk:

1. Fixatie.
2. Het ontwateringsproces.
3. Inbedden in paraffine.
4. Snijden van het materiaal.
5. Strecken en opvangen.
6. Deparaffinatie-proces.
7. De kleuring.

#### 1. Fixatie

Het materiaal wordt gefixeerd om de toestand op het moment van de monsternamen zoveel mogelijk te behouden en het materiaal verwerkbaar te maken. Ter voorkoming van autolytische processen in het centrum mogen de monsters niet te dik zijn. Als fixatiemiddel wordt voor ons doel 10%ige formaline gebruikt.

## 2. Het ontwateringsproces

Het meest gebruikte inbeddingsmedium is paraffine. Een chemisch zeer inerte stof, die in geen enkele verhouding in water noch in alcohol oplost en slechts in organische oplosmiddelen zoals benzeen, toluen, xylol, chloroform en benzine oplost. Wil men dan ook deze weefsels met paraffine doordrenken, dan moeten deze eerst volledig watervrij gemaakt worden, hetgeen gebeurt in een alcoholreeks. Daar echter alcohol niet oplost in paraffine, moet er nog een tussenstap worden ingevoegd van een stof die zowel met alcohol als in paraffine oplosbaar is. Zeer geschikt hiervoor zijn benzeen, benzine, cederolie, xylol, toluen en chloroform. Bij dit onderzoek van honde- en kattevoer is het volgende ontwateringsschema toegepast:

a. formaline 10%	3 uur
b. alcohol 70%	1 uur
c. alcohol 96%	1 uur
d. alcohol 96%	1 uur
e. alcohol 96%	1 uur
f. alcohol absoluut	1 uur
g. alcohol absoluut	2 uur
h. alcohol absoluut	2 uur
i. xylol	1 uur
j. xylol	1 uur
k. paraffine	2 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> uur
l. paraffine	2 uur

## 3. Inbedden in paraffine

Wanneer de weefsels uit het ontwateringsapparaat komen, worden de weefselstukjes ± een kwartier in een vacuuminfiltrator geplaatst om de eventuele aanwezige luchtballen te verwijderen. Hierna worden de weefselstukjes met behulp van een inbedmachine ingesloten in verse paraffine.

## 4. Snijden van het materiaal

Vervolgens worden van de blokjes op een rotatiemicrotoom coupes van ca. 7 - 10 micron dik gesneden.

## 5. Strecken en opvangen

De coupes worden na het snijden gestrekt in een waterbad bij ca. 45°C, opgevangen en vastgeplakt op een objectglas. De opgeplakte coupes worden 24 uur gedroogd bij 37°C.

## 6. Deparaffinatie-proces

Om de coupes te kunnen kleuren wordt de paraffine met behulp van xylol verwijderd waarna zij via een alcoholreeks naar gedemineraliseerd water worden gebracht van waaruit zij worden gekleurd.

Tijdschema deparaffineren:

- a. 5 minuten xylol I
- b. 5 minuten xylol II
- c. 5 minuten ethanol 100%
- d. 3 minuten ethanol 96%
- e. 3 minuten ethanol 50%
- f. 5 minuten gedemineraliseerd water.

## 7. De kleuring

Er werden drie kleuringen toegepast bij dit onderzoek.

- a. Haemaluin-Eosine kleuring volgens Mayer
- b. Van Gieson kleuring volgens Domagk
- c. Cason-Mallory mengsel kleuring.

### a. Haemaluin-Eosine kleuring volgens Mayer

1. Haemaluin oplossing affiltreren.
2. 3 minuten de coupes in Haemaluinoplossing.
3. Gedurende 10 minuten spoelen in stromend leidingwater.
4. Eosine oplossing affiltreren.
5. Coupes 30 seconden in Eosine oplossing.
6. 30 seconden in ethanol 70%.
7. 2 minuten in ethanol 96%.
8. 5 minuten ethanol 100% I.
9. 5 minuten ethanol 100% II.
10. 5 minuten ethanol 100%/xylol 1:1.
11. 5 minuten xylol I.
12. 5 minuten xylol II.
13. Coupes insluiten met Entellan.

Samenstelling van de kleuroplossingen:

Haemaluin-oplossing

Los 1 gram haematoxyline op in 300 ml gedemineraliseerd water, voeg 0,2 gram natriumjodaat toe, daarna 50 gram kalium-aluminiumsulfaat, 50 gram chloralhydraat en 1 gram citroenzuur, vul aan tot 1000 ml met gedemineraliseerd water.

Bij gebruik oplossing eerst filtreren.

Eosine-gelblich oplossing

Los 5 gram Eosine-gelblich op in 479 ml gedemineraliseerd water, voeg 521 ml ethanol 96% en 1 ml ijsazijn toe.

Bij gebruik oplossing eerst filtreren.

Resultaat: kernen - blauw  
cytoplasma - oranje.

b. Gieson kleuring volgens Domagk

1. Coupes 2 minuten in Weigerts haematoxyline.
2. 10 minuten in stromend leidingwater.
3. 5 minuten kleuren in Gieson kleurmengsel.
4. 30 minuten spoelen in gedemineraliseerd water.
5. 5 minuten spoelen in ethanol 96% I.
6. 5 minuten spoelen in ethanol 96% II.
7. 5 minuten spoelen in ethanol 100% I.
8. 5 minuten spoelen in ethanol 100% II.
9. 5 minuten spoelen in ethanol 100%/xylol 1:1.
10. 5 minuten xylol I.
11. 5 minuten xylol II.
12. Insluiten met Entellan.

Samenstelling van de kleuroplossingen:

Weigerts haematoxyline

Oplossing A: los 5 gram haematoxyline op in 500 ml ethanol 96%.

Oplossing B: los 5,8 gram ferrichloride op in 490 ml gedemineraliseerd water en voeg 5 ml 25% zoutzuur toe.

Beide oplossingen filtreren.

Voeg vlak voor gebruik gelijke delen van A en B bij elkaar.

Van Gieson kleurmengsel

Oplossing A: maak 500 ml verzadigde waterige pikrinezuuroplossing  
(+ 1 g).

Oplossing B: los 1 gram thiazinerood op in 100 ml gedemineraliseerd  
water.

Voeg bij elkaar 100 ml oplossing A en 7,5 ml oplossing B.

Resultaat: kernen - donkerblauw  
collageen bindweefsel - helder rood  
spierweefsel - geel

c. Cason-Mallory mengsel (collageen kleuring)

1. Coupes 5 minuten in kleuroplossing.
2. 3-5 seconden spoelen in leidingwater.
3. 1 minuut ethanol 100% I.
4. 1 minuut ethanol 100% II.
5. 5 minuten ethanol 100%/xylol 1:1.
6. 5 minuten xylol I.
7. 5 minuten xylol II.
8. Coupes insluiten met Entellan.

Samenstelling van de kleuroplossing:

Kleuroplossing:

Los in 200 ml gedemineraliseerd water op:

- 1 gram fosforwolframzuur
- 2 gram Oranje G
- 1 gram anilineblauw
- 3 gram zure fuchsine.

De oplossing filtreren.

Resultaat: collageen en retikulaire vezels - blauw  
erythrocyten - roodoranje  
spierweefsels - lichtoranje  
zenuwweefsels en gangliencellen - roodviolet  
chromatine - rood



## Resultaten en Discussie

### 1. Onderzoek op steriliteit

Na tien dagen bebroeden bij 37°C vertoonde geen der conservenblikken zg. bombage, dat wil zeggen bolstaan van de blikken. Aangenomen kan worden dat de blikken voldoende gesteriliseerd waren en er geen bacteriegroei in deze periode heeft plaatsgevonden.

### 2. Onderzoek op netto-inhoud

In de tabel wordt de op de wikkel gedeklareerde netto-inhoud vermeld evenals de door ons vastgestelde netto-inhoud. Grote afwijkingen deden zich niet voor. Van de twaalf onderzochte monsters waren er drie waarvan het netto-gewicht groter was dan op het etiket was vermeld.

### 3. Organoleptisch onderzoek

De belangrijkste organoleptische waarneembare eigenschappen van de twaalf monsters waren als volgt:

Monster 1 voer bestaat voor de helft ongeveer uit gemalen vlees en de andere helft uit een vrij stevige massa, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 2 voer bestaat grotendeels uit kleine stukjes long, vrij veel vocht, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 3 in dit voer bevinden zich meerdere brokjes (in de vorm van worst), de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 4 voer bestaat overwegend uit moten vis, visgeur.

Monster 5 vlees in blokjesvorm, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 6 vrij vochtige inhoud, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 7 vrij vochtige inhoud, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 8 voer bestaat hoofdzakelijk uit balletjes, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 9 voer bestaat uit brokjes, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 10 monster bestaat hoofdzakelijk uit brokjes, de geur is onaangenaam, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 11 voer bestaat uit brokjes, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

Monster 12 monster bestaat uit stevig grof verdeelde inhoud, de geur is redelijk, het bevat plantaardig materiaal.

#### 4. Het microscopisch-histologisch onderzoek

Microscopisch werd nagegaan uit welke bestanddelen de verschillende monsters zijn samengesteld. Hierbij werd een verdeling gemaakt in hoofd- en nevenbestanddelen.

Tevens werd een sedimenteermethode volgens Intern Analysevoorschrift nr. M-3 toegepast (zie Bijlage I).

Uit het onderzoek op samenstellende bestanddelen blijkt dat in een aantal gevallen (5) als hoofdbestanddeel longweefsel wordt aangetroffen. In de declaratie op de verpakking wordt dit echter niet éénmaal vermeld. Wel vermeld werden produkten als orgaanvlees of vleesresten. In 5 monsters wordt meat (separatorvlees) als hoofdbestanddeel aangetroffen. Ook de aanduiding van dit produkt is op de verpakking als zodanig niet terug te vinden. In 3 monsters wordt als hoofdbestanddeel getextureerde soja (TVP) aangetroffen. In één geval hierbij was op het etiket vermeld "met plantaardige eiwitten". In het algemeen blijkt de aanduiding op de verpakking voor wat betreft de gebruikte ingrediënten, deze niet als hoofdbestanddeel in het monster voor te komen. In de meeste produkten zijn vrij goedkope grondstoffen verwerkt zoals long, meat (separatorvlees) en getextureerde soja (TVP).

De resultaten van dit onderzoek zijn in Tabel I samengevat.

Tabel 1 Overzicht van de samenstelling op basis van histologisch onderzoek

Nr.	Hoofdbestand- deel	Nevenbestanddelen	Aanduiding verpakking	Botgehalte/ graten*	Netto-inhoud	
					opgegeven	gevonden
1	Lever	T.V.P., meat, bot, vet, kraak- been, elastisch bindweefsel, plantaardig materiaal	vlees met lever. Samenst.: vleesresten o.a. rundvlees orgaanvlees, lever, granen, wei, karamel	+ 1%	410 g	406 g
2	Long	kraakbeen, elastisch bind- weefsel, vet, glad spier- weefsel, plantaardig materi- aal	vlees met hart	+ 0,5%	370 g	360 g
3	Long/Meat	bindweefsel, kraakbeen, bot, pees, damweefsel, luchtpijp, vet, plantaardig materiaal	rundvlees met hart, Samenst.: vlees, wild en konijn, tevens orgaanvlees, vleesbouillon, vitamines, mineralen, karamel	+ 2%	400 g	387 g
4	Vis	spierweefsel, graten	moten zeeverse vis (aanvullen- de kattevoeding)	+ 2%	370 g	410 g
5	Long/Lymfoid weefsel	meat, bot, kraakbeen, bind- weefsel, weinig T.V.P., vet, weinig spierweefsel, plant- aardig materiaal	met rundvlees. Samenst.: or- gaanvlees, vleesresten o.a. rund, granen, vitamines en mineralen	+ 1,5%	400 g	418 g
6	Long	vis, dikke damweefsel, vet, mondholte, glad spierweefsel, bindweefsel, tong, plantaar- dig materiaal	vlees met tonijn, Samenst.: orgaanvlees, tonijn, vlees- resten, vitamines en minera- len	+ 0,1%	400 g	417 g

\* Bij het opgegeven percentage aan bot/graten moet een ruime spreiding in acht worden genomen.

Vervolg Tabel 1. Overzicht van de samenstelling op basis van histologisch onderzoek

Nr.	Hoofdbestand- deel	Nevenbestanddelen	Aanduiding verpakking	Botgehalte/ graten*	Netto-inhoud	
					opgegeven	gevonden
7	Meat/Long	dikke damweefsel, lymfa- tisch weefsel, bindweefsel, bot, kraakbeen, vet, plant- aardig materiaal	jachtschotel met konijn (vol- ledig kattevoer), Samenst.: vlees, wild, konijn, orgaan- vlees, vleesbouillon, minera- len, karamel	+ 1%	405 g	404 g
8	Meat	kraakbeen, bot, vet, bind- weefsel, plantaardig materi- aal	kipballetjes met kalkoen (vol- ledig kattevoer), Samenst.: kalkoenvlees, kippevlees, or- gaanvlees, vleesresten, kipe- bouillon, vitamines, minera- len, karamel	+ 3%	405 g	387 g
9	Meat/T.V.P.	kraakbeen, bot, vet, bind- weefsel, plantaardig materi- aal	met rundvlees, Samenst.: vlees en vleesprodukten, o.a. rund- vlees, granen, plantaardige eiwitten, mineralen, vitamines	+ 2,5%	830 g	811 g
10	T.V.P.	elastische spierweefsels, vet, pees, varkenshuid, bind- weefsel, long, plantaardig materiaal	brokken met hart en pens	+ 1,5%	1000 g	985 g
11	Meat	kraakbeen, bot, vet, bind- weefsel, plantaardig mate- riaal	brokken met kip, Samenst.: kip, orgaanvlees, vlees- bouillon, granen	+ 2,5%	820 g	844 g
2	T.V.P./Long	kraakbeen, bot, vet, bind- weefsel, plantaardig mate- riaal	met echte stukken vlees geen samenstelling	nagenoeg niets	400 g	387 g

\* Bij het opgegeven percentage aan bot/graten moet een ruime spreiding in acht worden genomen.

Conclusies

1. Uit het onderzoek op steriliteit blijkt dat de conserven voldoende gesteriliseerd zijn.
2. De op het etiket gedeclareerde netto-inhoud komt nagenoeg overeen met de werkelijkheid.
3. Uit het organoleptisch onderzoek blijkt dat slechts één monster een enigszins onaangename geur vertoont. De overige monsters maken een redelijke aantrekkelijke indruk.
4. Uit het microscopisch-histologisch onderzoek kan geconcludeerd worden dat de op de verpakking vermelde declaraties in de meeste gevallen niet overeenkomt met de inhoud. Als hoofdbestanddeel werd in de monsters longweefsel, separatorvlees of getextureerde soja (TVP) vastgesteld.

Gezien de op de etiketten vermelde declaraties zoals "vlees met hart, rundvlees, jachtschotel met konijn, kipballetjes met kalkoen e.d." lijkt het zinvol om conserven van honde- en kattevoer steekproefsgewijs te controleren op de juiste samenstelling.

## Bijlage I

INTERN ANALYSEVOORSCHRIFT NR. M-3

1e oplage (1981-02-22)

De scheiding naar soortelijk gewicht door middel van vloeistoffen met een hoog soortelijk gewicht

---

### I. Bereiding van het bezinksel

#### 1. Reagentia

1. Tetrachloorkoolstof (tetra)
2. Chloroform.

#### 2. Apparatuur

1. Glazen sedimenteerkelken van 1/4 liter: conische glazen met voet, voorzien van glazen afsluitplug in het onderste, smalle gedeelte. In de plug bevindt zich een holte, waarin het bezinksel zich verzamelt, waarna dit door draaien van de plug kan worden gescheiden van de verdere inhoud van de kelk.
2. Zeefdoosjes: voorzien van zeefgaas met vierkante mazen van 0,32 mm maaswijdte.
3. Horlogeglazen: diameter ongeveer 9 cm.

#### 3. Analyse materiaal

Zie intern analysevoorschrift nr. M-1.

- Van dierlijke produkten, behalve bloedmeel, levermeel en vetkanen 2,0 g;  
Van gras-, klaver- en lucernemeel 5,0 g;  
Van andere produkten (inclusief bloedmeel, levermeel en vetkanen) 10,0 g.

#### 4. Uitvoering

Breng de afgewogen hoeveelheid analyse materiaal in een sedimenteer-  
kelk, waarin zich ongeveer 100 ml tetra bevindt. (Indien het monster  
in geperste vorm voor onderzoek is aangeboden, wordt het analyse mate-  
riaal in een mortier aangewreven met een weinig tetra en daarna met  
ongeveer 100 ml tetra overgespoeld in de kelk).

Roer het monster zorgvuldig met een roerstaaf door de vloeistof en laat daarna bezinken. Als regel zal bezinksel na ongeveer 5 minuten in de holte van de plug zijn verzameld. Draai vervolgens de plug een kwart slag om, schenk de tetra met de bovendrijvende bestanddelen af en schuif daarna de plug met het bezinksel voorzichtig uit de voet van de kelk. Schenk de bovenstaande tetra voorzichtig af en breng het bezinksel kwantitatief op een gewogen horlogeglas. Laat de tetra volledig verdampen, weeg horlogeglas met bezinksel en bereken de hoeveelheid bezinksel in procenten van het monster. Scheid daarna het bezinksel door middel van een zeefdoosje in een grove en een fijne fractie.

#### 5. Opmerking

Het gevonden gehalte is meestal geringer dan het ware gehalte aan soortelijk zware stoffen, doordat in geperste voeders, maar ook in andere, de zware delen, vooral wanneer ze zeer fijn verdeeld zijn, blijven kleven aan de lichtere en daardoor niet bezinken.

Het omgekeerde kan echter ook voorkomen.